

CARLOS ROBERTO CARVALHO LEITE



**PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO, SUPERÓXIDO DISMUTASE E
INTERLEUCINAS 6 E 12 POR MONÓCITOS DE PORTADORES
DE ESQUISTOSSOMOSE MANSÔNICA, NA FORMA
HEPATOESPLÊNICA, SUBMETIDOS À ESPLENECTOMIA E
AUTO-IMPLANTE ESPLÊNICO**

Tese apresentada ao Colegiado do Programa de
Pós-Graduação em Cirurgia do Centro de Ciências
da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco,
como parte dos requisitos para obtenção do título
de Doutor em Cirurgia.

Orientador-Interno

Dr. Carlos Teixeira Brandt

Professor Titular de Cirurgia Pediátrica do
Departamento de Cirurgia, CCS-UFPE

Orientado-Externo

Dr^a. Célia Maria M. Barbosa de Castro

Professora Adjunta de Microbiologia e Imunologia do
Departamento de Medicina Tropical, CCS-UFPE

RECIFE

2007

Leite, Carlos Roberto Carvalho

Produção de óxido nítrico, superóxido desmutase e interleucinas 6 e 12 por monócitos de portadores de esquistossomose mansônica, na forma hepatoesplênica, submetidos à esplenectomia e auto-implante esplênico / Carlos Roberto Carvalho Leite.. Recife : O Autor, 2007.

ix, 176 folhas ; il., fig., tab.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCS. Cirurgia, 2007.

Inclui bibliografia e anexos.

1. Esquistossomose mansônica... 2. Hipertensão porta. 3. Esplenectomia. 4. Auto-implante esplênico I. Título.

**617.55
617.5**

**CDU (2.ed.)
CDD (22.ed.)**

**UFPE
CCS2007-12**

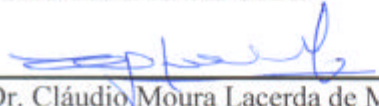
**PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO, SUPERÓXIDO
DISMUTASE E INTERLEUCINAS 6 E 12 POR MONÓCITOS
DE PORTADORES DE ESQUISTOSSOMOSE MANSÔNICA
NA FORMA HEPATOSPLÊNICA, SUBMETIDOS À
ESPLENECTOMIA E AUTO-IMPLANTE ESPLÊNICO”**

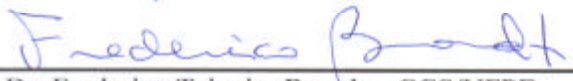
Carlos Roberto Carvalho Leite

APROVADA EM: 22/02007

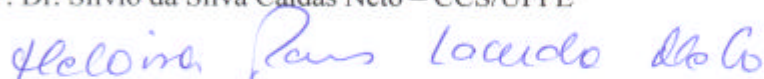
ORIENTADOR: Carlos Teixeira Brandt

COMISSÃO EXAMINADORA:


Prof.º Dr. Cláudio Moura Lacerda de Melo


Prof.º Dr. Frederico Teixeira Brandt – CCS/UFPE


Prof.º Dr. Silvio da Silva Caldas Neto – CCS/UFPE


Prof.º Dr. Heloisa Ramos Lacerda de Melo – CCS/UFPE


Prof.º Dr. Josemberg Marins Campos – CCS/UFPE

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

Relatório da Defesa de Tese do Dr. Carlos Roberto Carvalho Leite Aluno de Doutorado do Programa de Pós-graduação em Cirurgia, Área de Concentração: Cirurgia: Clínica e Experimental.

Às treze horas e trinta minutos do dia vinte e dois de fevereiro de dois mil e sete no Auditório Murilo La Greca do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, tiveram início os trabalhos de defesa de tese do Dr. Carlos Roberto de Carvalho Leite, para obtenção do grau de Doutor em Cirurgia. A comissão Julgadora – eleita pelo Colegiado do Programa e homologada pela Câmara de Pesquisa e Pós-graduação – foi integrada pelos professores: Dr. Cláudio Moura Lacerda de Melo, Doutor do Departamento de Cirurgia do CCS/UFPE (Presidente da Banca Examinadora); Dr. Frederico Teixeira Brandt, Doutor do Departamento de Cirurgia do CCS/UFPE; Dr. Silvio da Silva Caldas Neto, Doutor do Departamento de Cirurgia do CCS/UFPE; Dra. Heloisa Ramos Lacerda de Melo, Doutora do Departamento de Cirurgia do CCS/UFPE; e Dr. Josemberg Marins Campos, Doutor do Departamento de Cirurgia do CCS/UFPE; e, para suplentes: interno: José Lamartine de Andrade Aguiar e, finalmente, externo, Vera Magalhães da Silveira, tendo, como orientador interno, o Dr. Carlos Teixeira Brandt, Doutor do Departamento de Cirurgia do CCS/UFPE. A tese apresentada pelo doutorando Carlos Roberto Carvalho Leite versou sobre: “**PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO, SUPERÓXIDO DISMUTASE E INTERLEUCINAS 6 E 12 POR MONÓCITOS DE PORTADORES DE ESQUISTOSSOMOSE MANSÔNICA, NA FORMA HEPATOESPLÊNICA, SUBMETIDOS À ESPLENECTOMIA E AUTO-IMPLANTE ESPLÊNICO**”. Após, a explanação de 30(trinta) minutos, pelo candidato, justificando a escolha, o objetivo da pesquisa, a metodologia empregada e os resultados obtidos, baseados na análise estatística, ilustrados com datashow, foram realizadas as arguições na seguinte ordem: Prof. Dr. Cláudio Moura Lacerda de Melo (Presidente da Banca Examinadora), Prof. Dr. Frederico Teixeira Brandt, Prof. Dr. Silvio da Silva Caldas Neto, Prof. Dr. Heloisa Ramos Lacerda de Melo, e Prof. Dr. Josemberg Marins Campos; todas as arguições foram feitas no tempo regulamentar, e respondidas pelo candidato. Ao término das mesmas, a Comissão Julgadora proferiu o seguinte resultado: Prof. Dr. Cláudio Moura Lacerda de Melo (Presidente da Banca Examinadora), menção “Aprovado”, Prof. Dr. Frederico Teixeira Brandt, menção “Aprovado”, Prof. Dr. Silvio da Silva Caldas Neto, menção “Aprovado”, Prof. Dr. Heloisa Ramos Lacerda de Melo, menção “Aprovado”, e Prof. Dr. Josemberg Marins Campos, menção “Aprovado”. Conclusão, o candidato, foi aprovado com menção “Aprovado”. Nada mais havendo a registrar foram encerrados os trabalhos do que, para constar, elaborei o presente relatório que vai por mim, Niége Maria de Paiva Melo, Secretária, assinados depois do Senhor Presidente, e demais integrantes da Comissão Examinadora. Recife, 22 de Fevereiro de 2007.

Prof. Cláudio Moura Lacerda de Melo

Prof. Frederico Teixeira Brandt

Prof. Silvio da Silva Caldas Neto

Prof. Heloisa Ramos Lacerda de Melo

Prof. Josemberg Marins Campos

Niége Maria de Paiva Melo (secretária)

Conferir com o Documento
Original em 22/02/2007

Niége M. de Paiva
Sec. Executiva do Programa de
Pós-graduação em Cirurgia
CCS/UFPE
Nível Mestrado Doutorado
Cad. 00112566
SIAPE 1134300

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

REITOR

Prof. Amaro Henrique Pessoa Lins

VICE-REITOR

Prof. Gilson Edmar Gonçalves e Silva

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Celso Pinto de Melo

CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

DIRETOR

Prof. José Tha deu Pinheiro

HOSPITAL DAS CLÍNICAS

DIRETORA SUPERINTENDENTE

Prof. Heloísa Mendonça de Moraes

DEPARTAMENTO DE CIRURGIA

Prof. Marcelo Salazar da Veiga Pessoa

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIRURGIA

NÍVEL MESTRADO E DOUTORADO

COORDENADOR

Prof. José Lamartine de Andrade Aguiar

VICE-COORDENADOR

Prof. Carlos Teixeira Brandt

CORPO DOCENTE

Prof. Álvaro Antônio Bandeira Ferraz

Prof. Carlos Teixeira Brandt

Prof. Cláudio Moura Lacerda de Melo

Prof. Edmundo Machado Ferraz

Prof. Frederico Teixeira Brandt

Prof. José Lamartine de Andrade Aguiar

Prof. Salvador Vilar Correia Lima

Prof. Sílvio Caldas Neto

DEDICATÓRIA

Novamente...

A **Deus**, por todas as coisas boas que tem me proporcionado, especialmente pelas pessoas que colocou na minha vida.

Aos meus pais, **Geraldo Magela e Maria Socorro**, que, desde cedo, me mostraram a importância da educação e me ensinaram o caminho da ética.

À **Isabel**, minha esposa, pela paciência e tolerância. Hoje reconheço o seu sacrifício e abnegação em prol de minha formação.

Aos meus irmãos, **Luiz Fernando e Ana Laura**, meus amigos e conselheiros de toda hora.

Em memória dos meus **avós e avôs**, que, tenho a certeza, sempre intercederam por mim nos momentos difíceis.

E agora...

Aos meus filhos, **Sarah e Gabriel**, meus maiores presentes confiados por Deus. Em cada sorriso e gesto deles, uma força renovadora.

AGRADECIMENTOS

- ✍ À **Universidade Federal de Pernambuco e ao seu Programa de Pós-Graduação em Cirurgia**, que me acolheram, de braços abertos, tanto no Mestrado como no Doutorado, me propiciando realizar dois antigos sonhos: fazer pós-graduação e trabalhar com educação superior.
- ✍ Ao Prof. Dr. **Carlos Teixeira Brandt**, incansável estudioso da esquistossomose mansônica no Brasil, e que me apresentou o assunto do auto-implante esplênico e me estimulou a pesquisar sobre ele.
- ✍ À Prof^a Dr^a **Célia Maria Machado Barbosa de Castro**, a quem devo todos os meus passos dentro de um laboratório, pela participação irrestrita neste trabalho e pela oportunidade ímpar de trabalhar ao seu lado.
- ✍ Ao Prof. Dr. **José La martine de Andrade Aguiar**, Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Cirurgia da UFPE, pelas oportunas sugestões e pelo convívio sempre agradável.
- ✍ À colega de Doutorado, Dr^a. **Ana Catarina Delgado Sousa**, pela ajuda na constituição dos grupos estudados, que redundou numa grande amizade.
- ✍ Aos alunos bolsistas do Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica (PIBIC) **Carlos Brandt Filho e Francisco Manhães Machado de Castro**, e a biomédica **Fátima Diniz**, pelo apoio nos experimentos.

- ✍ Ao mestre, amigo, conselheiro e companheiro de universidade **Prof. Lenísio Bragante**, um modelo de homem de caráter, por ter me amparado de modo ilimitado em uma fase importante de minha vida.
- ✍ Ao **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)**, pelo financiamento do projeto.
- ✍ À **Diretora** da Escola Estadual **Jáder de Andrade**, Timbaúba – PE, **Lúcia Melo**, pela ajuda na constituição de um dos grupos estudados.
- ✍ À minha cunhada **Régia Leite**, grande incentivadora da minha profissão e com quem pude comungar dos mesmos ideais da pós-graduação.
- ✍ À minha cunhada **Rosselle Leite** e ao meu concunhado **José Queiroga**, pela ajuda incomensurável na reta final, muitas vezes prejudicando seus afazeres em meu benefício.
- ✍ A todos os meus **alunos** do Curso de Graduação em Medicina da Universidade Federal da Paraíba, que são a mola propulsora de minha labuta como professor.
- ✍ À **Mércia e Márcia Araújo**, pelos trabalhos de diagramação e pela boa amizade que construímos.

SUMÁRIO

RESUMO.....	viii
ABSTRACT.....	ix
CONSIDERAÇÕES INICIAIS.....	01
1.1 Introdução.....	02
1.2 Apresentação.....	06
ARTIGO 1.....	08
Introdução.....	10
O baço e as consequências imunológicas da esplenectomia.....	12
Sepse fulminante pós-esplenectomia.....	14
Auto-implante de tecido esplênico.....	18
Sistema fagocítico mononuclear.....	22
Sistema microbicida dos macrófagos.....	24
Superóxido.....	25
Superóxido dismutase.....	27
Óxido nítrico.....	28
Óxido nítrico sintase.....	30
Citocinas.....	32
Interleucina 6 (IL-6).....	32
Interleucina 12 (IL-12).....	34
Considerações finais.....	36
Abstract.....	37
Referências	38
ARTIGO 2.....	55
Abstract.....	56
Resumo.....	56
Introduction.....	57
Methods.....	57
Results.....	58
Discussion.....	59
Conclusion.....	60
References.....	60
ARTIGO 3.....	62
Resumo.....	64
Introdução.....	65
Métodos.....	68
Resultados.....	73
Discussão.....	74
Conclusão.....	79
Abstract.....	80
Referências.....	81

ARTIGO 4.....	87
Abstract.....	89
Introduction.....	90
Materials and Methods.....	95
Results.....	100
Discussion.....	101
Conclusion.....	107
References.....	108
 DISCUSSÃO GERAL.....	 117
 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	 134
Conclusões.....	135
Recomendações.....	136
 REFERÊNCIAS.....	 141
 ANEXOS.....	 153

RESUMO

Hipertensão porta devida à esquistossomose mansônica na forma hepatoesplênica (EHE) é tratada com sucesso pela esplenectomia e ligadura da veia gástrica esquerda (ELGE). Entretanto, após a retirada do baço, ocorre um aumento no risco da sepse fulminante pós-esplenectomia (SFPE), causada pelo prejuízo à função imune normal por uma alteração do sistema fagocítico mononuclear (SFM). Assim, o auto-implante de tecido esplênico tem sido proposto, em crianças, com a finalidade de restaurar a função esplênica quando a esplenectomia é necessária. A estimulação do SFM causa a liberação de espécies reativas de nitrogênio, como o óxido nítrico (^1NO), e de citocinas, como as interleucinas 6 (IL-6) e 12 (IL-12), que, juntos, têm um papel essencial na morte microbiana. Neste contexto, é importante também a ação da superóxido dismutase (SOD), enzima que transforma o superóxido em peróxido de hidrogênio, um potente produto microbicida. Este estudo de corte transversal teve o objetivo de avaliar a atividade funcional das células mononucleares do sangue periférico, empregando um ensaio *in vitro* em pacientes com EHE submetidos à ELGE e auto-implante de tecido esplênico em bolsa no omento maior, através da análise da produção de ^1NO ($\mu\text{mol/ml}$), IL-6 ($\mu\text{g/ml}$), IL-12 ($\mu\text{g/ml}$) e SOD (uSOD/mg proteína) no sobrenadante destas células. O grupo teste foi constituído de 19 pacientes com EHE submetidos, no Serviço de Cirurgia Geral da Criança, Hospital das Clínicas – UFPE, à ELGE e auto-implante esplênico (EHE/ELGE/AI/G3). Os resultados foram comparados com três grupos, incluindo 12 pacientes com EHE não tratados (EHE/G1), 13 pacientes com EHE submetidos à ELGE (EHE/ELGE/G2) e 15 indivíduos sadios (CT/G4). Análise da produção de ^1NO pelos monócitos mostrou resultados similares entre os grupos G2 ($6,7 \pm 0,4$), G3 ($7,4 \pm 1,6$) e G4 ($8,2 \pm 2,7$). Entretanto, os pacientes do G1 produziram níveis baixos de ^1NO ($5,3 \pm 1,3$), quando comparados ao G3 ($q=4,285$ $p?0,05$) e G4 ($q=5,837$ $p?0,01$). Em relação à liberação de IL-6, os monócitos do G1 demonstraram reduzida habilidade em produzir esta citocina ($468,0 \pm 198,0$), quando comparada ao G2 ($628,6 \pm 23,4$; $q=3,085$ $p?0,05$), G3 ($632,9 \pm 12,8$; $q=3,782$ $p?0,05$) e G4 ($639,2 \pm 32,2$; $q=4,332$ $p?0,05$). Ao contrário, nenhuma diferença estatística foi encontrada entre estes três grupos. A respeito da produção de IL-12, foram demonstradas altas quantidades desta citocina no G1 ($4,6 \pm 2,3$), estatisticamente significativa, em comparação com G2 ($1,3 \pm 0,6$; $q=4,695$ $p?0,05$), G3 ($1,7 \pm 1,3$; $q=4,353$ $p?0,05$) e G4 ($2,2 \pm 1,0$; $q=2,830$ $p?0,05$). Entretanto, não houve diferença estatística entre estes três grupos. A atividade da SOD foi significativamente maior no G1 ($9,2 \pm 3,8$) e G2 ($8,5 \pm 3,2$), em comparação com G4 ($5,1 \pm 2,1$), enquanto sua atividade no G3 ($7,3 \pm 3,1$) foi semelhante ao G4 ($q=2,954$ $p?0,05$). Coletivamente, os resultados sugerem múltiplos padrões no perfil de resposta imune durante a EHE e igualmente após esplenectomia com ou sem auto-implante esplênico. Este estudo dá suporte à hipótese de que o auto-implante esplênico é capaz de manter a atividade do SFM, que pode ter contribuído para proteger os pacientes do grupo EHE/ELGE/AI da SFPE.

DESCRIPTORIOS: Esquistossomose; Óxido nítrico; Esplenectomia.

ABSTRACT

Portal hypertension due to hepatosplenic mansonic schistosomiasis (SMH) is treated successfully by splenectomy and ligation of left gastric vein (SLGV). However, after splenectomy, occur an increased risk of overwhelming postsplenectomy infection (OPSI), caused by impair normal immune function due to alteration in the mononuclear phagocyte system (MPS). Thus, autotransplantation of spleen slices in a great omental pouch have been proposed, in children, to restore splenic function when splenectomy is necessary. Stimulation of the MPS cause the release of reactive nitrogen species, like nitric oxide (^2NO), and cytokines, as interleukin 6 (IL-6) and 12 (IL-12), that, together, have an essential role in the microbial killing. In this context, is also important the action of superoxide dismutase (SOD), enzyme which turn the superoxide to hydrogen peroxide, a potent oxidative product. This cross-sectional study had the objective of evaluating the functional activity, *in vitro* assays, of the peripheral blood mononuclear cell (PBMC), in patients with SMH who underwent SLGV and spleen tissue autotransplantation in a great omental pouch, using the analysis of ^2NO ($\mu\text{mol/ml}$), IL-6 ($\mu\text{g/ml}$), IL-12 ($\mu\text{g/ml}$) and SOD (uSOD/mg protein) production in supernatants in PBMC. The group test was constituted of 19 patients with SMH underwent, in the General Surgery of Children, University Hospital – UFPE, to SLGV and spleen autotransplantation (SMH/SLGV/AI/G3). The results were compared with three groups, including 12 patients with SMH not treated (SMH/G1), 13 patients with SMH who underwent SLGV (SMH/SLGV/G2) and 15 healthy individuals, who formed the control group (CG/G4). Analysis of ^2NO production by monocyte showed similar results among groups G2 (6.7 ± 0.4), G3 (7.4 ± 1.6) and G4 (8.2 ± 2.7). However, patients from G1 showed lower level of ^2NO (5.3 ± 1.3), when compared G3 ($q=4.285$ $p<0.05$) and G4 ($q=5.837$ $p<0.01$). Respecting IL-6 release, the monocytes of G1 showed a reduced ability to produce this cytokine (468.0 ± 198.0), when compared to G2 (628.6 ± 23.4 ; $q=3.085$ $p<0.05$), G3 (632.9 ± 12.8 ; $q=3.782$ $p<0.05$) and G4 (639.2 ± 32.2 ; $q=4.332$ $p<0.05$). In contrast, no statistical difference was found among these three groups. Regarding IL-12 production, was demonstrated high amounts, statistically significant, in G1 (4.6 ± 2.3) in comparison with G2 (1.3 ± 0.6 ; $q=4.695$ $p<0.05$), G3 (1.7 ± 1.3 ; $q=4.353$ $p<0.05$) and G4 (2.2 ± 1.0 ; $q=2.830$ $p<0.05$). Nevertheless, there were no significant differences among G2, G3 and G4. The SOD activity was significantly higher in G1 (9.2 ± 3.8) and G2 (8.5 ± 3.2), in comparing with G4 (5.1 ± 2.1), whereas its activity in G3 (7.3 ± 3.1) was similar as compared to G4 ($q=2.954$ $p<0.05$). Taken together, the results suggest multiple patterns in the profile of the immune response during the SMH and likewise after splenectomy with or without spleen autotransplantation. This study supports the hypothesis that spleen tissue autotransplantation is able of maintaining the activity of MPS, which may have contributed to protect the patients of the SMH/SLGV/AI group against OPSI.

KEYWORDS: Schistosomiasis; Nitric Oxide; Splenectomy.

CONSIDERAÇÕES INICIAIS

1.1 Introdução

A esquistossomose mansônica persiste como importante problema médico-social para o Brasil, particularmente para o Nordeste, representando a terceira causa de óbito entre as doenças classificadas como as grandes endemias rurais^{1,2}. No grupo pediátrico, a esquistossomose mansônica, na forma hepatoesplênica (EHE), pode determinar hipertensão porta (HP), sangramento digestivo por ruptura das varizes de esôfago, hiperesplenismo e alterações do crescimento e desenvolvimento^{3,4}. A maioria desses pacientes é tratada clinicamente, todavia, alguns requerem, adicionalmente, intervenção cirúrgica, sendo a esplenectomia, ligadura da veia gástrica esquerda e auto-implante de tecido esplênico uma opção de uso freqüente no Estado de Pernambuco^{3,5}.

A esplenectomia é um procedimento que corrige o hiperesplenismo e melhora o desenvolvimento pôndero-estatural nas crianças, mas determina complicações imunitárias importantes, em virtude da perda da função de proteção do baço na imunidade^{3,6,7}. A complicação mais temida é a sepse fulminante pós-esplenectomia (SFPE), por bactérias encapsuladas, que tem mortalidade de 50 a 75%⁸.

O auto-implante de tecido esplênico em bolsa, no omento maior, é a forma mais aceitável de preservar a função do baço quando a esplenectomia total for necessária. O procedimento diminui a ocorrência de SFPE em crianças, que tem sido atribuída à diminuição de imunoglobulina M, de linfócitos T e B circulantes, de properdina e de tuftsin, alterações que podem conduzir à deficiência da atividade do sistema fagocítico mononuclear (SFM)⁹⁻¹⁴.

O SFM é representado pelos monócitos e macrófagos e consiste de células que têm uma linhagem em comum cuja função primária é a fagocitose¹⁵. Estas células podem destruir as bactérias utilizando um sistema microbicida dependente de oxigênio, por meio de um

processo conhecido como explosão respiratória, cuja reação chave é a redução enzimática do oxigênio molecular (O_2) a ânion superóxido (O_2^-)¹⁶⁻¹⁸.

O O_2^- gerado por células fagocíticas pode ser convertido a peróxido de hidrogênio (H_2O_2), na presença da enzima superóxido dismutase (SOD), encontrada na membrana plasmática, no invólucro interno do fagossomo e no citossol, e a partir daí ser convertido em água e oxigênio, numa reação catalizada pelas enzimas catalase e sistema glutathion-peroxidase-glutathion-redutase¹⁹. Por isso, a presença destas enzimas é de grande importância na proteção da célula hospedeira contra a ação do ânion O_2^- no interior do citoplasma, permitindo sua ação apenas no centro do fagossomo¹⁹.

Em virtude do O_2^- refletir a iniciação da cadeia respiratória, a geração deste ânion por monócitos do sangue periférico foi avaliada em um grupo de pacientes submetidos no Serviço de Cirurgia Geral da Criança (SCGC), do Hospital das Clínicas (HC) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), à esplenectomia, ligadura da veia gástrica esquerda e auto-implante de tecido esplênico em bolsa no omento maior, trabalho que resultou na Dissertação de Mestrado do autor desta Tese, concluída em 2001^{20,21}. Este estudo demonstrou a manutenção dos níveis de O_2^- nos pacientes com fragmentos auto-implantados de baço, quando comparados aos indivíduos controles normais, e maiores do que nos pacientes esplenectomizados. Os achados deste trabalho vieram a corroborar a hipótese da manutenção da integridade do SFM promovida pelo auto-implante esplênico.

Além do O_2^- produzido pelos monócitos como agente microbicida, destaca-se a geração dos óxidos de nitrogênio tóxico, entre eles o óxido nítrico (1NO). O 1NO é um gás incolor e estável, cuja principal função é promover citotoxicidade mediada por macrófagos²². A molécula é produzida a partir da L-arginina, na presença de O_2 , em um processo catalisado pela enzima óxido nítrico-sintase (NOS), presente no citossol²³. A isoforma induzida desta

enzima (iNOS) tem sua produção estimulada por citocinas e lipopolissacarídeos (LPS). Portanto, a sua expressão resulta em inibição do crescimento de patógenos microbianos²⁴.

As células do SFM também atuam através da produção de várias citocinas que recrutam outras células inflamatórias (especialmente neutrófilos), tais como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), a interleucina 6 (IL-6) e a interleucina 12 (IL-12)¹⁵. A IL-6 é uma citocina pleiotrópica que medeia a imunidade natural, sendo estimulada por agentes infecciosos dos fagócitos mononucleares, servindo como fator de crescimento no final da sequência de diferenciação dos linfócitos B²⁵. Já a IL-12 é uma molécula que regula a inflamação imunomediada, ativando células inflamatórias específicas, como as células assassinas naturais (*natural killer*) e os linfócitos T²⁶.

A produção de TNF- α pelos monócitos do sangue periférico dos mesmos pacientes submetidos ao auto-implante esplênico no SCGC já foi avaliada em estudo conduzido no ano de 2003²⁷. Os resultados demonstraram que as concentrações desta citocina não diferiram nos três grupos estudados (esplenectomia, esplenectomia com auto-implante esplênico e controle sadio), demonstrando-se que após a esplenectomia, com ou sem auto-implante esplênico, a função dos monócitos, com relação à produção de TNF- α , mantém-se preservada.

A idéia central desta pesquisa partiu da observação da ocorrência relativamente freqüente da SFPE, na população pediátrica do SCGC do HC/UFPE, na década de 80. Assim, com o intuito de minimizar esta complicação, seguindo uma recomendação da literatura, foi padronizada e normatizada, a partir de 1990, a técnica do auto-implante esplênico após esplenectomia para tratamento da hipertensão porta causada pela esquistossomose mansônica na forma hepatoesplênica. Com este procedimento, foi observada uma significativa redução da prevalência da infecção fulminante, fato que vem sendo objeto de pesquisas até a presente data, a maioria delas investigando o papel imunológico do auto-implante esplênico.

Especula-se que a retirada do baço remova uma fonte importante dos macrófagos teciduais (esplênicos) e o sítio onde as reações imunes se processam, a partir da penetração dos antígenos originados no sangue, e que o auto-implante esplênico seja capaz de restabelecer a função destas células e as reações por elas induzidas.

Em virtude do controle da infecção depender do baço e do estado de ativação do sistema fagocítico mononuclear, este estudo teve por objetivo analisar, de forma prospectiva e usando o modelo de corte transversal, a atividade funcional dos monócitos do sangue periférico, *in vitro*, de pacientes portadores de esquistossomose mansônica, na forma hepatoesplênica, submetidos, no SCGC do HC/UFPE, à esplenectomia, ligadura da veia gástrica esquerda e auto-implante de tecido esplênico em bolsa no omento maior. De modo específico, o trabalho objetivou avaliar a produção do radical $^{\bullet}\text{NO}$, da IL-6 e IL-12 e da enzima SOD neste grupo de pacientes, comparando-se os resultados com os de pacientes esquistossomóticos hepatoesplênicos, ainda não tratados, esplenectomizados pela mesma doença e indivíduos saudáveis.

Com este trabalho pretende-se dar maior consistência à hipótese de que o auto-implante de tecido esplênico possa influir de forma positiva na atividade fagocítica, na imunidade celular e humoral destes pacientes, pela manutenção das reações imunes que continuam se processando nos fragmentos auto-implantados. Portanto, trabalhar-se-á com a hipótese de que o auto-implante de tecido esplênico determina, em pacientes esquistossomóticos hepatoesplênicos operados, manutenção dos níveis de geração de óxido nítrico, das interleucinas 6 e 12 e da atividade da enzima superóxido dismutase.

1.2 Apresentação

Esta Tese foi estruturada sob a forma de artigos científicos, conforme “Proposta para apresentação de Dissertação/Tese nos Programas de Pós-Graduação do Centro de Ciências da Saúde (CCS) da UFPE”, baseada em Souza MSL – *Guia para redação e apresentação de monografias, dissertações e teses*²⁸.

Assim, o corpo da tese foi composto de oito seções: Considerações iniciais; Artigo 1; Artigo 2; Artigo 3; Artigo 4; Discussão Geral; Considerações finais e Referências.

O **Artigo 1** representa uma revisão da literatura (sob a forma de artigo de atualização), com um título muito próximo do título da Tese, sendo organizado conforme as normas da Revista do “Colégio Brasileiro de Cirurgiões”, para a qual será enviado. O **Artigo 2** é artigo original publicado na Revista “Acta Cirúrgica Brasileira – Sept-Oct; vol 21 (5), 2006” estando disponível na página do Scielo (<http://www.scielo.br/acb>). O **Artigo 3** é artigo original aceito para publicação na Revista do “Colégio Brasileiro de Cirurgiões” e foi apresentado e premiado com “**Menção Honrosa**” no *I Encontro de Pós-Graduação do Centro de Ciências da Saúde*, da Universidade Federal da Paraíba (UFPB), em 30 de novembro de 2006, além de ter a sua publicação nos Anais do encontro (Anexo I). O **Artigo 4** é artigo original que foi formatado de acordo com as normas da Revista “Memórias do Instituto Oswaldo Cruz”, para a qual será enviado.

Estes artigos foram apresentados, como um trabalho único, na forma de comunicação oral, no *XXI Fórum de Pesquisa em Cirurgia*, promovido pelo Colégio Brasileiro de Cirurgiões, no Rio de Janeiro, em 10 de novembro de 2006 (Anexo II).

O resumo e o abstract desta tese serão submetidos para publicação e estão formatados de acordo com as normas da “Revista Brasileira de Ciências da Saúde” da UFPB (Anexo III).

Esta pesquisa foi realizada no Serviço de Cirurgia Geral da Criança e no Laboratório de Imunopatologia Keiso Azami (LIKA), da UFPE, e seguiu os princípios da Declaração de Helsinque, sendo aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa do CCS da UFPE (Anexo IV). O termo de consentimento livre e esclarecido foi assinado por todos os pacientes ou responsáveis (Anexo V).

O trabalho faz parte da linha de pesquisa *Esquistossomose cirúrgica* do Programa de Pós-graduação em Cirurgia da UFPE – Níveis Mestrado e Doutorado. Esta linha de pesquisa é o principal objeto de estudo do *Grupo de Pesquisa* que leva o mesmo nome, cadastrado no Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), que tem o autor desta Tese como um dos seus membros e cujo líder é o Prof. Carlos Teixeira Brandt, orientador deste trabalho.

Este grupo de pesquisa já produziu, entre outros trabalhos, capítulo de livro nesta área de estudo, intitulado “*Cirurgia esplênica na criança*”, do livro “*O Baço*” de autoria do Prof. Andy Petroianu, lançado em 2003 (Anexo VI).

ARTIGO 1

**Esplenectomia e auto-implante esplênico na hipertensão porta
esquistossomótica na criança e sua relação com o sistema fagocítico
mononuclear na promoção da resistência á infecção***

**Splenectomy and spleen autotransplantation in schistosomal portal
hypertension in children and your relation with the phagocytic mononuclear
system to promotion the resistance of infection**

Carlos Roberto Carvalho Leite¹; Carlos Teixeira Brandt²

1. Professor Assistente, Departamento de Cirurgia, Universidade Federal da Paraíba (UFPB), Mestre e Doutorando em Cirurgia, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

2. Professor Titular, Departamento de Cirurgia, CCS, UFPE

Trabalho realizado no Hospital das Clínicas da UFPE e no Laboratório de Imunopatologia Keiso Azami (LIKA)

* Artigo de Atualização que será submetido para publicação e formatado de acordo com as normas da Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões publicacao@cbc.org.br (Anexo VII)

INTRODUÇÃO

A prevalência média da esquistossomose mansônica no Brasil se situa em torno de 8% de sua população e o número estimado de portadores foi calculado em, aproximadamente, 8,3 milhões em 1997^{1,2}. A forma hepatoesplênica apresenta prevalência nas áreas endêmicas de 2 a 7%, aparece comumente após os cinco anos de idade, em habitantes de áreas endêmicas, usualmente 5-10 anos após a infecção inicial^{1,2}.

A esquistossomose mansônica, na forma hepatoesplênica (EHE), decorre do acometimento hepático produzido principalmente pelo grande número de ovos eliminados, carreados para o fígado pelo fluxo porta, onde desencadeiam uma reação granulomatosa que produz a lesão hepática característica da doença, a fibrose de Symmers³. Esta fibrose bloqueia parcialmente o fluxo porta, transformando a veia porta e seus ramos em tubos rígidos, elevando a pressão no sistema porta, instalando-se o quadro de hipertensão porta (HP), principal expressão fisiopatológica da EHE, e que se manifesta através de esplenomegalia, hiperesplenismo, varizes de esôfago, circulação colateral, hemorragia digestiva alta e alterações hepáticas variáveis⁴. Paralelamente, ocorre uma intensa neoformação vascular desenvolvida em torno dos ramos portais, que leva a um aumento do leito vascular, com redução da velocidade do fluxo porta, bem como a esplenomegalia decorrente da hiperplasia do sistema retículo-endotelial e da congestão, aumentando o débito sanguíneo esplênico e o fluxo na veia porta. Assim, na esquistossomose mansônica, o regime de HP é mantido por dois fenômenos: a fibrose periportal intra-hepática e o hiperfluxo esplênico⁵.

No grupo pediátrico, a EHE pode determinar HP, sangramento digestivo por ruptura das varizes de esôfago, hiperesplenismo e alterações do crescimento e

desenvolvimento⁶. Portanto, o principal objetivo da terapêutica cirúrgica na EHE é a resolução da HP⁴.

A maioria desses pacientes é tratada clinicamente, todavia, alguns requerem, adicionalmente, intervenção cirúrgica, sendo a esplenectomia, ligadura da veia gástrica esquerda e auto-implante de tecido esplênico uma opção de uso freqüente no Nordeste do Brasil⁶. A esplenectomia objetiva corrigir o hipoevolutismo, o hiperesplenismo e diminuir o gradiente de pressão portal, além de eliminar a volumosa tumoração^{3,4}. A ligadura da veia gástrica esquerda tenta desconectar as anastomoses entre o sistema venoso ázigo e o portal, diminuindo a pressão nas varizes do terço inferior do esôfago e do fundo gástrico⁷. O auto-implante de tecido esplênico possibilita, provavelmente, a manutenção da função imunitária original do baço, protegendo o organismo contra a sepse fulminante pós-esplenectomia (SFPE) causada por inúmeros germes, sobretudo os encapsulados⁸.

A esplenectomia é um procedimento capaz de reduzir significativamente a pressão no sistema venoso portal. Entretanto, embora tenha o benefício de corrigir o hiperesplenismo e melhorar o desenvolvimento pôn timero-estatural nas crianças, pode determinar uma série de complicações hematológicas e imunológicas, em virtude da perda da função de proteção do baço na imunidade^{9,10,11}.

O BAÇO E AS CONSEQUÊNCIAS IMUNOLÓGICAS DA ESPLENECTOMIA

O baço pode ser definido como sendo um filtro discriminatório, cuja estrutura e capacidade de filtração são estabelecidas por uma malha reticular (leito de filtração) com especializações (bainha linfocitária periarterial, nódulo linfático, zona marginal, bainha macrofágica periarterial, espaço pulpar e cordões esplênicos). Juntos, esses elementos especializados conferem ao órgão a capacidade de realizar suas importantes funções hematológicas e imunológicas¹² (Tabela 1).

Do ponto de vista imunológico, o baço é o maior órgão linfóide do organismo e o principal local de respostas imunes a antígenos originados no sangue¹³.

Tanto o fígado quanto o baço participam na depuração das bactérias existentes no sangue, porém, enquanto o fígado depura a maioria dos germes, em virtude de sua maior massa, o baço é um filtro mais eficiente, depurando mais bactérias por grama de tecido. Além disso, o fígado só faz a depuração de bactérias previamente opsonizadas, enquanto o baço é mais efetivo na depuração de bactérias pobremente opsonizadas⁸. Esta propriedade é única deste órgão, e a importante implicação prática desta especializada capacidade de fagocitose é que o baço é o local mais importante de depuração na fase precoce da invasão bacteriana, antes que quantidades suficientes de anticorpos específicos tenham sido produzidas¹⁴. E isto é particularmente importante na defesa contra os antígenos tipo 2 células T independentes (antígenos TI-2). Estes antígenos, geralmente polissacarídeos, são o componente antigênico da cápsula de bactérias encapsuladas como o *Streptococcus pneumoniae*¹⁵.

O primeiro contato do antígeno com as células imunocompetentes, dentro do baço, ocorre na zona marginal, uma estrutura exclusivamente presente neste órgão. Essa zona é única pela sua microvasculatura, permitindo um baixo fluxo sanguíneo

e pela presença de macrófagos especializados e um subtipo de células B intermediárias⁸. Embora células B possam ser encontradas em outros locais, a zona marginal representa o local de maior acúmulo deste tipo de células no corpo humano. Quando o sangue entra nos sinusóides da zona marginal, há um considerável aumento em seu diâmetro, com redução subsequente do fluxo sanguíneo. Igualmente na polpa vermelha, fonte abundante de macrófagos, um vagaroso fluxo é resultante. Isto permite um íntimo contato entre os antígenos e os fagócitos ou células linfóides, e entre os diferentes subtipos celulares envolvidos na resposta imune¹⁴. Nos humanos, este compartimento esplênico da zona marginal não é propriamente desenvolvido durante os dois primeiros anos de vida, o que pode explicar o aumento na susceptibilidade às infecções⁸.

O papel do baço na promoção da resistência a infecção foi reconhecido precocemente no século passado, quando Morris e Bullock demonstraram um aumento na taxa de mortalidade proveniente de infecção por *Bacterium enteriditis* em ratos esplenectomizados, quando comparados com ratos controles normais¹⁶.

Mesmo assim, a esplenectomia foi tida, durante várias décadas, como uma cirurgia benigna, e o baço como um órgão sem função precisa. Entretanto, a observação da SFPE estimulou as pesquisas voltadas para a função esplênica e as consequências da extirpação deste órgão, principalmente as imunológicas¹³.

Entre estas consequências destacam-se a redução da atividade fagocítica (em particular a materiais não opsonizados), a diminuição dos níveis séricos de imunoglobulina M (IgM), a redução da atividade do componente da via alternativa do sistema complemento (properdina), a diminuição do número de linfócitos T (LT) supressores, das interleucinas 1 (IL-1) e 2 (IL-2) e da tuftsin. A tuftsin é um oligopeptídeo circulante, formado por treonina-lisina-prolina e arginina, que estimula

a fagocitose por ativação direta dos leucócitos e que se encontra na fração gamaglobulínica das imunoglobulinas, admitindo-se que seja produzida no baço¹⁷⁻²⁴.

O efeito imunológico da esplenectomia é dependente da idade no momento da operação. Níveis de IgM caem e permanecem baixos por um ano, retornando lentamente aos valores normais quatro anos após a cirurgia. Níveis de imunoglobulina G (IgG) permanecem constantes ou aumentam, enquanto os níveis de imunoglobulina A (IgA) elevam-se¹⁹. Existe uma queda imediata e prolongada nos níveis plasmáticos de tuftsin, que leva a um defeito na fagocitose pelos neutrófilos^{22,25}. A ativação do sistema de complemento pela via alternativa (properdina) é também defeituosa, retornando somente ao normal alguns meses após^{17,26}.

Todos estes fatores justificam as mudanças imunológicas e as complicações que se seguem à retirada do baço. Tardamente, o risco mais temido é a sepse fulminante pós-esplenectomia.

SEPSE FULMINANTE PÓS-ESPLENECTOMIA

A primeira mudança séria no conceito de que o baço não era fisiologicamente essencial para o organismo, e que sua perda era bem tolerada, não causando nenhum impacto na saúde do paciente, veio com King e Schumaker, em 1952, que demonstraram a ocorrência de infecção bacteriana, com sepse fulminante, em cinco de dez crianças submetidas à esplenectomia por doença hemolítica, sendo dois casos fatais.

Estes autores afirmaram que a evidência da relação entre o baço e a resistência à infecção podia ser agrupada em quatro categorias: 1. o baço aumenta

na presença de certas infecções; 2. muitas infecções latentes são reativadas após esplenectomia; 3. em certas espécies de animais a esplenectomia deprime a resistência natural a infecções agudas e crônicas e 4. o baço é o maior reservatório de linfócitos do corpo humano, que tem um papel maior na formação dos anticorpos²⁷.

Em 1970, Najjar e Nishioka, concluíram que a SFPE decorria da perda da função imunológica esplênica. Em especial, pela deficiência do papel protetor do baço, mediado por uma endocarboxipeptidase, que atuava como uma leucoquinase na membrana externa das células fagocíticas, e fazia com que estas células liberassem o tetrapeptídeo tuftsina, a partir de uma fração da IgG¹⁸. Em condições normais, este oligopeptídeo estimula todas as funções das células fagocíticas, incluindo a fagocitose e as atividades imunogênicas e bactericidas²⁸. Nos pacientes que são esplenectomizados por rotura de baço e desenvolvem esplenose (implante) espontânea ou intencional, as concentrações de tuftsina se situam em níveis normais ou estão no limite inferior da normalidade^{22,25}.

A SFPE é agora uma condição bem reconhecida, que ocorre em virtude de dois mecanismos: 1. a ausência do baço permite que os microrganismos circulem por um longo tempo na corrente sanguínea e, no caso das bactérias, multipliquem-se em poucas horas; e 2. as funções esplênicas levam meses ou anos para serem assumidas por outros órgãos após a esplenectomia, resultando em um estado de vulnerabilidade²⁹.

A infecção fulminante é causada, na maioria dos casos, por bactérias, particularmente as encapsuladas, sendo o *Streptococcus pneumoniae* (pneumococos) o agente mais freqüente (50-90% de todas as infecções) e mais agressivo, seguido pela *Neisseria meningitidis* (meningococos) e *Haemophilus*

influenzae^{30,31}. Essas bactérias colonizam o sistema respiratório alto e, ao penetrarem na corrente sanguínea em pacientes asplênicos, provocam a SFPE³². Outras bactérias como o *Escherichia coli*, *Streptococcus* β -hemolítico, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* sp, também são notificadas como de risco³³.

O risco de desenvolvimento da infecção fulminante, durante toda a vida, em qualquer faixa etária, é de cerca de 5%, mas ele está diretamente associado à idade do paciente no momento da cirurgia e ao intervalo de tempo pós-esplenectomia³². Assim, o risco é maior nas crianças (incidência de 2 a 8%), devido o baço ser o principal responsável pela fagocitose de microrganismos durante os primeiros anos de vida, e nos primeiros anos após a cirurgia³⁰. Entretanto, a SFPE pode ocorrer desde poucos dias após a remoção do baço até vários anos, mas 52% dos casos ocorrem nos primeiros cinco anos, particularmente nos pacientes mais jovens^{30,33}.

Caracteristicamente, a SFPE tem início súbito com adinamia, mal-estar, febre, tosse, evoluindo rapidamente para choque séptico, com hipotensão arterial, coma, convulsão e óbito, poucas horas após a sua instalação³⁴. A coagulação intravascular disseminada pode estar presente num percentual significativo de casos, contribuindo para o aumento da morbidade. A taxa de mortalidade é de 50-75%³⁴.

O tratamento da infecção fulminante deve ser agressivo e precoce, logo nos primeiros sinais de provável sepse. Bridgen *et al* afirmaram que o ponto crítico no manejo dos pacientes com SFPE permanece no reconhecimento precoce do paciente de risco, seguido pela imediata intervenção agressiva, e que o diagnóstico nunca deve retardar o uso de terapia antimicrobiana empírica³⁵.

Assim, todos os pacientes asplênicos, com febre de origem não esclarecida, precisam receber antibioticoterapia de amplo espectro, frequentemente penicilina G

benzantina na dose de 1.200.000U para adultos e crianças maiores de 10 anos que, a princípio, possui boa ação contra germes encapsulados³⁵. Nas crianças menores de 10 anos e nos pacientes alérgicos à penicilina, a escolha recai sobre a cefotaxima ou ceftriaxone, em associação com a gentamicina, se uma fonte entérica ou urológica de infecção for suspeitada, e com a vancomicina, quando pneumococos com alto nível de resistência à penicilina são prováveis³⁶.

Entre as medidas que têm sido recomendadas a fim de diminuir a possibilidade de ocorrência da SFPE estão: 1. Imunoprofilaxia, através da vacina polissacarídica pneumocócica, feita pelo menos duas semanas antes da operação e repetida a cada 5 a 10 anos ou duas semanas após a cirurgia em situações de urgência; 2. Antibioticoprofilaxia, com o uso de cefalosporinas de 1ª geração; 3. Quimioprofilaxia, através da administração de penicilina oral (ou eritromicina nos pacientes alérgicos) nos primeiros dois anos após a cirurgia; e 4. Estratégias educacionais, através da identificação dos pacientes asplênicos (por meio de uma pulseira ou colar) e pelo registro, no pós-operatório, de episódios febris e seu pronto tratamento³⁶.

Apesar do sucesso dessas intervenções, capazes de reduzir de modo significativo a ocorrência da doença, o auto-implante de tecido esplênico heterotópico tem sido recomendado como a forma mais aceitável de preservar a função do baço quando a esplenectomia total é necessária^{22,37-40}.

AUTO-IMPLANTE DE TECIDO ESPLÊNICO

Depois que ficou provado que pacientes asplênicos apresentavam susceptibilidade aumentada às infecções por várias bactérias, o auto-implante de tecido esplênico realizado com o objetivo de manter a função residual do baço,

estimulou um número crescente de pesquisas experimentais e clínicas sobre tal procedimento^{22,25,37,41-52}.

Os estudos iniciais focalizaram-se na escolha do local ideal para o implante dos fragmentos esplênicos e na quantidade mínima de baço capaz de restaurar a sua função imune normal.

Tavassoly *et al* estudaram a regeneração do tecido esplênico auto-implantado em ratos, e concluíram que fragmentos esplênicos com 2g de peso regeneravam-se bem, indicando uma correlação linear entre o peso do tecido implantado e a sua regeneração. Entretanto, quando o peso de tecido implantado excedia 100g, o índice de necrose era maior que o de regeneração, levando à degeneração do tecido esplênico implantado⁵³. Estudos recentes têm demonstrado que 25% do baço ortotópico são suficientes para manter a função completa do órgão. Isto significa, em humanos, aproximadamente 35g⁵².

Tem sido demonstrado que o omento maior é o sítio mais apropriado para realização do auto-implante esplênico, na forma de pequenos fragmentos, e isso é atribuído à rica vascularização que existe nesta área, à abundância de células inflamatórias, fatores de crescimento e citocinas, e pelo fato de que o sangue venoso desta estrutura drena para dentro da circulação portal, assim como o sangue proveniente do baço. A bolsa omental acrescenta a vantagem de colocar as duas faces do baço em contato com o folheto omental além de prevenir a ocorrência de aderências^{47,54} (Figuras 1 e 2).

Manley e Marine, em 1917, foram os primeiros a demonstrarem a viabilidade dos fragmentos esplênicos implantados, após esplenectomia, no subcutâneo da parede abdominal de coelhos⁵⁵. Este achado foi confirmado em 1971 por Widmann *et al*, que conduziram estudo em ratos, no qual foi realizado esplenectomia,

homogeneização do tecido esplênico e sua injeção na cavidade abdominal. Estes autores observaram que houve “pega” do tecido esplênico (esplenose) no peritônio parietal, serosa gástrica e ao longo do mesentério, e demonstraram que, após o sacrifício dos animais, havia folículos e centros germinativos no tecido esplênico auto-implantado⁵⁶.

Para comprovar a funcionalidade do auto-implante esplênico, tem sido realizadas cintilografias abdominais com enxofre coloidal marcado com Tecnécio 99^m , verificando-se a atividade qualitativa do sistema fagocítico mononuclear (SFM) no local, pela fagocitose do material radioativo²³ (Figura 3).

Os benefícios do auto-implante esplênico na promoção da resistência à infecção foram demonstrados por vários autores, sendo explicados pela manutenção da resposta imunológica humoral promovida pelo procedimento. Entre as vantagens decorrentes, destacam-se o aumento lento e gradual de anticorpos, a melhora da função fagocítica oxidativa, demonstrada pela atividade de leucócitos periféricos, a preservação da função retículoendotelial (se comparada aos indivíduos esplenectomizados), a manutenção da síntese de IgM e IgG, com aumento da produção de IgA, a restauração do compartimento linfóide funcional esplênico e o aumento da resposta imune humoral à vacina polissacarídica pneumocócica^{37,43,45,46,57}.

A maior incidência de regeneração esplênica em seres humanos foi comprovada em estudo clínico retrospectivo realizado por Heuneking *et al*, em 1994. Estes autores analisaram 21 pacientes entre 10 e 17 anos que receberam implantes esplênicos após esplenectomia, comparando-os com os pacientes esplenectomizados da mesma faixa etária. A análise laboratorial foi feita através da

contagem da subpopulação de linfócitos e da análise da fagocitose para pneumococos *in vitro*. O estudo veio a confirmar a plena eficácia do procedimento⁴⁸.

A atividade hemocaterética também já foi avaliada em pacientes submetidos à esplenectomia e auto-implante esplênico no omento maior por hipertensão porta esquistossomótica, demonstrando-se negatização para pesquisa dos corpúsculos de Howell – Jolly no sangue periférico em mais de 90% dos pacientes²¹. O estudo corroborou a hipótese de que o procedimento é um método eficaz de produção de esplenose e manutenção da função de filtração esplênica.

Neste mesmo grupo de doentes, Brandt *et al* avaliaram a resposta imune à vacina pneumocócica polivalente. Assim, amostras de sangue foram coletadas antes e seis semanas após a vacinação. Os resultados indicaram que a resposta imune foi adequada em 15 pacientes (65%), intermediária em quatro e inadequada em outros quatro pacientes. Os autores acreditam que isto pode ser resultado da preservação da memória dos linfócitos B (LB), proporcionada pelo auto-implante²³. Estes achados foram confirmados pelo estudo de Resende *et al*, em 2001⁵¹.

Da mesma forma, Zhang *et al* avaliaram a influência do auto-implante esplênico em pacientes portadores de hipertensão portal e cirrose, medindo os níveis de IgM e tuftsin. Estes autores concluíram que o procedimento restaura os níveis da imunoglobulina e deste peptídeo após a esplenectomia⁵⁸.

Mais recentemente, a geração do ânion superóxido ($O_2^{-\cdot}$), um radical livre produzido por monócitos, e do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), o principal mediador da resposta do hospedeiro a bactérias gram-negativas, cuja principal fonte celular é o fagócito mononuclear ativado pelo lipopolissacarídeo (LPS), foram mensuradas, em um grupo de crianças e adolescentes submetidos à esplenectomia, ligadura da veia gástrica esquerda e auto-implante esplênico. O estudo demonstrou

a manutenção dos níveis deste radical nos pacientes com fragmentos auto-implantados de baço, quando comparados aos indivíduos controles normais, e maiores do que nos pacientes esplenectomizados. Por outro lado, não houve diferença significativa em relação aos níveis de produção de TNF- α , demonstrando não haver interferência da esplenectomia ou do auto-implante sobre os níveis desta citocina⁵⁹. Os achados deste trabalho vieram a corroborar a hipótese da restauração da função imune normal do baço, no que diz respeito à produção de agentes microbicidas pelas células mononucleares do sangue periférico, promovida pelo auto-implante esplênico.

Atualmente, o auto-implante esplênico é considerado por vários autores, como um procedimento essencial na prática clínica, por ser capaz de reduzir a ocorrência da SFPE, e isto pode ser atribuído à manutenção da integridade do SFM, pivô no mecanismo primário de defesa do hospedeiro, através de seus sistemas microbicidas e da produção de citocinas^{20,23,38-40,52,59,60}.

SISTEMA FAGOCÍTICO MONONUCLEAR

O SFM compreende o conjunto de macrófagos livres (monócitos) e fixos nos tecidos, os quais constituem populações heterogêneas, mas com propriedades comuns: a) são ricos em lisossomos, mitocôndrias e retículo endoplasmático rugoso (RER); b) aderem, *in vitro*, fortemente ao vidro, propriedade muito utilizada para se obterem populações puras destas células a partir de suspensões onde estão misturados a outros tipos celulares; c) fagocitam intensamente; d) apresentam antígenos de histocompatibilidade aos LT e e) promovem quimiotaxia, função que impede a migração aleatória dos macrófagos para longe dos locais de inflamação.

O baço contém 15% dos macrófagos fixos nos tecidos que participam na depuração de microrganismos e seus produtos, tais como endotoxinas e componentes da parede celular^{61,62}.

Todas as células do SFM na medula óssea, e depois da maturação e subsequente ativação, podem assumir formas morfológicas variadas. O primeiro tipo celular que entra no sangue periférico, depois de sair da medula, é chamado de monócito⁶².

Os monócitos têm 10–15 µm de diâmetro, e núcleos em forma de feijão, citoplasma finamente granular, contendo lisossomos, vacúolos fagocitários e filamentos citoesqueléticos⁶². Estas células contêm aproximadamente 30 grânulos azurófilos localizados perto do complexo de Golgi. A sua meia-vida na circulação é de aproximadamente 10 horas e a sua taxa basal de produção é de cerca de sete milhões de células/hora/dia, aumentando para 28 milhões durante a inflamação⁶¹ (Figura 4).

Uma vez estabelecidas nos tecidos, os monócitos se diferenciam e se tornam macrófagos. Os macrófagos exibem um número de mudanças físicas e bioquímicas, incluindo aumento do tamanho, número de grânulos, quantidade de RER, velocidade de deslocamento, conteúdo protéico, atividade de enzimas lisossômicas, e a capacidade de fagocitar, pinocitar, digerir e de liberar radicais a partir do oxigênio (O₂)⁶³.

O baço é um dos locais mais importantes de “depósito” de macrófagos. Os macrófagos hepáticos, entretanto, conhecidos como células de Kupffer, constituem o maior *pool* de macrófagos no corpo humano, sendo atribuída a estes uma importante função na remoção de materiais tóxicos e células tumorais⁶⁴.

As células da linhagem monocítica/macrofágica desempenham suas funções nas imunidades natural e específica. Na imunidade específica, os fagócitos mononucleares atuam como células acessórias para os linfócitos, processando, apresentando aos linfócitos T (LT) e destruindo os antígenos fagocitados (macrófagos ativados pelas células T), e finalmente promovendo a ulterior eliminação dos mesmos. Do ponto de vista da imunidade natural, duas funções têm destacada importância⁶⁵:

1. Os macrófagos fagocitam partículas estranhas, como bactérias, e a destroem através da geração de uma variedade de produtos tóxicos (Tabela 2), entre os quais os mais importantes são as espécies reativas de oxigênio (EROs), como o $O_2^{-\cdot}$ e as espécies reativas de nitrogênio (ERNs), como o óxido nítrico ($\cdot NO$)⁶¹;
2. Os macrófagos produzem citocinas que recrutam outras células inflamatórias, especialmente neutrófilos e outros macrófagos. As quatro principais citocinas produzidas pelos macrófagos são o TNF- α e a IL-1, interleucina 6 (IL-6) e a interleucina 12 (IL-12), que são chamadas em conjunto de monocinas, uma vez que são elaboradas principalmente pelos fagócitos mononucleares⁶¹.

SISTEMA MICROBICIDA DOS MACRÓFAGOS (ESTRESSE OXIDATIVO)

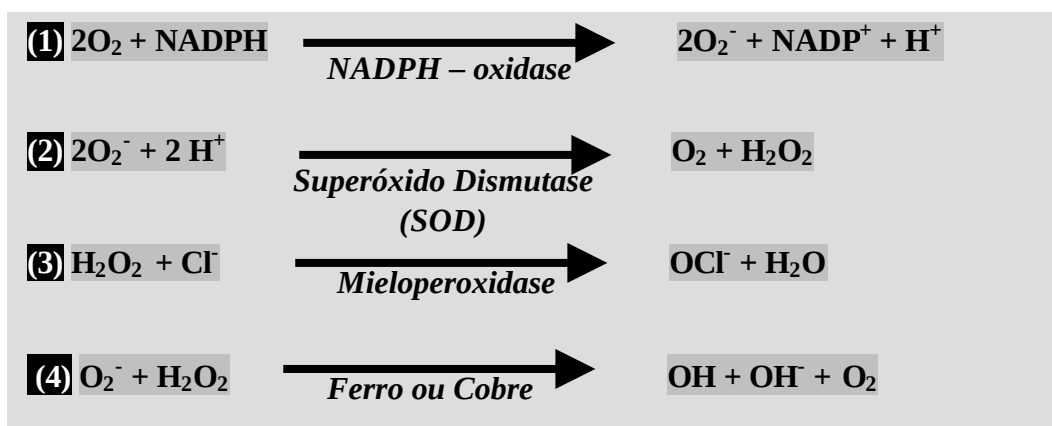
A morte bacteriana envolve uma multiplicidade de mecanismos, todos os quais são postos em ação por três eventos celulares: fagocitose, degranulação e iniciação da explosão respiratória (ER). A fagocitose representa a ingestão de partículas pelos fagócitos, sendo constituída de três etapas: 1. aproximação do macrófago do ponto de invasão; 2. aderência da partícula à membrana do fagócito; e 3. englobamento da partícula dentro de um vacúolo fagocitário, o fagossomo. A

degranulação descreve o processo de fusão entre o fagossomo primário com um ou mais lisossomos, formando o fagolisossomo⁶⁶.

A ER (*burst* respiratório) descreve uma via metabólica, inativa nas células em repouso, cujo objetivo é produzir um grupo de agentes microbicidas altamente reativos, dependente de O_2 , constituído de oxidantes letais produzidos por essas células quando estimuladas⁶⁷. Assim, a morte da bactéria fagocitada é alcançada pela ação do conteúdo dos grânulos lisossômicos e pelos agentes oxidantes fornecidos pela ER, chamados de radicais livres^{67,68}.

O termo ER refere-se a uma série coordenada de eventos metabólicos que são ativados quando os fagócitos são expostos a estímulos apropriados, tais como o LPS da parede das bactérias encapsuladas. O primeiro destes eventos a ser descoberto foi o aumento marcante do consumo do O_2 que ocorre após a estimulação do fagócito, cujo objetivo é fornecer energia para a fagocitose⁶⁷.

A ER consiste, desta maneira, no que alguns autores chamam de “os quatro aumentos”: 1. aumento do consumo de O_2 ; 2. aumento na produção de $O_2^{-\cdot}$; 3. aumento na produção de peróxido de hidrogênio (H_2O_2); e 4. aumento do consumo de glicose pela via da hexosemonofosfato^{68,69}. Embora a ER consista de quatro eventos separados, todos dependem da atividade de um simples sistema enzimático, que catalisa a redução de um elétron do O_2 a $O_2^{-\cdot}$, usando nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) como doador de elétrons⁶⁷, como descrito abaixo:



SUPERÓXIDO (O_2^-)

O O_2^- é produto da reação chave da ER, ou seja, a redução enzimática parcial de uma molécula de O_2 . Este radical livre é fabricado pelos fagócitos através da NADPH-oxidase, uma enzima associada à membrana, ativada quando as células são expostas a componentes bacterianos. Mais recentemente, foi demonstrado que esta enzima é uma flavoproteína, sendo uma transportadora de elétrons⁷⁰.

As conseqüências da produção de O_2^- não são de todas ruins, podendo até salvar a vida. Isso foi demonstrado após descobrir que o O_2^- é produzido em grande quantidade por fagócitos estimulados, e que indivíduos portadores de doenças em que estas células são incapazes de produzir o ânion superóxido são altamente susceptíveis a muitas bactérias danosas e infecções fúngicas⁷¹.

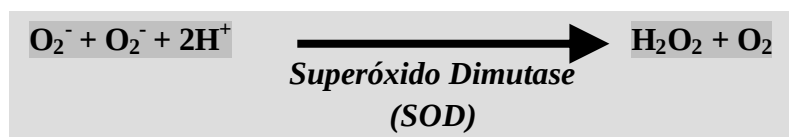
O O_2^- produzido por células fagocíticas atua no centro do fagossomo, mas também é liberado no citossol, podendo causar danos tóxicos para a membrana celular. Por isso, imediatamente à sua liberação no citoplasma, este radical é convertido a H_2O_2 na presença da enzima superóxido dismutase (SOD), presente na membrana plasmática e no invólucro interno do fagossomo. Entretanto, o H_2O_2 também é capaz de causar danos para a célula, embora não seja propriamente um radical. A sua detoxificação é feita através da catalase, que converte o H_2O_2 em água (H_2O) e O_2 , e do sistema glutathione-peroxidase-glutathione-redutase, que converte este composto em H_2O ⁷⁰. Por isso, a presença destas enzimas na membrana celular é de grande importância na proteção da célula hospedeira contra a ação do ânion superóxido no interior do citoplasma, permitindo a ação deste apenas no centro do fagossomo. Logo, células com baixas concentrações de SOD, catalase e de glutathione-peroxidase-glutathione-redutase, como é o caso dos neutrófilos, morrem após a fagocitose. Os macrófagos, ao contrário, são ricos nessas enzimas. O

desequilíbrio entre a liberação das EROs e a capacidade de ação destes sistemas de defesa antioxidantes promove o chamado estresse oxidativo⁷².

O $O_2^{\cdot-}$ é produzido durante a fagocitose ou amplamente liberado numa perturbação da superfície da membrana de fagócitos. Isto pode ser detectado através de sua habilidade em reduzir quimicamente um composto aceptor de elétrons. O ferricitocromo C tem sido particularmente usado neste intuito, e a sua redução através do $O_2^{\cdot-}$ forneceu a base para primeira análise sobre a atividade da enzima SOD^{73,74}.

SUPERÓXIDO DISMUTASE (SOD)

A SOD é uma metaloenzima essencial para proteger as células dos produtos tóxicos do metabolismo aeróbico, que reduz a toxicidade das EROs, convertendo uma espécie altamente reativa, o $O_2^{\cdot-}$, em uma forma menos danosa às células, o H_2O_2 ⁷⁵, conforme apresentado a seguir.



A SOD foi descoberta em 1969 por Mc Cord e Fridovich, como uma enzima do eritrócito capaz de remover cataliticamente os radicais superóxidos⁷³. Hoje se sabe que existem três isoenzimas SOD, sendo que duas são intracelulares (CuZn-SOD no citossol e Mn-SOD na mitocôndria), sintetizadas virtualmente por todas as células do corpo, e uma extracelular (EC-SOD), encontrada nos fluidos, como o plasma, linfa e líquido sinovial⁷⁵⁻⁷⁷. Weiseger *et al* demonstrou que as isoenzimas intracelulares são semelhantes estruturalmente, com a diferença de que a SOD

contendo manganês, após a sua síntese no citossol, migra para dentro da mitocôndria⁷⁸.

A isoenzima CuZn-SOD citossólica, cuja estrutura é representada por um homodímero, possui como centro ativo um íon cobre (Cu) e um íon zinco (Zn). A enzima usa atração eletrostática para alcançar difusão e reconhecimento do substrato. O local ativo da enzima é composto de um íon Zn^{2+} , coordenado por três histidinas e um ácido aspártico, e pelo cobre cataliticamente ativo^{79,80}.

A geração de $\text{O}_2^{\cdot-}$ e de H_2O_2 , após a ação da SOD, no centro do fagossomo, permite a liberação de vários outros radicais livres, altamente microbicidas, numa reação em cadeia que leva à morte da bactéria. Entre eles, está o $\cdot\text{NO}$ ⁷¹.

ÓXIDO NÍTRICO ($\cdot\text{NO}$)

O $\cdot\text{NO}$ foi originalmente descrito por Palmer *et al*, em 1987, como o fator relaxante derivado do endotélio (EDRF), e em 1992, em tributo à sua potencial importância nos sistemas biológicos, foi considerado a “molécula do ano”^{81,82}.

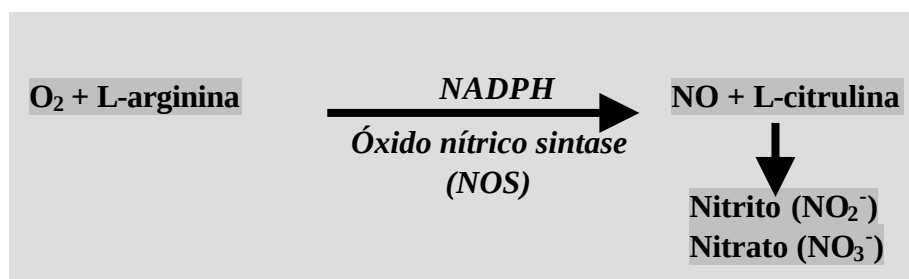
Atualmente sabe-se que o $\cdot\text{NO}$ é um radical livre, gasoso, inorgânico, incolor, que apresenta sete elétrons do nitrogênio e oito do oxigênio, tendo um elétron não pareado, situação que o faz reagir facilmente com o O_2 , o $\text{O}_2^{\cdot-}$ ou metais de transição, como o ferro, cobalto, manganês ou cobre⁸³.

O $\cdot\text{NO}$ é uma molécula facilmente difusível nos líquidos corporais e tecidos e atravessa livremente as membranas celulares. Para um radical, ele é relativamente estável. Prova disso é que o $\cdot\text{NO}$ não reage com ele mesmo e tem uma meia vida fisiológica de segundos a minutos dependendo de sua concentração e condições químicas ambientais, enquanto a maioria dos outros radicais livres tem uma meia-vida de micro ou nanosegundos⁸⁴.

Globalmente, este radical livre possui papel importante em processos patológicos, além de ser mediador da atividade antitumoral e de diversas funções incluindo neurotransmissão, vasodilatação e imunorregulação⁸⁵. Do ponto de vista imunológico, o $^{\bullet}\text{NO}$ está envolvido na imunidade inata, como um agente tóxico para organismos infecciosos, protegendo o hospedeiro, mas pode induzir ou regular morte e função de células imunes hospedeiras, através da indução ou inibição da apoptose ou por necrose, causando dano ao hospedeiro, portanto regulando a imunidade específica⁸⁴. Assim, sob diferentes condições, o $^{\bullet}\text{NO}$ pode ser citotóxico ou citoestático (citoprotetor).

O $^{\bullet}\text{NO}$ tem um importante papel na citotoxicidade de macrófagos ativados contra vários patógenos, incluindo o *Schistosoma mansoni* (*S. mansoni*). Apesar de este ser um parasita extracelular, a facilidade de difusão do $^{\bullet}\text{NO}$ através das membranas faz com que ele possa atuar sobre os organismos desta natureza⁸⁶.

A síntese de $^{\bullet}\text{NO}$ resulta da ação de um grupo de enzimas denominadas óxido nítrico sintases (NOS), presentes em vários tecidos em diferentes isoformas, que convertem o aminoácido L-arginina em $^{\bullet}\text{NO}$ e outro aminoácido, a L-citrulina⁸⁷. A L-citrulina, por sua vez, pode ser convertida em dois metabólitos: o nitrito (NO_2^-) e o nitrato (NO_3^-), que podem ser facilmente mensurados, fornecendo um meio indireto da produção da espécie radicalar. Entretanto, reações do $^{\bullet}\text{NO}$ diferem *in vitro* e *in vivo*. *In vitro*, o principal produto de degradação é o NO_2^- , enquanto *in vivo* o principal produto é o NO_3^- , como uma consequência da reação do $^{\bullet}\text{NO}$ com a hemoglobina⁸⁸. As reações da síntese do NO e seus metabólitos são apresentadas abaixo:



A L-arginina é um aminoácido semi-essencial produzido no organismo, porém em quantidade insuficiente para todas as necessidades. Além do ciclo da uréia, a arginina é utilizada na síntese da creatinina e fornece ornitina para síntese de poliaminas, numa reação catalisada pela enzima arginase. Como há uma solicitação metabólica continuada da L-arginina, existe uma neo-síntese da L-arginina nos túbulos contorcidos proximais renais a partir da citrulina⁸⁹.

ÓXIDO NÍTRICO SINTASE (NOS)

A enzima NOS apresenta-se sob três isoformas, que se agrupam em duas categorias: a NOS constitutiva (cNOS), que induz concentrações baixas de ^1NO e é dependente de íons cálcio (Ca^{++}) e de calmodulina (envolvida na sinalização celular) e a NOS induzível (iNOS), que não é regulada por cálcio, libera grandes quantidades de ^1NO , sendo produzida por macrófagos e outras células ativadas por citocinas, ao nível do citossol. A isoforma constitutiva c-NOS compreende a NOS neuronal (tipo I), presente nos neurônios, e a NOS endotelial (tipo III), presente no endotélio⁸³.

A iNOS (tipo II), também chamada de macNOS (*macrophage NO synthase*), não é expressa constitutivamente, isto é, não está presente de modo habitual, sendo induzida somente em células ativadas por citocinas, como o TNF- α e o interferon gama (IFN- γ), e/ou endotoxinas bacterianas, em uma variedade de células, incluindo os macrófagos, LT, células endoteliais, miócitos, hepatócitos, neutrófilos e plaquetas. A sua produção continua indefinidamente até que a L-arginina necessária para a sua síntese seja depletada ou ocorra a morte celular⁸⁴.

A indução de iNOS é feita pelas citocinas derivadas dos LT. As citocinas de padrão T helper do tipo 1 ($\text{T}_{\text{H}1}$), como o IFN- γ e IL-2, regulam positivamente o ^1NO , enquanto que a regulação negativa é feita pela IL-4 e IL-10, citocinas de perfil T

helper do tipo 2 (T_H2)⁹⁰. Os macrófagos, como células apresentadoras de antígenos em sua superfície, liberam também interleucina 12 (IL-12), que induz a diferenciação de células T em células T_H1 , produzindo o IFN- γ , que estimula a produção de 1NO nos próprios macrófagos via iNOS⁹¹.

O 1NO produzido pela iNOS, em altas concentrações, é rapidamente oxidado às ERNs. Sob condições gasosas, as ERNs formadas são o dióxido de nitrogênio (1NO_2), ou trióxido de dinitrogênio (1N_2O_3) e o tetraóxido de dinitrogênio (1N_2O_4), mas em soluções aquosas, o 1N_2O_3 é o maior produto oxidativo. A liberação destas ERNs, na qual também se inclui o próprio 1NO , promove o chamado estresse nitrosativo⁸⁴. Em processos infecciosos, células ativadas como macrófagos e neutrófilos secretam simultaneamente altas concentrações de ERNs, como o 1NO , e de EROs, como o $O_2^{-\cdot}$, combinando-se os estresses oxidativo e nitrosativo. A ação cooperativa entre estes dois radicais resulta na formação do ânion peroxinítrico ($OONO^{-\cdot}$), um poderoso radical livre que pode causar peroxidação lipídica, além de inibir a respiração mitocondrial, depletando as fontes de energia, e produzir dano ao DNA do parasita⁸⁷.

A produção de $O_2^{-\cdot}$ pode regular a atividade do 1NO . O 1NO produzido intracelularmente pelos macrófagos se difunde para fora da célula, onde, na ausência de $O_2^{-\cdot}$, pode se difundir para dentro dos LT, inibindo a sua proliferação. Por outro lado, 1NO pode se combinar extracelularmente com o $O_2^{-\cdot}$ espontaneamente produzido pela NADPH oxidase formando $OONO^{-\cdot}$, prevenindo a entrada de 1NO dentro das células T, e, portanto, estimulando a proliferação das mesmas. Assim, a interação entre o 1NO e o $O_2^{-\cdot}$ no baço pode determinar a intensidade da resposta imune⁹¹.

CITOCINAS

As citocinas são hormônios protéicos que mediam as fases efetoras das imunidades natural e específica. Na imunidade natural, as citocinas são produzidas principalmente pelas células do SFM, e costumam ser chamadas de monocinas. A maioria das citocinas da imunidade específica é produzida pelos LT ativados, e tais moléculas são chamadas de linfocinas⁶².

Os efeitos das citocinas podem ser sinérgicos ou antagônicos entre si. Um exemplo deste antagonismo é a dicotomia no padrão de produção de citocinas T_H1 e T_H2. Quando os LT produzem citocinas de padrão T_H1, isto é, IL-2, IL-12 e IFN- γ (pró-inflamatórias), é induzida uma resposta predominante do tipo celular. Ao contrário, quando há predomínio de padrão T_H2, isto é, IL-4, interleucina 5 (IL-5), IL-6, interleucina 9 (IL-9), IL-10, interleucina 13 (IL-13) e TNF- α (anti-inflamatórias), a resposta induzida é preferencialmente humoral⁶¹.

Os macrófagos de defesa são estimulados diretamente pelos LPS a secretar uma variedade ampla de citocinas que inclui, principalmente, o TNF- α e a IL-1, IL-6 e IL-12. Evidências indicam que a secreção excessiva destas citocinas pelos macrófagos de defesa contribui para a falência orgânica e morte que ocorre como uma consequência de sepse por aquelas bactérias⁹².

Neste artigo, nos restringiremos a revisão da IL-6 e IL-12, devido a sua importância na morte bacteriana, bem como a amplitude e complexidade do tema.

INTERLEUCINA 6 (IL-6)

A IL-6 é uma citocina monomérica com 184 aminoácidos e peso molecular de 26kD, sintetizada por vários tipos de células linfóides e não-linfóides, como LT,

LB, fagócitos mononucleares, fibroblastos, queratinócitos, células endoteliais, astrócitos e células mesangiais⁹³. Entretanto, a produção de IL-6 pelos LT requer a presença de monócitos, enquanto monócitos produzem IL-6 na ausência de estímulo aparente em culturas *in vitro*⁹⁴.

A produção de IL-6 em várias células é positivamente ou negativamente regulada por uma variedade de sinais. Nas células do sistema fagocítico mononuclear, a síntese de IL-6 é estimulada pelo LPS, TNF- α e IL-1, e controlada pela produção de fator de crescimento de transformação beta (TGF- β), IL-4 e IL-10⁹⁵. Ao contrário, a IL-6 inibe a produção de TNF- α e IL-1⁹⁶.

A IL-6 é um exemplo típico de uma citocina multifuncional. As suas duas ações mais bem descritas são sobre os hepatócitos e os linfócitos, o que demonstra o seu pleiotropismo. Ao nível dos hepatócitos, a IL-6 faz com que estas células sintetizem diversas proteínas plasmáticas (mais de 40), como o fibrinogênio, a amilóide sérica A e a α_1 -antitripsina, sendo considerada, portanto, como um fator estimulador do hepatócito. Esta citocina é também o mais potente estimulador da síntese hepática da proteína C-reativa, que aumenta a taxa de fagocitose da bactéria, funcionando como um marcador para a detecção do processo inflamatório agudo e crônico^{93,97}. Conjuntamente, estas proteínas são chamadas “proteínas da fase aguda” e estão envolvidas no acúmulo dos macrófagos no local inflamatório e na morte do patógeno microbiano. Portanto, a IL-6 é a principal citocina indutora de resposta de fase aguda em infecções, mediando a síntese de proteínas que exercem papel anti-inflamatório e pró-inflamatório⁹⁸.

Sobre os linfócitos, a IL-6 atua tanto nas células T como nas células B. Nos LT, a citocina é especialmente importante como fator de crescimento nos estágios precoces da diferenciação destas células. Nesta fase, ela reforça o efeito da IL-2 e

promove a diferenciação das células T CD4⁺ em células T_H2, além de ativar as células assassinas naturais (*natural killer* – NK)⁹⁹. Nos LB, a citocina é muito importante no final da seqüência de diferenciação e proliferação destas células⁹³.

Entretanto, o efeito mais destacado está na indução da permanente diferenciação das células B dentro do plasma, promovendo o desenvolvimento de células produtoras de anticorpos. Neste aspecto, a IL-6 estimula com mais freqüência a liberação de IgM, IgG e IgA⁹⁹.

Além dessas atividades, a IL-6 tem um importante papel na diferenciação dos macrófagos⁹⁴.

INTERLEUCINA 12 (IL-12)

A IL-12 é uma citocina com peso molecular de 70kD e, em contraste com as outras citocinas, é a única que em sua estrutura tem duas cadeias polipeptídicas ligadas covalentemente, uma de 35kD (p35) e outra de 40kD (p40), sendo, assim, uma molécula heterodimérica¹⁰⁰.

A subunidade p35 é produzida por muitos tipos de células, incluindo os LT e LB, células NK e monócitos e a cadeia p40 é produzida principalmente por monócitos ativados e LB, de modo que estas são as principais fontes e os maiores produtores da citocina completa¹⁰¹. Nem a subunidade p35 nem a p40 parecem ter atividade biológica isoladamente¹⁰⁰.

A IL-12 foi inicialmente descoberta em 1989 por sua capacidade de estimular a atividade das células NK, e este fato foi responsável pela designação original de “fator estimulador das células NK”¹⁰². Atualmente, sabe-se que os linfócitos citotóxicos (CD8⁺ e células NK) são estimulados potentemente por esta citocina. Nestas células, a

IL-12 media três maiores efeitos: a) indução da produção de citocinas; b) efeito proliferativo e c) melhora da função citotóxica¹⁰³.

Contudo, a função mais importante da IL-12 é estimular a síntese de IFN- γ , o maior ativador do efeito microbicida dos macrófagos¹⁰⁴. Assim, após infecção por algum patógeno intracelular obrigatório, a IL-12 secretada pelos monócitos e o IFN- γ secretado pelas células NK ativadas, podem amplificar a resposta imune inata e ajudar a conter a infecção durante a maturação da resposta de células B e T antígeno-específica¹⁰⁰. Bactérias gram-positivas e negativas, endotoxinas, micobactérias e parasitas intracelulares são todos indutores eficientes da IL-12^{103,105}.

Outra atividade importante da IL-12 é a sua habilidade em promover a diferenciação das células T helper (CD4) a favor do fenótipo T_H1¹⁰¹.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O tratamento cirúrgico da hipertensão porta na criança inclui a esplenectomia, ligadura da veia gástrica esquerda e, mais recentemente, o auto-implante esplênico. A racionalidade deste último procedimento encontra suporte nos numerosos estudos clínicos e experimentais que demonstram a importância do baço na defesa imunológica do organismo e revelam a redução da ocorrência da sepse fulminante pós-esplenectomia.

Atualmente, já se sabe que a iniciação da resposta imune depende da presença de tecido esplênico, em particular do compartimento funcional marginal de células B. Assim, os antígenos administrados por via sanguínea são aprisionados principalmente por macrófagos nas zonas marginais e da polpa vermelha do baço, e depois rapidamente transportados aos folículos linfóides, onde estimulam respostas dos linfócitos B. Nos humanos, o compartimento esplênico da zona marginal não é propriamente desenvolvido durante os dois primeiros anos de vida, o que pode explicar o aumento na susceptibilidade à septicemia na população pediátrica.

Todas estas evidências científicas têm levado os cirurgiões a assumirem uma postura mais conservadora em relação às doenças que atingem este órgão, especialmente quando a esplenectomia total é potencialmente indicada.

Por isso, o objetivo do auto-implante esplênico seria manter a integridade do sistema fagocítico mononuclear presente no baço, que é responsável pela fagocitose e produção de radicais livres derivados ou não do oxigênio e citocinas que, de modo integrado e cooperativo, são capazes de promover resistência à infecção.

ABSTRACT

The spleen is the largest lymphoid organ of the body, and the principal site of the response to antigens from the blood. It has been well established that splenectomy impairs normal immune function by reducing phagocytic activity. In Brazil, one of the most common indications for splenectomy is the portal hypertension due to hepatosplenic mansonic schistosomiasis. However, it's associated with serious complications, in particular, impairment of humoral response to encapsulated bacteria, such as Streptococcus pneumoniae, who is main cause of the overwhelming postsplenectomy infection, observed particularly in children. Autotransplantation of spleen morsels into a pouch of the greater omentum has been done in children with schistosomiasis mansoni. The procedure has been proposed to restore functional splenic tissue when splenectomy total is necessary. This revision had the objective to show the relation between heterotopic spleen autotransplantation and the maintenance of the phagocyte mononuclear system activity. This system is very important on the generation of several free radicals, like reactive oxygen species (superoxide) and nitrogen (oxide nitric), involved in the bacteria killing process, through a metabolic pathway called respiratory burst. Furthermore, the phagocytes cells have a function on the cytokine production, such the interleukin-6 and 12, also necessary to antimicrobial activity. Thus, the interaction between oxidative products and cytokines in the spleen could be decided the immune response intensity.

Key Words: Schistosomiasis; Portal hypertension; Spleen; Splenectomy; Spleen autotransplantation; Phagocyte mononuclear system; Superoxide; Superoxide dismutase; Nitric oxide; Cytokine

REFERÊNCIAS

1. Coura JR, Amaral RS. Epidemiological and control aspects of schistosomiasis in Brazilian endemic areas. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2004; 99 (Suppl 1): 13-19.
2. Katz N, Peixoto SV. Análise crítica da estimativa do número de portadores de esquistossomose mansoni no Brasil. *Rev Soc Bras Med Trop* 2000; 33:303-8.
3. Andrade ZA. Schistosomal hepatopathy. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2004; 99 (Suppl 1): 51-57.
4. Kelner S. Critical evaluation of surgical treatment of schistosomiasis portal hypertension. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1992; 87: 357-68.
5. Raia S, Mies S, Macedo AL. Portal hypertension in schistosomiasis. *Clin Gastroenterol*. 1985; 14: 57-79.
6. Brandt CT, Frei Caneca OA, Tavares DJS, Santos de Azevedo FA, Agra Jr VG, Cordeiro F. Hipertensão portal esquistossomótica na criança: avaliação crítica. *An Fac Med Uni Fed Pernam*. 1995; 40:106-10.
7. Lacerda CM, Freira W, Melo PSV, Carvalho GL, Kirzner CF. Esplenectomia e ligadura da veia gástrica esquerda na esquistossomose mansônica: efeito sobre a pressão das varizes de esôfago aferida por técnica não invasiva. *Rev Col Bras Cir*. 1998; 26: 15-9.
8. Kays MA, Stolar CJH. The spleen and splenectomy: implication for the pediatric population. In: Fkalsrud EW, Krumel TM, editores. *Infectious and immunologic disorders in pediatric surgery*. Philadelphia: W.B Saunders Company; 1993. p. 91-100.
9. Brandt CT, Maciel DT, Santos de Azevedo FA. Esquistossomose hepatoesplênica em crianças: desenvolvimento pondo-estatural após tratamento cirúrgico. *An Fac Med Uni Fed Pernam*. 1995; 40:56-60.

- 10.Brandt CT, Oliveira BS, Nogueira JBM, Neves JR, Lopes TL. Esquistossomose hepatoesplênica em crianças: avaliação morfológica e funcional após esplenectomia e auto-implante esplênico. *Rev Col Bras Cir.* 1998; 25: 399-402.
- 11.Petroianu A, Antunes LJ. Immune profiles in hepatosplenic schistosomiasis mansoni after surgical treatments. *J Int Med Res.* 1998; 26:43-9.
- 12.Alves HJ, Machado CT. Embriologia do baço. In: Petroianu A, editor. *O Baço*. São Paulo: CLR Balieiro Editores; 2003. p.16-22.
- 13.Cooper MJ, Williamson RCN. Splenectomy: indications, hazards and alternatives. *Br J Surg.* 1984; 71:173-180.
- 14.Pabst R. The spleen in lymphocyte migration. *Immunol Today.* 1988; 9:43-5.
- 15.Leemans R, Beekhuis H, Timens W, Hauw The T, Klasen HJ. Fc-receptor function after splenic autotransplantation. *Br J Surg.* 1996; 83:543-6.
- 16.Morris DH, Bullock FD. The importance of the spleen in resistance to infection. *Ann Surg.* 1919; 70:513-21.
- 17.Carlisle HN, Saslaw S. Properdin levels in splenectomized persons. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1959; 102:150-55.
- 18.Najjar VA, Nishioka K. Tuftisin: a psychological stimulating peptide. *Nature.* 1970; 228:672-8.
- 19.Claret I, Morales L, Montaner A. Immunological studies in the postsplenectomy syndrome. *J Ped Surg.* 1975; 10:59-64.
- 20.McCarthy JE, Remond PH, Duggan SM, Watson RW, Condrón CM, Donnel JR, et al. Characterization of the defects in murine macrophage function in the early postsplenectomy period. *J Immunol.* 1995; 155:387-96.

- 21.Brandt CT, Lopes TL, Neves JR, Nogueira JB, Oliveira BS. Esquistossomose hepatoesplênica em crianças: corpúsculo de Howell-Jolly após esplenectomia e esplenose. An Fac Med CCS, UFPE. 1996; 41:103-7.
- 22.Brandt CT, Castro CMMB, Santana EM, Maciel DT, Lopes TL. Esplenose após esplenectomia e auto-implante esplênico em crianças portadoras de hepatoesplenomegalia esquistossomótica e varizes sangrantes de esôfago: atividade da tuftsina. An Fac Med CCS, UFPE. 1998; 43: 37-40.
- 23.Brandt CT, Maciel DT, Caneca OAF, Castro CMMB, Araújo LB. Autotransplant of spleen tissue in children with schistosomiasis: evaluation of splenic function after splenosis. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2001; 96: 117-22.
- 24.Karakantza M, Theodorou GL, Mouzaki A, Theodori E, Vagianos C, Maniatis A. *In vitro* study of the long-term effects of post-traumatic splenectomy on cellular immunity. Scand J Immunol 2004; 59:209-219.
- 25.Zoli G, Corazza GR, D'Amato G, Bartoli R, Baldoni F, Gasbarrini G. Splenic autotransplantation after splenectomy: tuftsin activity correlates with residual splenic function. Br J Surg. 1994; 81:716-718.
- 26.de Ciutiis A, Polley MJ, Metakis LJ, Peterson CM. Immunological defect of the alternative pathway of complement activation postsplenectomy: a possible relation between splenectomy and infection. J Natl Med Assoc. 1978; 70(9):667-70.
- 27.King H, Schumacker HB. Splenic studies. I – Susceptibility to infection after splenectomy performed in infancy. Ann Surg. 1952; 136: 239-42.
- 28.Najjar VA. Tuftsin. a natural activator of phagocytosis: an overview. Ann N Y Acad Sci. 1983; 419:1-11.

29. Diamond LK. Splenectomy in childhood and the hazard of overwhelming infection. *Pediatrics*. 1969; 43: 886-89.
30. Cole JT, Flaum MA. Postsplenectomy infection. *South Med J*. 1992; 85:1220-6.
31. Norris RP, Vergis EN, Yu VL. Overwhelming postsplenectomy infection. *Infect Med*. 1996; 13:779-83.
32. Marques RG, Petroianu. Infecção fulminante pós-esplenectomia. *Arq. Gastroenterol*. 2003; 40(1): 47-54.
33. Singer DB. Postsplenectomy sepsis. *Perspectives in Paediatric Pathology*. 1976; 1:285-311.
34. Jamel N, Refinetti RA, Manso JEF, Coelho ACM, Jamel MJ. Estudo analítico da esplenose intencional na prevenção da sepse pneumocócica. *An Acad Nac Med*. 1999; 159: 20-6.
35. Bridgen ML, Patullo AL. Prevention and management of overwhelming postsplenectomy infection – an update. *Crit Care Med*. 1999; 27:836-42.
36. Davies JM, Barnes R, Milligan D. Update of guidelines for the prevention and treatment of infection in patients with an absent or dysfunctional spleen. *Clin Med*. 2002; 2(5):440-3.
37. Leemans R, Harms G, Rijkers GT, Timens W. Spleen autotransplantation provides restoration of functional splenic lymphoid compartments and improves the hummoral immune response to pneumococcal polysaccharide vaccine. *Clin Exp Immunol*. 1999; 117: 596-604.
38. Resende V, Petroianu A, Junior WCT. Autotransplantation for treatment of severe splenic lesions. *Emerg Radiol*. 2002; 9:208-12.
39. Marques RG, Petroianu A, Coelho JMC, Portela MC. Regeneration of splenic autotransplants. *Ann Hematol*. 2002; 81:622-626.

40. Marques RG, Petroianu A. Distribuição de *Escherichia coli* nos órgãos do sistema fagocítico mononuclear fagocitário após esplenectomia total isolada ou combinada com auto-implante esplênico em rato. Rev Col Bras Cir. 2003; 30(5): 330-336.
41. Patel JM, Williams JS, Shijel B, Hinshaw JR. Preservation of splenic function by autotransplantation of traumatized spleen in man. Surgery. 1981; 90: 683-88.
42. Alvarez SR, Escalante CF, Rituerto DCFL; Fernandez JM. Assesment of postsplenectomy residual splenic function splenic autotransplant. Int Surg. 1987; 72:149-153.
43. Traub A, Giebink GS, Smith C, Kuni C, Brekke ML, Edlund D, et al. Splenic reticuloendothelial function after splenectomy, spleen repair and spleen auto-transplantation. New Engl J Med. 1987; 317:1159-64.
44. Steely WM, Satava RM, Brigham RA, Setser ER, Davies RS. Splenic autotransplantations: determination of the optimum amount required for maximum survival. J Surg Res. 1988; 45: 327-32.
45. Shokouh-Amiri MH, Kharazami A, Rahimi-Saber S, Hansen CP, Jensen SL. Phagocyte function after splenic autotransplantation. Arch Surg 1990; 125:595-7.
46. Bergmann L, Bttcher W, Seufert RM, Mitrou PS. Quantitative and functional restorations and alterations of peripheral lymphocyts in patients with autologous spleen implantation. Arch Orthop Trauma Surg. 1990; 109: 102-5.
47. Rodrigues AZ, Nigro AJT, Paiva ER, Taveres NM. Estudo comparativo da viabilidade de fragmento de tecido esplênico autólogo implantado no omento maior ou na tela subcutânea de ratas. Acta Cir Bras. 1991; 6:64-7.

48. Heuneking K, Muller C, Franke F, Becker H, Schwemmler K. Follow-up of heterotopic autotransplantation of splenic tissue after traumatic splenic rupture in childhood. *Chirurg*. 1994; 65: 457-68.
49. Müller U, Rothlin M. Splenic neoformation following trauma-induced splenectomy – diagnosis and function. *Swiss Surg*. 1995; 5:230-5.
50. Brandt CT, Araújo LB, Castro CMMB. Autotransplantation of spleen tissue in children with mansonic schistosomiasis who underwent splenectomy: evaluation of splenic residual functions. *Acta Cir Bras*. 1998; 13: 212-6.
51. Resende V, Petroianu A. Estudo funcional tardio do auto-implante esplênico após trauma complexo do baço humano. *Rev Col Bras Cir*. 2001; 28:165-70.
52. Petroianu A, Petroianu L. Splenic autotransplantation for treatment of portal hypertension. *J Can Chir*. 2005; 48(5): 382386.
53. Tavassoli M, Ratzan RJ, Crosby WH. Studies on regeneration of heterotopic splenic autotransplants. *Blood*. 1973; 41:701-9.
54. Patel JM, Williams JS, Naim JO, Hinshaw JR. The effect of site and technique of splenic tissue reimplantation on pneumococcal clearance from the blood. *J Ped Surg*. 1986; 2: 877-80.
55. Manley OT, Marine D. The transplantation of splenic tissue into the subcutaneous fascia of the abdomen in rabbits. *J Exp Med*. 1917; 25:619-27.
56. Widmann W, Davidson SJ, Laubscher FA. Effects of splenectomy and splenosis on the blood and platelet count and red cell morphology. *Milit Med*. 1971; 1:15-9.
57. Sipka S, Bráth E, Tóth FF, Aleksza M, Kulcsár A, Fábian A et al. Cellular and serological changes in the peripheral blood of splenectomized and spleen autotransplanted mice. *Transplant Immunology*. 2006; 16:99-104.

58. Zhang H, Chen J, Kaiser GM, Mapudengo O, Zhang J, Exton MS. The value of partial splenic autotransplantation in patients with portal hypertension. *Arch Surg.* 2002; 137: 89-93.
59. Brandt CT, Leite CRC, de-Castro RM, Filho CB, de-Castro FMM, de-Castro CMMB. Avaliação do efeito da esplenectomia e auto-implante esplênico sobre algumas funções de monócitos em crianças com esquistossomose mansônica. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2005, 38 (1):38-42.
60. Petroianu A, Barbosa AJA. Quantitative studies on macrophage phagocytosis in whole spleen and in remnant of subtotal splenectomy. *Med Sci Res.* 1991; 19:373-5.
61. Janeway JR, Travers S, editores. *Imunobiologia – o sistema imunológico na saúde e na doença*, 2 ed. Porto Alegre: Artmed; 1997.
62. Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. *Imunologia celular e molecular*. 2ª ed. Rio de Janeiro: Revinter; 1998.
63. Kelley JL, Rozek MM, Suenram CA, Schwartz CJ. Activation of human blood monocytes by adherence to tissue culture plastic surfaces. *Exp Mol Pathol.* 1987; 46: 266-78.
64. Decker K. Biologically active products of stimulated liver macrophages. *Eur J Biochem.* 1990; 192: 245-61.
65. Holgate ST, Church MK. *Allergy*. Trad Oliveira NG. São Paulo: Manole; 1996. p 7.1-7.7.
66. Karnovsky ML. The biochemical basis of phagocytosis. Metabolic changes during the ingestion of particles by polymorfonuclear leukocytes. *J Biol Chem.* 1959; 234:1355-62.

67. Babior BM. Oxygen-dependent microbial killing by phagocytes. *New Engl J Med*. 1978; 298: 659-68.
68. Babior BM. The respiratory burst of phagocytes. *J Clin Invest*. 1984; 73:599-601.
69. Babior BM, Kipnes RS. Superoxide-forming enzyme from human neutrophils: evidence for a flavin requirement. *Blood*. 1987; 50: 517-24.
70. Hidalgo E, Dimple B. Adaptative responses to oxidative stress: The soxrs and oxyr regulons. In: Lin ECC, Lynch AS. Regulation of gene expression in *Escherichia coli*. Austin: RG Landes Company; 1996. p.433-50.
71. Babior BM. Superoxide: a two-edged sword. *Braz J Med*. 1997; 30: 141-55.
72. Babior BM. Phagocytes and oxidative stress. *Am J Med*. 2000; 109: 33-44.
73. McCord JM, Fridovich I. Superoxide dismutase: an enzyme function for erythrocyte (hemocuprein). *J Biol Chem*. 1969; 244:6049-55.
74. Johnston Jr RB. Measurement of O_2^- secreted by monocytes and macrophages. *Methods in Enzymology*. 1984; 105:365-9.
75. Fridovich I. Superoxide dismutase. An adaptation to a paramagnetic gas. *J Biol Chem*. 1989; 264(14): 7761-64.
76. Marklund SL. Expression of extracellular superoxide dismutase by human cell lines. *Biochem J*. 1990; 266:213-19.
77. Clair DS. Manganese superoxide dismutase: genetic variation and regulation. *J Nutr* 2004; 134: 3190-91.
78. Weiseger RA, Fridovich I. Mitochondrial superoxide dismutase. *J Biol Chem*. 1973; 248(3):4793-96.
79. Raza FS, Okamoto M, Takemori H, Vinson GP. Manganese superoxide dismutase activity in the rat adrenal. *J Endocrinol*. 2005; 184:77-84.

80. Cardoso RMF, Silva CHTP, Araújo APU, Tanaka T, Tanaka M, Garrat RC. Structure of the cytosolic Cu, ZN superoxide dismutase from *Schistosoma mansoni*. Acta Cryst. 2004; D60: 1569-1578.
81. Palmer RMJ, Ferrige G, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. Nature. 1987; 327:524-526.
82. Koshland DE. The molecule of the year. Science. 1992; 258: 1861.
83. Dusse LMS, Vieira LM, Carvalho MG. Revisão sobre óxido nítrico. J Bras Pat Med Laborat. 2003; 39(4): 343-350.
84. Coleman JW. Nitric oxide in immunity and inflammation. Int Immunopharmacol 2001; 1:1397-406.
85. Thomassen MJ, Kavuru MS. Human alveolar macrophages and monocytes as a source and target for nitric oxide. Inter Immunol. 2001; 1:1479-90.
86. James SL, Glaven J. Macrophage cytotoxicity against schistosomula of *Schistosoma mansoni* involves arginine-dependent production of reactive nitrogen intermediates. J Immunol. 1989; 143(12): 4208-12.
87. Robbins RA, Grisham MB. Molecules in focus. Nitric Oxide. Int J Bioche Cell Biol. 1997; 29:857-60.
88. Marletta M, Yoon OS, Iyengar R, Leaf CD, Wishnok J. Macrophage oxidation of L-arginine to nitrite and nitrate: nitric oxide is an intermediate. Biochemistry. 1988; 27:8706-11.
89. Filho RF, Zilberstein B. Óxido nítrico: o simples mensageiro percorrendo a complexidade. Metabolismo, síntese e funções. Rev Ass Med Brasil. 2000; 46(3): 265-71.

90. Nussler AK, Billiar TR. Inflammation, immunoregulation and inducible nitric oxide synthase. *Journ Leucocyte Biol.* 1993; 54:171.
91. van der Veen RC. Nitric oxide and T helper cell immunity. *Inter Immunopharmacol.* 2001; 1:1491-1500.
92. Tracey KJ, Lowry SF. The role of cytokine mediators in septic shock. *Adv Surg.* 1990; 23:21-56.
93. Kishimoto T. The biology of interleukin-6. *Blood.* 1989; 74(1): 1-10
94. Tilg H, Trheu E, Atkins MB, Dinarello CA, Mier JW. Interleukin-6 (IL-6) as an anti-inflammatory cytokine: induction of circulating IL-1 receptor antagonist and soluble tumor necrosis factor receptor p55. *Blood.* 1994; 83:113-118.
95. Musso T, Espinoza-Delgado I, Pulkki K, Gusella GL, Longo DL, Varesio L. Transforming growth factor-beta downregulates interleukin-1 (IL-1)-induced IL-6 production by human monocytes. *Blood.* 1990; 76:2466-69.
96. Papanicolaou DA, Wloder RL, Manolagas SC, Chrousos GP. The pathophysiologic roles of interleukin-6 in human disease. *Ann Int Med* 1998; 128(2):127-37
97. Archararit N, Chuncharunee S, Pornvoranunt A, Atamasrikul K, Rachakom B, Atichartakarn V. Serum protein C-reactive level in postsplenectomized thalassemic patients. *J Med Assoc Thai.* 2000; 83 Suppl 1: 63-9.
98. Kishimoto T, Akira S, Narazaki M, Taga T. Interleukin-6 family of cytokines and gp130. *Blood.* 1995; 86(4): 1243-1254.
99. Keller ET, Wanagat J, Ershler WB. Molecular and cellular biology of interleukin-6 and its receptor. *Frontiers Bioscience.* 1996; 1:340-357
100. Robertson MJ, Ritz J. Interleukin 12: basic biology and potential applications in cancer treatment. *The Oncologist.* 1996; 1:88-97

101. de la Rosa RS, de la Rosa ES, Hernández NR. Interleucina-12 vs enfermedades infecciosas. Rev Cubana Med. 2001; 40(2):118-121.
102. Kobayashi M, Fitz L, Ryan M, Hewick R, Clark SC, Chan S, et al. Identification and purification of natural killer stimulatory factor (NKSF), a cytokine with multiple biologic effects on human lymphocytes. J Exp Med. 1989; 170:827-845.
103. Trinchieri G, Gerosa F. Immunoregulation by interleukin-12. J Leuko Biol. 1996; 59: 505-11.
104. Galvão da Silva AP, Abrahamsohn IA. Interleukin-12 stimulation of lymphoproliferative responses in Trypanosoma cruzi infection. Immunology 2001; 104: 349-54.
105. Trinchieri G. Interleukin-12: a cytokine produced by antigen-presenting cells with immunoregulatory functions in the generation of T-helper cells type 1 and cytotoxic lymphocytes. Blood 1994; 84(12): 4008-27.

ENDEREÇO DO AUTOR

Carlos Roberto Carvalho Leite

Rua Maria Rosa, 441, Apt. 1701, Bloco B, Manaíra

João Pessoa – PB

CEP 58038 – 460

E-mail: leite.carlos@bol.com.br

TABELAS

Tabela 1: Funções do baço

Hematológicas	Imunológicas
Filtração de partículas	Produção de anticorpos
Remoção de inclusões das células vermelhas	Resposta mediada por células
Remodelação de membrana da célula vermelha	Maturação de células linfóides?
Destruição de células vermelhas anormais	Linfopoiese apreciável?
Hemopoiese compensatória	Produção de opsoninas
Armazenamento de ferro e Fator VIII	Produção de properdina e tuftsin

Cooper MJ, Williamson RCN. Br J Surg, 71:173-180, 1984

Tabela 2: Produtos microbicidas dos macrófagos

Classe de mecanismo	Produtos específicos
Produtos tóxicos derivados do O ₂	Superóxido (O ₂ ^{-·}), Peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂), Radical hidroxila (OH [·])
Óxido de nitrogênio tóxico	Óxido nítrico (NO)
Peptídeos antimicrobianos	Defensinas, Proteínas catiônicas
Enzimas	Lisozima, Hidrolases ácidas
Competidores	Lactoferrina

Fonte: Modificado de Janeway Jr, 1997, 2º ed., pag 8:27

FIGURAS

Figura 1: Fragmentos de baço implantados no omento maior

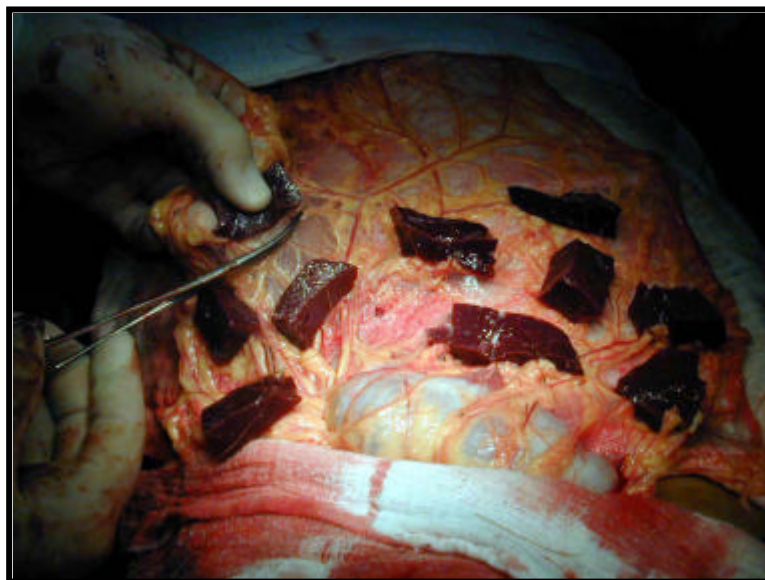


Figura 2: Confecção da bolsa no omento maior

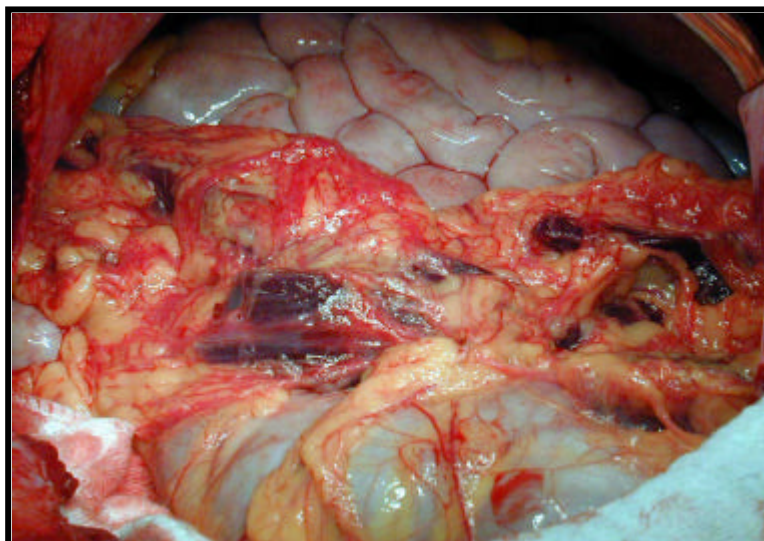


Figura 3: Cintilografia com enxofre coloidal marcado com Tecnécio 99^m , mostrando captação do radiofármaco pelos fragmentos esplênicos implantados no omento maior.

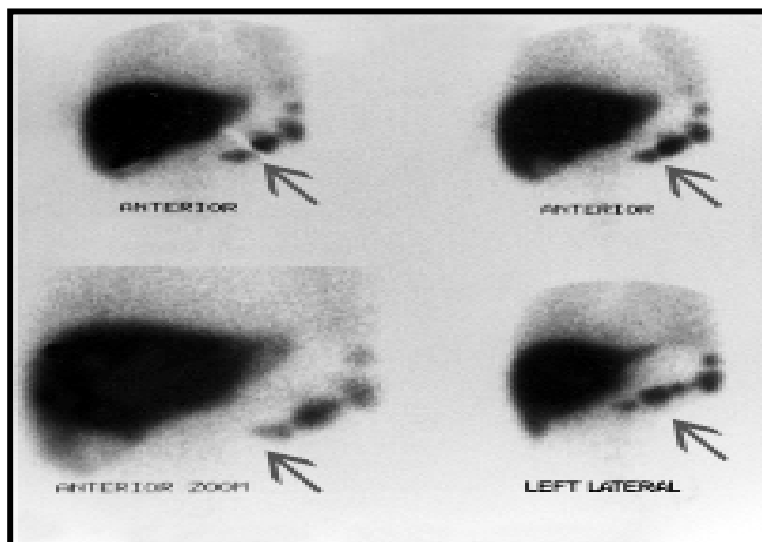


Figura 4: Monócito do sangue periférico



Nitric oxide monocyte production levels in patients with the hepatosplenic form of *Scistosoma mansoni* infection who underwent splenectomy, ligation of the left gastric vein and auto implantation of spleen tissue in the major omentum¹

Níveis de óxido nítrico produzidos por monócitos em portadores de esquistossomose hepatoesplênica que se submeteram a esplenectomia, ligadura da veia gástrica esquerda e auto-implante de tecido esplênico no omento maior

Carlos Teixeira Brandt², Carlos Roberto Carvalho Leite³, Francisco Machado Manhaes-de-Castro⁴, Érika Michelle Correia de Macedo⁴, Rebecca Peixoto Paes Silva⁴, Célia Maria Machado Barbosa de Castro⁵

1. Department of Surgery, Pediatric Surgery Division and Laboratory of Immunology and Pathology Keijo Assami (LIKA), Federal University of Pernambuco (UFPE), Brazil.

2. Full Professor, Ph.D, Head Division of Pediatric Surgery, Health Sciences Center, UFPE, Brazil.

3. Master of Sciences in Surgery, UFPE, Brazil.

4. Medical Student, Scholarship in Research from the Brazilian National Research Council (CNPq), UFPE, Brazil.

5. Associate Professor in Tropical Medicine, Ph.D, Health Sciences Center, UFPE, Brazil.

ABSTRACT

Purpose: To measure the levels of NO production by monocytes in patients with the hepatosplenic form of schistosomiasis mansoni who underwent splenectomy, ligation of the left gastric vein and auto implantation of spleen tissue in the major omentum. **Methods:** Four groups of volunteers were enrolled in the investigation: G1 – 12 patients with *S. mansoni* infection in its hepatosplenic form without any kind of treatment (SMH); G2 – 13 SMH patients who underwent medical treatment and portal hypertension decompression – splenectomy and ligation of the left gastric vein (SMH/SLGV); G3 – 19 patients similar to the later group, but additionally received auto implantation of spleen morsels in the major omentum (SMH/SLGV/AI); and G4 – 15 individuals with no *S. mansoni* infection coming from the same geographical area and presenting similar socio economical status (CG). Nitrite production by monocytes was determined by a standard Griess reaction adapted to microplates. The results were presented by mean $\pm$ SD for each group. Significant differences in NO production by monocytes were determined by Tukey-Kramer multicomparisons test. Probability values of 0.05 were considered significant. **Results:** Patients from G1 (SMH) showed lower level of NO production by monocytes ($5.28 \pm 1.28 \mu\text{mol/ml}$). Patients from G2 (SMH/SLGV) showed similar results ($6.67 \pm 0.44 \mu\text{mol/ml}$ – $q = 2.681$ $p > 0.05$). Individuals of G4 (CG) showed higher level of NO production by monocytes ($8.19 \pm 2.74 \mu\text{mol/ml}$). Patients from G3 (SMH/SLGV/AI) showed similar NO production by PBMC as compared to individuals of G4 (CG) – ($7.41 \pm 1.65 \mu\text{mol/ml}$ – $q = 1.615$ $p > 0.05$). The volunteers from G4 (CG) and G3 (SMH/SLGV/AI) showed significantly greater levels of NO production by monocytes as compared to those from G1 (SMH) – ($q = 5.837$ $p < 0.01$, and $q = 4.285$ $p < 0.05$). **Conclusion:** Collectively, the results point to a restoration of NO normal production by monocytes in SHM patients who underwent medical and surgical treatments, especially in those who had received auto implantation of spleen tissue in the major omentum after splenectomy and ligation of the left gastric vein. The data gives further support to the hypothesis that this additional procedure is important in the restoration of the immune response of these patients, since NO synthesis by the monocytes correlates with protective immunity against infection; thus, protecting them against overwhelming post splenectomy infection.

Key words: Schistosomiasis. Splenectomy. Nitric, Oxide.

RESUMO

Objetivo: Mensurar os níveis de produção de ON por monócitos do sangue periférico (MSP) em portadores de esquistossomose na forma hepatoesplênica que tinham se submetido a esplenectomia, ligadura da veia gástrica esquerda e auto-implante de tecido esplênico no omento maior. **Métodos:** Quatro grupos de voluntários foram envolvidos na investigação: G1 – 12 portadores de esquistossomose hepatoesplênica sem nenhuma forma de tratamento (EHE); G2 – 13 portadores de EHE que receberam tratamento clínico e se submeteram cirurgia para descompressão do sistema porta – esplenectomia e ligadura da veia gástrica esquerda (EHE/ELGE); G3 – 19 pacientes similares ao do último grupo, mas que receberam também auto-implante de fragmentos de tecido esplênico no omento maior (EHE/ELGE/AI); e G4 – 15 indivíduos sem infecção pelo *S. mansoni* advindos da mesma área geográfica e apresentando as mesmas condições sócio-econômicas (GC). A produção de ON pelos MSP foi determinada pela reação padrão de Griess, adaptada para poços em microplaca. Os resultados foram expressos por suas médias $\pm$ DP para cada grupo. Diferenças significantes nas medias de produção de ON pelos MSP foram determinadas pelo teste de comparações múltiplas de Tukey-Kramer. Foram aceito os limites de

* Artigo publicado na Revista “Acta Cirúrgica Brasileira – Sept-Oct; Vol 21 (5), 2006”. Disponível na página do Scielo (<http://www.scielo.br/acb>).

Brandt CT et al

significância de $p < 0,05$. **Resultados:** Os pacientes portadores de EHE não tratados (G1) evidenciaram os níveis mais baixos de produção de ON pelos MSP ($5,28 \pm 1,28 \mu\text{mol/ml}$). Os pacientes do G2 (EHE/ELGE) evidenciaram resultados similares ($6,67 \pm 0,44 \mu\text{mol/ml}$ – $q = 2,681$ $p > 0,05$). Os indivíduos do G4 (GC) evidenciaram os mais altos níveis de produção de ON pelos MSP ($8,19 \pm 2,74 \mu\text{mol/ml}$). Os pacientes do G3 (EHE/ELGE/AI) evidenciaram produção de ON produzido pelos MSP similares aos indivíduos do G4 (GC) – ($7,41 \pm 1,65 \mu\text{mol/ml}$ – $q = 1,615$ $p > 0,05$). Os voluntários do G4 (GC) e os do G3 (EHE/ELGE/AI) evidenciaram de forma significativa maiores níveis de produção de ON pelos MSP quando comparados com os voluntários daquele do G1 (EHE) – ($q = 5,837$ $p < 0,01$, e $q = 4,285$ $p < 0,05$). **Conclusão:** De forma coletiva, os resultados apontam para o restabelecimento da normalidade da produção de ON pelos MSP dos portadores de EHE que receberam tratamento clínico e se submeteram ao tratamento cirúrgico, especialmente, aqueles que receberam auto-implante de fragmentos de tecido esplênico no omento maior após esplenectomia e ligadura da veia gástrica esquerda. Os dados dão suporte adicional à hipótese de que esse procedimento adicional é importante no restabelecimento da resposta imune desses pacientes, desde que a síntese de ON pelos MSP se correlaciona com a imunidade protetora contra infecção; dessa forma, protegendo-os contra infecção disseminada após esplenectomia.

Descritores: Esquistossomose. Esplenectomia. Óxido Nítrico.

Introduction

Schistosomiasis is a millenary disease, which affects more than 200 million individuals distributed in 76 countries in Africa, Asia or America. Among these, 10% present the severe form of disease and 50 to 60% of infected people (more than 100 million) present clinical manifestation of the disease, constituting a huge public health problem¹. In Brazil, the Schistosomiasis Control Program has been very successful in reducing infection prevalence but did not interrupt transmission, nor reduced prevalence rate to less than 5%. In the Northeastern region of Brazil occurs the greatest prevalence¹. The reduction of morbid-mortality of this infection results from massive use of chemotherapy and pre-symptomatic treatment². As regard to schistosomiasis infection in Pernambuco State – Northeast Brazil, a spatial analysis reveals that although from 1995 to 1999 there was a spread of schistosomiasis due to this condition in the municipalities (counties) of “Sertão” (backlands or countryside) and São Francisco river valley, the number of municipalities with hospitalizations due to schistosomiasis decreased from 1995 to 1998, followed by an increase in 1999 and 2000³. In this State the surgical treatment for the portal hypertension in the hepatosplenic form includes splenectomy and ligation of the left gastric vein⁴; in children, auto-implantation of spleen tissue in the major omentum is used⁵. The risk of severe infection is an important health problem in splenectomized patients, greater in children, but still present in adults with the overall rate of 7.0 per 100 persons-years (95% confidence interval, 6.30 – 7.78)⁶. The immune protective effects of the splenosis after spleen tissue auto-implantation in children with mansoni schistosomiasis who underwent splenectomy has been studied, but although several studies^{7,8} have given support to the concept that the maintenance of residual immune function after auto-implantation of spleen tissue is beneficial against overwhelming postoperative severe infection, the subject is still matter of controversy when the monocytes of these patients are submitted to stress⁹. The fundamental initiating factor in portal hypertension of patients with mansoni schistosomiasis is an increase in resistance to portal venous flow. Portal venous pressure rises as a consequence, and collateral channels open to decompress the portal venous system. A number of secondary haemodynamic phenomena occurs with portal hypertension. Systemic vascular resistance and mean arterial blood pressure fall and both cardiac vascular output and splenic blood flow increase. Current theories

suggest that increased vascular production of nitric oxide (NO) may have a principal role in the pathogenesis of these secondary haemodynamic changes⁹. NO production is also known to increase following the deposition of parasite eggs in the liver during the infection with *Schistosoma mansoni* in mice and results in liver cell death. In these animals increased NO production by cultured spleen cells correlated tightly with increased disease severity suggesting a deleterious role for this molecule. Defining the role of NO during schistosomiasis disease has become particularly relevant in light of recent findings showing that peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from infected patients are capable of in vitro NO production following exposure to *S. mansoni* antigen¹⁰. It has been observed that the absence of NO during acute schistosomiasis leads to increased hepatic damage characterized by hepatocyte apoptosis and increased hepatocellular enzyme release¹¹. These findings are supportive of the proposed protective role for NO in preventing hepatocyte damage induced by TNF- α and oxygen radicals¹². On the other hand, NO seems to be pivotal in the regulation of granulomatous responses to liver involvement of the *S. mansoni* infection^{13,14}. As regard to overwhelming infection NO is believed to play a key role in the pathogenesis of septic shock, although many aspects of the involvement of NO remain poorly defined. The altered circulating nitrite/nitrate – the stable byproducts of NO observed in septic patients – combined with the reduction in vascular tone seen after endotoxin or proinflammatory cytokine administration, and the identification of endothelium-derived relaxing factor (EDRF) as NO^{15,16} led to the suggestion that NO is involved in the cardiovascular alterations of septic shock¹⁷. The purpose of the present investigation was to evaluate the levels of nitric oxide produced by cultured monocytes of patients suffering from the hepatosplenic form of schistosomiasis mansoni in adolescents and young adults, who underwent splenectomy, ligation of the left gastric vein and auto-implantation of spleen morsels in the major omentum.

Methods

The study was prospective and performed at the Department of Surgery (Pediatric Surgery Division) and Laboratory of Immunology Keijo Assami (LIKA) – Federal University of Pernambuco (UFPE).

Nitric oxide monocyte production levels in patients with the hepatosplenic form of *Scistosoma mansoni* infection

Patients

G1 – 12 patients with *S. mansoni* infection in its hepatosplenic form without any kind of treatment (SMH). Ten were females and two males. Ages varied from 10 to 30 years (Mean = 20.0 ± 2.1 years). All patients came from endemic area for *S. mansoni*. Kato-Katz was positive in each patient (Group with active disease).

G2 – 13 SMH patients, similar to G1, but presented upper digestive bleeding. Nine were females and four were males. Ages varied from 18 to 30 years (Mean = 24.6 ± 3.4 years). They underwent medical treatment and portal hypertension decompression – splenectomy and ligation of the left gastric vein (Reference Group - SMH/SLGV).

G3 – 19 patients clinically similar to the ones in G2. Thirteen were females and six were males. Ages varied from 16 to 25 years (Mean = 20.2 ± 3.6 years). All of them received pre-operative medical treatment with a single dose of oxaminiquine 20mg/Kg. They underwent splenectomy, ligation of the left gastric vein and auto-implantation of ten slices of spleen tissue, without the capsule, into an omental pouch in the major omentum. The measurements and weights of the implanted slices were approximately: $3 \times 2 \times 2$ cm and 10 g each. In this regard all patients in this group presented satisfactory splenosis as assessed by nuclear medicine (Study Group - SMH/SLGV/AI). Patients presenting recurrent upper digestive hemorrhage in the follow-up were included in the protocol for endoscopic sclerosis of esophageal varices. The patients of this group underwent colonoscopy every year in the postoperative follow-up, which average in this group is seven years, for continuous observation of the colopathy, and also for assessing residual infection of *S. mansoni* by the quantitative egg count in a routine three submucosal colon biopsies. Five patients (26.3%) with positive viable eggs received a second medical treatment with praziquantel in a single dose of 30mg/Kg. Laboratory investigation in this group included liver function tests for assessing hepatic functional reserve. Before medical and surgical treatment 14 (73.7%) patients were classified as Child-Pugh A and 5 (26.3%) were Child-Pugh B. In the last post-operative follow-up evaluation 17 (89.5%) patients were Child-Pugh A and 2 (10.5%) were Child-Pugh B.

G4 – 15 individuals without *S. mansoni* infection. They lived in the same geographical area, and presenting similar

socio economical status of patients enrolled in groups G1, G2 and G3. Eight were females and seven were males. Ages varied from 15 to 28 years (Mean = 19.3 ± 4.3 years) - (Control Group - CG). All patients were cared for at the University Hospital (Hospital das Clínicas), Federal University of Pernambuco, Brazil.

Obtaining monocytes from the mononuclear cells of peripheral blood (PBMC): 15-mL samples of whole blood were aseptically collected by peripheral venous puncture in a vacutainer tube with EDTA. Next, after being placed in 50-mL Ficoll tubes (Talpiot Industrial, Israel) with a phosphate buffer (PBS – 0.01 M) to reach a volume of 45 mL, the samples were centrifuged for 30 minutes (1200 rpm, 2° to 8° C). The aspirated plasmas and layers of PBMC were then collected and transferred to 50-mL sterile centrifuge tubes (Corning Incorporated, USA), to reach a volume of 45 mL once again with PBS (0.01 M). Two further lavages were performed and the precipitates resuspended in 2 mL RPMI 1640 culture medium, supplemented with 3% bovine fetal serum, 100U/mL of penicillin and 100 mg/mL of streptomycin. Next, PBMC were counted in a Neubauer chamber. The cell concentrations were adjusted to 1.0×10^6 cells in 1 mL of culture medium. After being placed on plates, 1 mL was dispensed from the suspension (1.0×10^6 cells for 1 mL of RPMI 1640) in each well and transferred to a sterilizer in a humid environment at 37° with 5% of CO₂ for 1 hour. Next, following lavages performed with RPMI 1640 to remove nonadherent cells, the plates were left in the sterilizer for another 60 minutes. From then on the method for quantification of the NO by the cells in culture was followed.

Nitrite quantification: Monocytes were treated with activating agent (LPS – 10mg/mL for 24 hours) in 96-well plates. NO₂⁻ concentration in culture supernatants was measured to assess NO production. Fifty µl of sample aliquots were mixed with 50µl of Griess reagent (1% sulfanilamide/0.1% naphthylethylenediamine dihydrochloride/2% phosphoric acid) in 96-well plate and incubated at 25° C for 10 min. The absorbance at 550nm was measured on a microplate reader. NaNO₂ was used as the standard to calculate NO₂⁻ concentrations.

Results

The mean levels of nitric oxide (NO) produced by cultured monocytes of patients and control individuals are expressed in Table 1.

TABLE 1 - Mean levels of NO produced by monocytes (µmol/ml) of the four groups.

Groups: SMH; SMH/SLGV; SMH/SLGV/AI; and CG	Mean $\pm$ SD µmol/ml
Carriers of hepatosplenic schistosomiasis mansoni (SMH)	5.3 ± 1.3
Splenectomized patients (SMH/SLGV)	6.7 ± 0.4
Spleen tissue auto implanted patients (SMH/SLGV/AI)	7.4 ± 1.6
Control group (CG)	8.2 ± 2.7

Tukey-Kramer multiple comparisons test

Brandt CT et al

Comparison	Mean Difference	q	P value
CG vs SMH/SLGV/AI	0.77	1.615	P > 0.05
CG vs SMH/SLGV	1.52	3.055	P > 0.05
CG vs SMH	2.90	5.837	P < 0.01
SMH/SLGV/AI vs SMH/SLGV	0.75	1.503	P > 0.05
SMH/SLGV/AI vs SMH	2.13	4.285	P < 0.05
SMH/SLGV vs SMH	1.38	2.681	P > 0.05

Discussion

Is it possible to control *S. mansoni* infection? There are several actions that combined could be adopted in the attempt of controlling schistosomiasis mansoni in Brazil. Among them: 1 – intermediary host control through molluscicides or biological methods; 2 – improvement of basic sanitation conditions and water potable supply; 3 – sanitary education for exposed population; 4 – individual or massive treatment of people in areas of high prevalence; 5 – individual protection against penetration of cercariae; 6 – vaccine for exposed people, if there is an efficient one². The hurdles to overcome these actions are: 1 – intermediary hosts' control large dissemination and their escape mechanisms from molluscicides and from biological control, besides high costs and low efficacy; 2 – high costs associated with the implementation of sanitary conditions and water supply, and intense contact of rural population with polluted water, outside dwellings, in particular, in agricultural and fishing activities or other eventual activity; 3 – the long time needed for sanitary education and for community to adhere to controlling programs; 4 – individual or massive treatment has been shown efficient for controlling the morbidity, but not for reducing prevalence due to reinfections; 5 – until the present days, there is not an effective vaccine for preventing schistosomiasis². However, although these considerations are true, the main reason is the lack of political determination for bridging the huge social economic gap among social extracts of the Brazilian population. It must be stressed that all volunteers of the four groups included in this research lives in rural area, come from low income social extract and present low level of education. Basic education for all people, especially for the low income population, would be the starting point for solving this important social health problem in some states of Brazil, including Pernambuco³. Better economic distribution would follow. These basic steps would be important to control this world neglected disease, prevalent in several countries including Brazil¹. The knowledge about the downstream effector cells that regulate inflammatory responses and how their functional activity is controlled by the immune response may reveal new and/or improved approaches for disease intervention in general¹⁸. NO is implicated as an integral component of the host armament against invading parasites. In case of *S. mansoni* infection NO plays a role in regulating of egg-induced inflammation, preventing liver hepatic cell

death and widespread tissue damage. However, in spite of this important role NO production requires tight control to limit cytotoxic damage to the host's own cells. Unregulated production may lead to a variety of damaging effects, including alterations to neurological functions¹⁹. In NO synthase-2 (NOS-2) deficient mice sensitized with *S. mansoni* eggs/IL-12 not only fail to control their egg-induced inflammatory response, but actually display a marked exacerbation in the reaction despite developing a Th1-deviated response¹⁸. NOS-2 remained the dominant although not exclusive, response in mice infected by *S. mansoni*¹⁸. For example, when NOS-2 is induced in mice sensitized with *S. mansoni* eggs and IL-12, the animals develop smaller and much less fibrotic granulomas when subsequently infected¹⁹. There is a beneficial role for NOS-2 in the regulation of liver inflammation regarding *S. mansoni* infection, suggesting that the ultimate success of Th2-to-Th1 immune deviation strategies of the host will rely on the efficient activation of NOS-2 expression in downstream effector cells¹⁹. It is important to stress that some eggs laid by adults *S. mansoni* pairs are trapped in the liver, a process that can lead to marked inflammation, tissue eosinophilia, collagen deposition, and ultimately portal hypertension and severe hepatic fibrosis in some patients¹⁸. Nitric oxide levels can up or down regulate the liver inflammatory process and produce immune deviation, specially considering that the treated patients persists living in the same environment and are at risk of suffering a new infection (reinfection). In this regard, it is important that the mean NO levels by monocytes of the study group (SMH/SLGV/AI) was similar to that of the control group (CG). NO, a molecule produced by numerous cell types including monocytes, is implicated in a wide range of disease processes, exerting both detrimental and beneficial effects at the cellular and vascular levels. Sepsis is one area where NO is thought to play a key role in pathogenesis. Importantly, most NO research has been conducted on animal models. In attempting to understand the complexities of NO in sepsis and interpret the many apparently conflicting results available. The situation can vary according to the species being studied, the model of sepsis employed, and the concentrations of NO involved. Also, the timing of measurements and observations may vary according to the type of receptor blockade employed²⁰. The pathogenic role of NO in overwhelming infection and septic shock can, in fact,

Nitric oxide monocyte production levels in patients with the hepatosplenic form of *Scistosoma mansoni* infection

encompass both vascular alterations and the direct cellular toxic effects of NO or NO-related compounds. At high concentrations, NO becomes a potential proinflammatory and cytotoxic factor by reacting with O_2 to form the toxic product, peroxynitrite, and may cause tissue damage. In several experimental models, endotoxin has been shown to increase the constitutive release of NO by the endothelium and the activity of the nitric oxide synthase isoforms (iNOS) enzyme²⁰. Mice lacking iNOS have been reported to be resistant to endotoxin-induced mortality²¹ and vascular hypocontractility²², supporting a key role for iNOS in endotoxin shock. In addition to endotoxin, cell wall components and enterotoxin from gram-positive organisms are also able to stimulate NO release²⁰. Considering that patients suffering from different diseases who underwent splenectomy are at risk of overwhelming post splenectomy severe infection⁶ it is important to consider that patient carriers of hepatosplenic schistosomiasis mansoni who undergo this surgical procedure for decompressing the portal pressure should remain with residual spleen tissue; this is specially true for children. We have shown that several functions of monocytes in patients from the study group remain similar to those from control individuals without *S. mansoni* infection^{5,7,8}. It may be important to consider that these patients, at long term follow-up are also presenting improvement in the liver function, this is again true even for those who persisted with residual infection, and have received a second medical treatment with praziquantel²³. It is well known that good hepatic functional reserve is important in providing immune response to infection. The patient carriers of the chronic hepatosplenic form of schistosomiasis mansoni presented the lower levels of NO production by monocytes. This has been observed in some parasite disease, including schistosomiasis. Usually the NO levels are high in the acute phase of the disease and decreases in the chronic stage²⁴. On the other hand, the patients from the study group presented with no different mean level of NO production by monocytes when it is compared with that of the individuals from the control group. There is no available information that maintaining splenic residual function by providing splenosis after splenectomy is associated to NO production by monocytes. However, while the mean level of the NO production by monocytes from patients of the study group was significant greater ($q = 4.285$ $p < 0.05$) than the one of patients with hepatosplenic schistosomiasis mansoni; this did not happen when the mean results of the solely splenectomized patients were compared with that of the later patients ($q = 2.681$ $p > 0.05$).

Conclusion

Collectively, the results point to a restoration of NO normal production by monocytes in SHM patients who underwent medical and surgical treatments, especially in those who had received auto implantation of spleen tissue in the major omentum after splenectomy and ligation of the left gastric vein. The data gives further support to the hypothesis that this additional procedure

is important in the restoration of the immune response of these patients, since NO synthesis by the monocytes correlates with protective immunity against infection; thus, protecting them against overwhelming post splenectomy infection.

References

1. WHO – World Health Organization. The Control of Schistosomiasis. Technical Report Series; 1993.
2. Coura JR, Amaral RS. Epidemiological and control aspects of schistosomiasis in Brazilian endemic areas. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2004; 99: 13-9.
3. Resendes APC, Souza-Santos R, Barbosa CS. Internação hospitalar e mortalidade por esquistossomose mansônica no Estado de Pernambuco, Brasil, 1992/2000. Cad Saúde Pública. 2005; 21: 1392-401.
4. Ferraz AAB, Lopes EPA, Barros FMR, Sette MJA, Arruda SMB, Ferraz EM. Esplenectomia com ligadura da veia gástrica esquerda e desvascularização da grande curvatura do estômago no tratamento da esquistossomose hepatoesplênica. É necessária a escleroterapia endoscópica pós-operatória? Arq Gastroenterol. 2001; 38: 84-8.
5. Brandt CT, Maciel DT, Frei Caneca AO, Castro CMMB, Araújo LB. Autotransplant of spleen tissue in children with schistosomiasis: evaluation of splenic function after splenosis. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2001; 96: 117-21.
6. Kyaw MH, Holmes EM, Toolis F, Wayne B, Chalmers J, Jones IG, Campbell H. Evaluation of severe infection and survival after splenectomy. Am J Med. 2006; 119: 1-7.
7. Brandt CT, Leite CRC, Castro RM, Brandt Filho C, Castro FMM, Castro CMMB. Aderência e atividade microbiana de monócitos em portadores de esquistossomose mansônica na forma hepatoesplênica cirúrgica. Acta Cir Bras. 2003; 18: 143-53.
8. Brandt CT, Leite CRC, Castro RM, Brandt Filho C, Castro FMM, Castro CMMB. Avaliação do efeito da esplenectomia e auto-implante esplênico sobre algumas funções de monócitos em crianças com esquistossomose mansônica. Rev Soc Bras Trop. 2005; 38: 38-42.
9. McCormick PA. Pathophysiology and prognosis of oesophageal varices. Scand J Gastroenterol. 1994; 207: 1-4.
10. Oliveira DM, Silva-Teixeira DN, Carmo AS, Góes AM. Role of nitric oxide on human schistosomiasis mansoni: upregulation of in vitro granuloma formation by N – nitro-L-arginine methyl ester. Nitric Oxide Biol Chem. 1998; 2: 57.
11. Brunet LR, Beal M, Dunne DW, Pearce EJ. Nitric oxide and Th2 response combine to prevent severe hepatic damage during *Schistosoma mansoni* infection. J Immunol. 1999; 163: 4976-84.
12. Brunet LR. Nitric oxide in parasitic infection. Int Immunopharmacol. 2001; 1: 1457-67.
13. Neves SM, Rezende SA, Góes AM. Nitric oxide-mediated immune complex-induced prostaglandin E(2) production by peripheral blood mononuclear cells of human infected with *Schistosoma mansoni*. Cell Immunol. 1999; 195: 37-42.

Brandt CT et al

14. Oliveira DM, Silva-Teixeira DN, Gustavson S, Oliveira SM, Goes AM. Nitric oxide interaction with IL-10, MIP-1alpha, MCP-1 and RANTES over the in vitro granuloma formation against different *Schistosoma mansoni* antigenic preparations on human schistosomiasis. *Parasitology*. 2000; 120: 391-8.
15. Clancy RM, Leszczynska-Piziak J, Abramson SB. Nitric oxide, an endothelial cell relaxation factor, inhibits neutrophil superoxide anion production via a direct action on the NADPH oxidase. *J Clin Invest*. 1992; 90: 1116-121.
16. Panas D, Khadour Szabo FH, Szabo C, Schulz R. Proinflammatory cytokines depress cardiac efficiency by a nitric oxide-dependent mechanism. *Am J Physiol*. 1998; 275:H1016-123.
17. Chandra A, Enkhbaatar P, Nakano Y, Traber LD, Traber DL. Sepsis: emerging role of nitric oxide and selectins. *Clinics*. 2006; 61: 71-6.
18. Hesse M, Modolell M, La Flamme AC, Schito M, Fuentes JM, Cheever AW, Pearce EJ, Wynn TA. Differential regulation of nitric oxide synthase-2 and arginase1 by type 1/type 2 cytokines in vivo: Granulomatous pathology is shaped by the pattern of L-arginine metabolism. *J Immunol*. 2001; 167: 6533-44.
19. Hesse M, Cheever AW, Jankovic D, Wynn TA. NOS-2 mediates the protective anti-inflammatory and antifibrotic effects of the Th-1-inducing adjuvant, IL-12, in a Th2 model of granulomatous disease. *Am J Pathol*. 2000; 157: 945-55.
20. Graier WF, Myers PR, Rubin LJ, Adams HR, Parker JL. *Escherichia coli* endotoxin inhibits agonist-mediated cytosolic Ca^{2+} mobilization and nitric oxide biosynthesis in cultured endothelial cells. *Circ Res*. 1994; 75: 659-68.
21. Wei XQ, Charles IG, Smith A, Ure J, Feng GJ, Huang FP, et al. Altered immune responses in mice lacking inducible nitric oxide synthase. *Nature*. 1995; 375: 408-11.
22. Gunneth CA, Chu Y, Heistad DD, Loibl A, Faraci FM. Vascular effects of LPS in mice deficient in expression of the gene for inducible nitric oxide synthase. *Am J Physiol*. 1998; 275: H416-21.
23. Brandt CT, Braga MVM, Melo KL. Surgical hepatosplenic mansonic schistosomiasis in adolescents: repercussions of the post-treatment schistosomotic burden on the hepatic functional reserve. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 2001; 96: 113-5.
24. Abo-Shousha S, Khalil SS, Rashwan EA. Oxygen free radical and nitric oxide production in single or combined human schistosomiasis and fascioliasis. *J Egypt Soc Parasitol*. 1999; 29: 149-56.

Correspondence:

Carlos Teixeira Brandt
Avenida Boa Viagem, 5090/1201
51011-000 Recife - PE Brazil
carlosbrandt@bol.com.br

Conflict of interest: none
Financial source: none

Received: April 02, 2006
Review: May 11, 2006
Accepted: June 17, 2006

How to cite this article:

Brandt CT, Leite CRC, Manhaes-de-Castro FM, Macedo EMC, Silva RPP, Castro CMMB. Nitric oxide monocyte production levels in patients with the hepatosplenic form of *Schistosoma mansoni* infection who underwent splenectomy, ligation of the left gastric vein and auto implantation of spleen tissue in the major omentum. *Acta Cir Bras*. [serial on the Internet] 2006 Sept-Oct; 21(5). Available from URL: <http://www.scielo.br/acb>.

Níveis de superóxido dismutase produzidos por monócitos em portadores de esquistossomose na forma hepatoesplênica submetidos à esplenectomia, ligadura da veia gástrica esquerda e auto-implante de tecido esplênico no omento maior.

Superoxide dismutase monocyte production levels in patients with the hepatosplenic form of *Schistosoma mansoni* infection underwent to splenectomy, ligature of the left gastric vein and auto implantation of spleen tissue in the major omentum.

Carlos Teixeira Brandt¹; Carlos Roberto Carvalho Leite ²; Francisco Machado Manhães-de-Castro³; Érika Michelle Correia de Macedo⁴; Rebecca Peixoto Paes Silva⁵; Célia Maria Machado Barbosa de Castro⁶.

¹ Prof. Titular de Clínica Pediátrica Cirúrgica, CCS, UFPE

² Professor Assistente, Departamento de Cirurgia, CCS, Universidade Federal da Paraíba (UFPB), Mestre e Doutorando em Cirurgia, UFPE

³ Bolsista de Iniciação Científica - CNPq

⁴ Prof. Adjunto em Medicina Tropical, CCS, UFPE

Trabalho realizado no Hospital das Clínicas e no Laboratório de Imunopatologia Keiso Azami (LIKA) – UFPE

* Artigo **aceito para publicação** na *Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões*. Trabalho apresentado, isoladamente, como comunicação oral, no *I Encontro de Pós-Graduação do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba (UFPB)*, em 01 de dezembro de 2006, premiado com “**Menção Honrosa**” (Anexo II).

RESUMO

Objetivo: Superóxido dismutase (SOD) é uma enzima que catalisa o desdobramento do superóxido em peróxido de hidrogênio, uma importante etapa do stress oxidativo. O objetivo deste estudo foi avaliar a atividade funcional das células mononucleares do sangue periférico (PBMC), através da análise da atividade da enzima SOD de pacientes com esquistossomose mansônica, na forma hepatoesplênica (EHE), submetidos à esplenectomia e ligadura da veia gástrica esquerda (ELGE) associada ao auto-implante esplênico em bolsa no omento maior.

Método: A atividade da SOD foi determinada no sobrenadante das PBMC e mensurada pela diferença entre a redução do citocromo c pelo superóxido, gerado pelo sistema xantina/xantina oxidase, e a inibição desta redução pela SOD purificada. Os níveis de SOD foram expressos em uSOD/mg de proteína. Foram constituídos quatro grupos: G1 – 12 portadores de EHE sem tratamento; G2 – 13 portadores de EHE submetidos à ELGE (EHE/ELGE); G3 – 19 pacientes similares a G2, mas que receberam também auto-implante de tecido esplênico no omento maior (EHE/ELGE/AI); e G4 - 15 indivíduos sadios (GC). **Resultados:** A atividade da SOD foi significativamente maior no G1 ($9,2 \pm 3,8$) e G2 ($8,5 \pm 3,2$), em comparação com os indivíduos do G4 ($5,1 \pm 2,1$). Ao contrário, os níveis de SOD foram semelhantes entre os pacientes do G3 ($7,3 \pm 3,1$) e G4 ($q=2,954$ $p>0,05$). **Conclusão:** Os resultados emprestam suporte adicional à hipótese de que o tratamento clínico e a ELGE associada ao auto-implante esplênico, em portadores jovens de EHE, mantém os níveis da enzima SOD, ajudando a manter a integridade do sistema fagocítico mononuclear.

DESCRITORES: Esquistossomose; Hipertensão porta; Esplenectomia; Auto-implante esplênico; Monócito; Superóxido dismutase.

INTRODUÇÃO

De acordo com a Organização Mundial da Saúde, a esquistossomose afeta mais de 200 milhões de pessoas no mundo, distribuídas em 76 países na África, Ásia e Américas¹. Entre estas, 10% apresentam a forma grave da doença, representando assim um importante problema de saúde pública².

A prevalência média da esquistossomose mansônica no Brasil se situa em torno de 8% de sua população e o número estimado de portadores foi calculado em, aproximadamente, 8,3 milhões em 1997^{3,4}.

No Brasil, tem-se obtido sucesso na redução das formas graves da doença com o uso maciço de drogas como a oxaminiquine e o praziquantel. Entretanto, não se obteve ainda êxito na interrupção da transmissão e nem houve redução da prevalência a um nível inferior a 5%, motivada pelas reinfecções².

O Nordeste é a região onde se concentram as maiores prevalências da esquistossomose mansônica². No Estado de Pernambuco, uma recente análise geográfica temporal revelou um aumento do número de regiões onde a doença foi diagnosticada, incluindo a região metropolitana do Recife e municípios do Sertão e do vale do São Francisco⁵. Nesse estado, o tratamento cirúrgico da hipertensão porta de causa esquistossomótica inclui a esplenectomia e a ligadura da veia gástrica esquerda⁶.

Entretanto, embora a esplenectomia tenha o benefício de corrigir o hiperesplenismo e melhorar o desenvolvimento pômdero-estatural nas crianças, pode determinar uma série de complicações hematológicas e imunológicas, em virtude da perda da função de proteção do baço na imunidade⁷. Entre as alterações imunológicas, destacam-se a redução da capacidade fagocítica e a diminuição dos níveis de imunoglobulina M, properdina e tuftsina. Esta última partícula é um

tetrapeptídeo que estimula a fagocitose por ativação direta dos leucócitos e que se encontra na fração gamaglobulínica das imunoglobulinas, admitindo-se que seja produzida no baço^{8,9,10}

Tardiamente, a complicação mais temível após a remoção do baço é a sepse fulminante pós-esplenectomia (SFPE), causada, na maioria dos casos, por bactérias, particularmente as encapsuladas, sendo o *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitides* e *Haemophilus influenzae* os agentes mais frequentes¹¹. A infecção pode atingir os adultos, mas acomete principalmente as crianças, em virtude da imaturidade do seu sistema imune, particularmente pelo subdesenvolvimento do compartimento marginal das células B neste grupo de doentes^{12,13}.

Por isso, na população pediátrica, a cirurgia de esplenectomia e ligadura da veia gástrica esquerda para tratamento da HP de causa esquistossomótica tem sido associada ao auto-implante de tecido esplênico em bolsa no omento maior, como forma de prevenir a ocorrência da SFPE⁷. De fato, vários estudos, muitos dos quais conduzidos em pacientes esquistossomóticos hepatoesplênicos, têm dado suporte à hipótese da promoção da resistência à infecção após esse procedimento, que tem sido associada à manutenção da integridade do sistema fagocítico mononuclear (SFM)¹⁴⁻¹⁷.

Este sistema, constituído pelas células monocíticas/macrofágicas, tem o importante papel de realizar a fagocitose de partículas estranhas, antígenos e patógenos. Quando ativadas, estas células produzem grandes quantidades de agentes microbicidas altamente reativos derivados do oxigênio, tais como o ânion superóxido ($O_2^{-\cdot}$), que, por ação da enzima superóxido dismutase (SOD), pode ser convertido em peróxido de hidrogênio, outro importante produto microbicida^{18,19}. O

balanço entre a liberação destas espécies reativas de oxigênio (EROs) e a capacidade de ação dos sistemas antioxidantes provoca o chamado estresse oxidativo e determina a intensidade da resposta imune²⁰.

Este mecanismo de defesa do hospedeiro também faz parte da resposta citotóxica contra a infecção pelo *Schistosoma mansoni* (*S. mansoni*)²¹. A associação entre níveis hepáticos de SOD e infecção por este parasita tem sido demonstrada em camundongos. Esses animais, quando infectados, apresentam altos níveis dessa enzima, que retornam aos valores normais quando recebem tratamento com praziquantel²².

No tegumento do *S. mansoni*, tem sido demonstrada a presença da enzima óxido nítrico sintase, que converte a L-arginina em radical óxido nítrico²³. Supõe-se que o mesmo possa ocorrer com a produção da SOD neste parasita, e isso poderia ser um mecanismo usado pelo *S. mansoni* para escapar da resposta imune do hospedeiro^{22,24,25}.

Portanto, a análise da SOD é importante para avaliar, de um lado, a capacidade de geração das EROs, a partir da redução do $O_2^{-\cdot}$, pelas células do hospedeiro, e do outro, a habilidade do parasita na detoxificação deste radical.

Em virtude do controle da infecção depender do baço e do estado de ativação do SFM, este estudo objetivou analisar, *in vitro*, a atividade funcional das células mononucleares do sangue periférico (PBMC) de pacientes portadores de esquistossomose mansônica, na forma hepatoesplênica, submetidos à esplenectomia e auto-implante esplênico, através da produção da enzima SOD neste grupo de pacientes. Assim, pretendeu com este trabalho dar maior consistência à hipótese de que o auto-implante de tecido esplênico possa influir de forma positiva na atividade fagocítica destas células.

MÉTODOS

A pesquisa seguiu os princípios da Declaração de Helsinque (1975, revisada em 1989) e foi aprovada pela Comissão de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde (CCS) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). O termo de consentimento livre e esclarecido foi assinado por todos os pacientes ou responsáveis.

O estudo foi prospectivo, usando o modelo de corte transversal, e realizado no Serviço de Cirurgia Geral da Criança do Hospital das Clínicas e no Laboratório de Imunopatologia Keiso Azami (LIKA), ambos da UFPE.

Seleção

Foram colhidas amostras de sangue periférico (15mL) de quatro grupos (G) de voluntários:

Grupo 1 (G1) – 12 portadores de esquistossomose mansônica na forma hepatoesplênica (EHE), sem nenhuma forma de tratamento (Grupo clínico de referência - EHE), sendo dez mulheres e dois homens, com idade variando entre 10 e 30 anos (Média $\pm$ DP; $20,0 \pm 5,1$ anos). Todos os pacientes eram provenientes da mesma zona endêmica para infecção pelo *S. mansoni* e apresentavam Kato-Katz positivo.

Grupo 2 (G2) – 13 pacientes semelhantes aos do G1, mas que apresentavam antecedentes de hemorragia digestiva alta por ruptura de varizes de esôfago, comprovadas por endoscopia digestiva alta. Nove eram mulheres e quatro eram homens. As idades variaram de 18 a 30 anos (Média $\pm$ DP; $24,6 \pm 3,4$ anos). Estes pacientes tinham recebido tratamento clínico com praziquantel (40mg/Kg de peso) em dose única, e tinham sido submetidos à esplenectomia, ligadura da veia gástrica

esquerda e devascularização da grande curvatura gástrica, para descompressão do sistema porta (Grupo cirúrgico de referência - EHE/ELGE).

Grupo 3 (G3) – 19 pacientes clinicamente similares aos do grupo G2, sendo 13 mulheres e seis homens, com idades variando entre 16 e 25 anos (Média $\pm$ DP; $20,2 \pm 3,6$ anos). Todos receberam tratamento clínico pré-operatório com uma dose única de oxaminiquine (20mg/Kg de peso) e tinham sido submetidos, quando crianças (idades entre 10 e 16 anos), à esplenectomia, ligadura da veia gástrica esquerda e auto-implante de dez fragmentos sem cápsula, do pólo superior do baço, que foram envelopados em uma bolsa no omento maior. As medidas e os pesos desses fragmentos foram aproximadamente: $3,0 \times 2,0 \times 2,0$ cm (± 10 g cada). Todos tiveram comprovação da “pega” satisfatória dos implantes por meio de cintilografia com enxofre coloidal marcado com Tecnécio⁹⁹ (Grupo Estudo - EHE/ELGE/AI)¹⁶.

O seguimento clínico e laboratorial desses pacientes foi feito a cada seis meses ou quando ocorreu alguma alteração clínica, como, por exemplo, sangramento digestivo alto. Endoscopia digestiva alta foi realizada a cada seis meses para avaliação das varizes de esôfago e da gastropatia. Os pacientes que apresentaram recidiva de hemorragia digestiva alta foram incluídos no protocolo de esclerose endoscópica das varizes de esôfago.

Retosigmoidoscopia foi realizada anualmente no seguimento pós-operatório, cuja média neste grupo é de sete anos. Esse procedimento é feito não apenas para seguimento da colopatia esquistossomótica, mas para avaliação de infecção residual pelo *S. mansoni* pelo oograma quantitativo de rotina, utilizando três biópsias de submucosa no reto, sigmóide e cólon descendente. Cinco pacientes (26,3%) que apresentaram ovos viáveis no oograma receberam um segundo tratamento médico com praziquantel na dose única de 40mg/Kg de peso.

A investigação laboratorial nesse grupo incluiu, entre outros exames, a avaliação da reserva funcional hepática. Antes dos tratamentos médico e cirúrgico, 14 (73,7%) pacientes foram classificados como Child-Pugh A e cinco (26,3%) como Child-Pugh B. No ultimo seguimento pós-operatório, 17 (89,5%) pacientes foram enquadrados com Child-Pugh A e dois (10,5%) como Child-Pugh B.

Grupo 4 (G4) – 15 indivíduos sadios, sem infecção pelo *S. mansoni*, que viviam na mesma área endêmica e apresentavam as mesmas condições sócio-econômicas dos pacientes incluídos nos grupos G1, G2 e G3. Oito voluntários eram do sexo feminino e sete do sexo masculino. As idades variaram de 15 a 28 anos (Média $\pm$ DP; $19,3 \pm 4,3$ anos) - (Grupo Controle - GC).

Procedimento

O sangue coletado foi distribuído em três *containers* á vácuo, com capacidade de 5mL cada, e contendo EDTA á 15%. A obtenção das PBMC foi realizada conforme o protocolo descrito por Johnstor²⁶. O sangue obtido foi distribuído em tubo estéril, de vidro, com capacidade para 50mL, e posteriormente diluído na proporção de 1:1 em meio de cultura Roswell Park Memorial Institute (RPMI 1640), estéril a 8°C. Aos 30mL da suspensão foram adicionados 20mL de Histopaque (SIGMA). A mistura foi centrifugada por 30 minutos à 1400 rpm (2° a 8°C). A seguir, foi coletada, com pipeta de Pauster, a camada formada pelas PBMC, que era transferida para outro tubo de centrífuga. Na seqüência, foram adicionados 15mL de meio RPMI 1640, e feita nova centrifugação por 10 minutos nas mesmas condições anteriores. O sobrenadante foi aspirado e desprezado. Posteriormente, o sedimento foi ressuspenso em 2mL de meio de cultura RPMI 1640 completo, contendo soro fetal bovino a 3% e antibióticos (penicilina 100U/mL e estreptomicina 100?g/mL).

Desta última solução, foi retirada uma alíquota de 10 µL e colocada em tubo Eppendorf, de plástico e estéril, e adicionado à suspensão de células, 90 µL do corante azul tripan a 0,05%. Ao final, a mistura foi disposta sobre uma lâmina espessa de vidro (Hemocitômetro ou Câmara de Neubauer), a qual foi levada ao microscópio óptico para contagem das células.

A atividade da SOD foi mensurada pelo método da quimioiluminescência descrito por Corbisier²⁷. O ânion $O_2^{\cdot-}$ foi gerado pelo sistema xantina/xantina oxidase. Os monócitos (10^6) aderidos à placa de cultura foram estimulados com acetato miristato de forbol (PMA) e sonificados para análise da atividade da SOD. O ensaio da quimioiluminescência foi realizado em 0,1M de glicina em NaOH, pH de 9,0, contendo 1mM de EDTA e 1mM de salicilato sódico. A reação foi iniciada pela adição de 0,2mL de solução de xantina em uma concentração final de $2,5 \times 10^{-5}$ M para 0,2mL de xantina oxidase (concentração final de 4mU/amostra), na presença de lucigenina (concentração final de 0,1mM). A intensidade da luz foi mensurada 30 segundos após iniciada a reação pela xantina. Quantidades de SOD nas amostras foram calculadas pela comparação do seu efeito inibitório na formação do $O_2^{\cdot-}$ com o efeito de conhecido aumento das concentrações de SOD purificada, usando SOD inativada pelo calor com 0% de inibição. As mensurações foram realizadas antes e após estimulação, quando o pico da quimioiluminescência dependente da lucigenina era alcançado. Foi realizada uma curva cinética da atividade da SOD nos tempos 0, 5, 10 e 15 minutos. O tempo de 10 minutos foi tomado como tempo de leitura, pois foi o tempo de maior atividade em todos os grupos e o que apresentou menor grau de dispersão dos resultados. Os resultados da SOD foram expressos em unidade de SOD/mg de proteína, cujo conteúdo foi analisado pelo método de Lowry²⁸.

Os resultados dos diferentes grupos foram expressos por suas respectivas médias e desvios padrões. Para a análise da diferença das médias entre os grupos foi utilizada a análise de variância (ANOVA), seguido pelo teste paramétrico de Tukey-Kramer, em função da normalidade dos dados. A significância estatística foi considerada, admitindo-se um nível crítico de 5%, em todos os casos ($p \leq 0,05$). A análise estatística foi realizada pelo software Jandel Sigma Stat, versão 2.0.

RESULTADOS

As médias dos níveis de SOD produzidos pelas PBMC dos quatro grupos envolvidos na investigação estão expressas na Tabela 1. As comparações entre as médias dos diferentes grupos, através do teste de comparação múltipla de Tukey-Kramer, são mostradas na Tabela 2.

DISCUSSÃO

Existem várias ações visando o controle da esquistossomose mansônica. Entre elas, destacam-se o uso de moluscocidas para diminuir o número de hospedeiros intermediários, a melhoria das condições de higiene e sanitária da população exposta, a educação sanitária desta população, o tratamento intensivo com praziquantel, individual ou coletivo nas áreas de alta prevalência e a proteção individual contra a penetração das cercárias².

Todavia, os obstáculos a serem vencidos são igualmente numerosos, incluindo o custo alto do controle do hospedeiro intermediário, do saneamento básico e do provimento de água potável, a dificuldade do controle da doença devido ao intenso contacto dos indivíduos com águas infestadas pelo parasita nas regiões de alta prevalência, o tempo longo para que medidas comunitárias de educação sanitária tenham êxito, a ineficácia dos tratamentos intensivos de comunidades em reduzirem substancialmente a prevalência das novas infecções e a inexistência, até o presente momento, de uma vacina específica para controle desta endemia^{2,29}.

A educação básica para todos os indivíduos do Nordeste do Brasil poderia ser o início da solução deste problema de saúde pública que ainda acomete vários estados, incluindo Pernambuco⁵. Todos os voluntários desta pesquisa vivem na Região da Mata deste Estado, onde a maioria da população tem reduzido poder aquisitivo e baixo nível de educação, o que obriga a utilização de águas naturais contaminadas para o exercício da agricultura, trabalho doméstico e/ou lazer.

A patogênese da EHE resulta dos ovos produzidos por *S. mansoni* adultos que habitam a circulação porta de seres humanos. A gravidade da doença é uma função da carga parasitária e, conseqüentemente, da resposta inflamatória do hospedeiro aos ovos depositados nos espaços porta do fígado. Assim sendo,

aproximadamente 10% dos indivíduos infectados apresentam as formas mais graves, incluindo a hepatoesplênica, que se caracteriza pela instalação do quadro de hipertensão porta, manifestado por esplenomegalia, hiperesplenismo, varizes de esôfago, circulação colateral, hemorragia digestiva alta e alterações de crescimento e desenvolvimento^{1,30,31}.

O tratamento proposto para crianças com EHE no Nordeste do Brasil compreende a esplenectomia, ligadura da veia gástrica esquerda e, mais recentemente, o auto-implante heterotópico do baço, na forma de pequenos fragmentos colocados no omento maior. Este procedimento tem sido associado à redução da SFPE neste grupo de doentes, desde a padronização do protocolo no início da década de 90, um efeito possivelmente relacionado à manutenção da atividade funcional dos macrófagos promovida pela cirurgia.

Os radicais livres, como o ânion $O_2^{-\cdot}$, representam papel importante na mediação do processo de infecção por interferirem, em associação com as interleucinas, na aderência das células mononucleares às bactérias, um processo que pode ser exercido tanto pelos agentes infecciosos quanto pelo sistema de defesa dos seres humanos³².

A enzima SOD é importante como catalisadora da dismutação desse ânion, regulando a otimização e a limitação de sua ação, que tanto pode ser benéfica para o organismo como pode vir a ser danosa para um conjunto de células do hospedeiro²⁵. Assim sendo, manter níveis adequados de SOD é importante não só na preservação e defesa do hospedeiro, mas também no estabelecimento de um mecanismo que vise impedir uma nova infecção pelo *S. mansoni*³³.

A atividade da SOD dos pacientes do grupo EHE/ELGE/AI não diferiu da produção dos indivíduos do grupo controle. Estes resultados podem sugerir a

adequada resposta dos pacientes ao tratamento instituído. De fato, neste grupo os pacientes são submetidos à colonoscopia anualmente, não apenas para controle da colopatia esquistossomótica, mas também para avaliação, pelo oograma quantitativo, da carga parasitária residual. Assim sendo, os cinco dos dezenove pacientes deste grupo que apresentavam carga parasitária residual ou tinham sofrido nova infecção receberam um segundo tratamento com praziquantel, o que deve ter contribuído para melhor erradicação da parasitose e conseqüente estabilização dos níveis de SOD.

Estes resultados podem explicar também a manutenção da produção do $O_2^{-\cdot}$ nos indivíduos sadios e nos pacientes com fragmentos auto-implantados de baço, como demonstrado por Brandt *et al*, em 2005, em estudo realizado no mesmo grupo de doentes¹⁷.

Por outro lado, deve ser ressaltado que a diminuição do sistema de defesa antioxidante pode levar ao excesso na formação de radicais livres, que pode promover ou intensificar o processo de patogênese da doença hepática, fato que ocorre em portadores de doenças crônicas do fígado³⁴. Assim, o balanço entre os sistemas oxidantes e anti-oxidantes pode contribuir para o desenvolvimento do dano no espaço porta em portadores da forma hepatoesplênica da infecção pelo *S. mansoni*. Neste sentido, o uso de vacina baseada em anti-oxidantes, como a SOD, contra vermes adultos de *S. mansoni*, constitui objeto de investigação recente, com resultados promissores²⁴.

A produção de SOD foi maior nos pacientes do grupo EHE/ELGE quando comparada a dos indivíduos sadios. Achados semelhantes foram encontrados por Imai *et al*. Estes autores demonstraram que a atividade da SOD hepática foi significativamente maior em ratos esplenectomizados do que nos controles, o

mesmo não ocorrendo com outros sistemas enzimáticos antioxidativos, como o glutathione-peroxidase e a catalase. A conclusão deste estudo é que a esplenectomia pode atenuar a peroxidação lipídica, causada pelo peroxinitrito, em função da diminuição das reservas de $O_2^{-\cdot}$ ³⁵.

Há que se observar que os pacientes que apresentam carga parasitária residual têm uma tendência a apresentar menor reserva funcional hepática³⁶, tornando-os susceptíveis do ponto de vista da resposta imune a infecções ou infestações parasitárias. Levando em consideração que a colonoscopia não é feita de rotina nos adultos deste grupo é provável que alguns pacientes ainda tenham doença em atividade, o que poderia estar associado a níveis mais altos de SOD, próximos aos pacientes não tratados.

Uma atividade especialmente maior foi observada nos pacientes do grupo EHE, em comparação ao grupo controle. Este achado está em consonância com trabalho experimental realizado em camundongos portadores da mesma doença, onde foi observado que os níveis elevados de SOD hepática eram normalizados quando os animais eram tratados com praziquantel. Apesar disso, os autores demonstraram que a atividade da enzima estava aumentada no fígado, mas não no baço²².

É possível que a atividade alta da SOD nestes pacientes esquistossomóticos sem tratamento possa interferir na desativação de radical $O_2^{-\cdot}$, que pode ser ativado na eliminação de novas larvas do *S. mansoni*, diminuindo a resistência desses indivíduos a novas infecções³⁷. Este achado pode justificar, portanto, a cronicidade da infecção, pela dismutação (detoxificação) rápida do $O_2^{-\cdot}$ produzido pelos macrófagos em resposta à infecção esquistossomótica, um possível mecanismo usado pelo parasita para escapar da ação oxidativa deste radical³⁸.

De fato, alguns estudos mostraram que a morte de muitas bactérias foi evitada pela SOD²⁰. Larrea *et al* avaliaram a atividade da Mn-SOD (uma das três isoenzimas SOD, presente na mitocôndria) em pacientes portadores de hepatite crônica por vírus C, demonstrando uma superexpressão desta enzima nas células mononucleares do sangue periférico³⁹. Estes achados podem sugerir um possível papel da SOD no mecanismo de sobrevivência do parasita nas infecções crônicas.

CONCLUSÃO

Os resultados, evidenciando a similaridade da produção de SOD pelos monócitos dos indivíduos sadios e dos pacientes jovens com hipertensão porta esquistossomótica submetidos à esplenectomia e auto-implante esplênico, emprestam suporte adicional à hipótese de que este procedimento tende a manter a integridade do sistema fagocítico mononuclear e conseqüentemente da resposta imune destes pacientes operados.

ABSTRACT

Background: Superoxide dismutase (SOD) is an enzyme that catalyzes the dismutation of superoxide in hydrogen peroxide, one important stage of the oxidative stress. The objective of this study was assess the functional activity of the peripheral blood mononuclear cell (PBMC), through the analysis of SOD activity, from patients with hepatosplenic schistosomiasis mansoni (HSM), underwent to splenectomy and ligation of left gastric vein (SLGV) and associated to spleen autotransplantation in great omental pouch. **Methods:** SOD activity was determined on the supernatants of the PBMC and measured by difference between citocromo c reduction by superoxide, generated by xanthine/xanthine oxidase system, and inhibition of this reduction by purified SOD. The SOD levels were expressed in uSOD/mg of protein. Four groups were constituted: G1 – 12 carriers of HSM, without treatment (HSM); G2 – 13 carriers of HSM, underwent to SLGV (HSM/SLGV); G3 – 19 similar patients to G2, but that received spleen autotransplantation in major omentum (HSM/SLGV/SA); e G4 - 15 health individuals (GC). **Results:** SOD activity was significantly higher in G1 (9.2 ± 3.8) and G2 (8.5 ± 3.2), in comparison with individuals of G4 (5.1 ± 2.1). In contrast, SOD levels were similar between the patients from G3 (7.3 ± 3.1) and G4 ($q=2.954$ $p>0.05$). **Conclusion:** The results lend further support to the hypothesis that the clinical treatment followed by splenectomy, ligation of the left gastric vein and spleen autotransplantation in young patients, carriers of the hepatosplenic form of schistosomiasis mansoni, keeps the SOD levels and help to maintain the mononuclear phagocyte system integrity.

DESCRITORES: Schistosomal; Porta hypertension; Splenectomy; Spleen auto-transplantation; Monocyte; Superoxide dismutase.

REFERÊNCIAS

1. WHO – World Health Organization. The Control of Schistosomiasis, Technical Report Series 1993; 83, 86pp.
2. Coura JR, Amaral RS. Epidemiological and control aspects of schistosomiasis in Brazilian endemic areas. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2004; 99 (5): 13-19.
3. Prata A. The role of the scientific research in the control of schistosomiasis in endemic areas 2004; 99(Suppl1): 5-11.
4. Katz N, Peixoto SV. Análise crítica da estimativa do número de portadores de esquistossomose mansoni no Brasil. Rev Soc Bras Med Trop. 2000; 33:303-8.
5. Resendes APC, Souza-Santos R, Barbosa CS. Internação hospitalar e mortalidade por esquistossomose mansônica no Estado de Pernambuco, Brasil, 1992/2000. Cad Saúde Pública. 2005; 21(5): 1392-1401.
6. Lacerda CM, Freira W, Melo PSV, Carvalho GL, Kirzner CF. Esplenectomia e ligadura da veia gástrica esquerda na esquistossomose mansônica: efeito sobre a pressão das varizes de esôfago aferida por técnica não invasiva. Rev Col Bras Cir. 1998; 26: 15-9.
7. Brandt CT, Oliveira BS, Nogueira JBM, Neves JR, Lopes TL. Esquistossomose hepatoesplênica em crianças: avaliação morfológica e funcional após esplenectomia e auto-implante esplênico. Rev Col Bras Cir. 1998; 25: 399-402.
8. Carlisle HN, Saslaw S. Properdin levels in splenectomized persons. Proc Soc Exp Biol Med. 1959; 102:150-55.
9. Brandt CT, Castro CMMB, Santana EM, Maciel DT, Lopes TL. Esplenose após esplenectomia e auto-implante esplênico em crianças portadoras de hepatoesplenomegalia esquistossomótica e varizes sangrantes de esôfago: atividade da tuftsin. An Fac Med CCS, UFPE. 1998; 43: 37-40.

10. Karakantza M, Theodorou GL, Mouzaki A, Theodori E, Vagianos C, Maniatis A. *In vitro* study of the long-term effects of post-traumatic splenectomy on cellular immunity. *Scand J Immunol*. 2004; 59:209-219.
11. Norris RP, Vergis EN, Yu VL. Overwhelming postsplenectomy infection. *Infect Med*. 1996; 13:779-83.
12. Kyaw MH, Holmes EM, Toolis F, Wayne B, Chalmers J, Jones IG et al. Evaluation of severe infection and survival after splenectomy. *Am J Med*. 2006; 119 (3): 1-7.
13. Kays MA, Stolar CJH. The spleen and splenectomy: implication for the pediatric population. In Fkalsrud EW, Krumel TM. *Infectious and immunologic disorders in pediatric surgery*. 1º ed. Philadelphia: W. B Saunders Company; 1993. p. 91-100.
14. Shokouh-Amiri MH, Kharazami A, Rahimi-Saber S, Hansen CP, Jensen SL. Phagocyte function after splenic autotransplantation. *Arch Surg*. 1990; 125:595-7.
15. Sipka S, Bráth E, Tóth FF, Aleksza M, Kulcsár A, Fábian A et al. Cellular and serological changes in the peripheral blood of splenectomized and spleen autotransplanted mice. *Transplant Immunology*. 2006; 16:99-104.
16. Brandt CT, Maciel TD, Frei Caneca OA, Barbosa CM, Araujo LB. Autotransplant of spleen tissue in children with schistosomiasis: evaluation of splenic function after splenosis. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2001; 96(supl): 117-122.
17. Brandt CT, Leite CRC, Castro RM, Brandt Filho C, Castro FMM, Castro CMMB. Avaliação do efeito da esplenectomia e auto-implante esplênico sobre algumas funções de monócitos em crianças com esquistossomose mansônica. *Rev Soc Bras Trop*. 2005; 38 (1): 38-42.

18. Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. Imunologia celular e molecular. Rio de Janeiro: Revinter; 1998.
19. Fridovich I. Superoxide dismutase. An adaptation to a paramagnetic gas. J Biol Chem. 1989; 264(14): 7761-7764
20. Babior BM. Phagocytes and oxidative stress. Am J Med. 2000; 109: 33-44.
21. LoVerde PT. Do antioxidants play a role in schistosome host-parasite interactions? Parasitol Today. 1998; 14: 109-113.
22. Shaheen AA, El-Fattah A, Ebeid FA. Effect of praziquantel treatment on lipid peroxide levels and superoxide dismutase activity in tissue of healthy and *Schistosoma mansoni* infected mice. Drug Res. 1994; 44:94-96.
23. Long XC, Bahgat M, Chlichlia K, Ruppel A, Li YL. Detection of inducible nitric oxide synthase in *Schistosoma japonicum* and *S. mansoni*. J Helminthol. 2004; 78:47-50.
24. LoVerde PT, Carvalho-Queiroz C, Cook R. Vaccination with antioxidant enzymes confers protective immunity against challenge infection with *Schistosoma mansoni*. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2004; 99 (1): 37-43.
25. Dzik JM. Molecules released by helminth parasites involved in host colonization. Acta Bioch Pol 2006; 53 (1): 33-64.
26. Johnston Jr RB. Measurement of O_2^- secreted by monocytes and macrophages. Methods in enzymology. 1984; 105:365-9.
27. Corbisier P, Houbion A, Remacle J. A new technique for highly sensitive detection of superoxide dismutase activity by chemiilluminescence. Anal Biochem. 1987; 164 (1): 240-7.
28. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. J Biol Chem. 1951; 193:265-275.

29. Berquist NR. Schistosomiais: from risk assessment to control. *Trends Parasitol.* 2002; 18: 309-314.
30. Kelner S. Critical evaluation of surgical treatment of schistosomiasis portal hypertension. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1992; 87: 357-68.
31. Brandt CT, Frei Caneca OA, Tavares DJS, Santos de Azevedo FA, Agra Jr VG, Cordeiro F. Hipertensão portal esquistossomótica na criança: avaliação crítica. *An Fac Med Uni Fed Pernam.* 1995; 40:106-10.
32. Arita Y, Ansamma J, Koo HC, Li Y, Palaia TA, Davis JM et al. Superoxide dismutase moderates basal and induced bacterial adherence and interleukin-8 expression in airway epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2004; 287 (6): L1199-L1206.
33. Vertuani S, Augusti A, Manfredini S. The antioxidants network: an overview. *Curr Pharm Des.* 2004; 10 (14): 1677-1694.
34. Salem TA, El-Refaei MF, Badra GA. Study of antioxidant enzymes level and phagocytic activity in chronic liver disease patients. *Egypt J Immunol.* 2003; 10 (1): 37-45.
35. Imai T, Nishimaki K, Shiga T, Kawasaki S, Makuuchi M. Lipid peroxidation and antioxidant activities in regeneration liver after partial hepatectomy in splenectomized rats. *Res Exp Med (Berl).* 1996; 196(1): 1-7.
36. Brandt CT, Braga MVM, Melo KL, Pinho Sá H, Carvalheira R. Surgical hepatosplenic mansonic schistosomiais in adolescents: Repercussions of the post-treatment schistosomotic burden on the hepatic functional reserve. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2001; 96 (supl): 113-115.
37. Goodall CP, Bender RC, Brooks JK, Bayne CJ. *Biomphalaria glabrata* cytosolic copper/zinc superoxide dismutase (SOD1) gene: Association of SOD1 alleles

with resistance/susceptibility to *Schistosoma mansoni*. *Mol Biochem Parasitol*. 2006; 147 (2): 207-210

38. Callahan HL, Crouch RK, James ER. Helminth anti-oxidant enzymes: a protective mechanism against host oxidants? *Parasitology Today*. 1988; 4(8):218-225.

39. Larrea E, Beloqui O, Muñoz-Navas MA, Civeira MP, Prieto J. Superoxide dismutase in patients with chronic hepatitis C virus infection. *Free Radic Biol Med*. 1998; 24(7):1235-1241.

TABELAS

Tabela 1: Média da atividade da SOD (uSOD/mg de proteína) por monócitos do sangue periférico dos quatro grupos.

Grupos	Média ± DP
Portadores de esquistossomose na forma hepatoesplênica (EHE/G1)	9,2 ± 3,8
Pacientes esplenectomizados (EHE/ELGE/G2)	8,5 ± 3,2
Pacientes esplenectomizados com auto-implante esplênico (EHE/ELGE/AI/G3)	7,3 ± 3,1
Indivíduos sadios (CT/G4)	5,1 ± 2,1

Tabela 2: Comparações entre as médias dos níveis de SOD dos diferentes grupos

Comparações*	Diferenças de médias	Q	P
GC versus EHE/ELGE/AI	2,206	2,954	P > 0,05
GC versus EHE/ELGE	3,426	4,182	P < 0,05
GC versus EHE	4,113	4,912	P < 0,01
EHE/ELGE/AI versus EHE/ELGE	1,220	1,567	P > 0,05
EHE/ELGE/AI versus EHE	1,907	2,392	P > 0,05
EHE/ELGE versus EHE	0,687	0,794	P > 0,05

* Teste de comparação múltipla de Tukey-Kramer

**Cytokine monocyte production in patients with schistosomal portal hypertension
underwent splenectomy and spleen autotransplantation***

**Carlos Roberto Carvalho Leite¹; Carlos Teixeira Brandt²; Célia Maria
Machado Barbosa de Castro³ Francisco Machado Manhaes-de-Castro⁴; Érika Michelle
Correia de Macedo⁴; Rebecca Peixoto Paes Silva⁴.**

¹ Prof. Assistente, Departamento de Cirurgia, CCS, Universidade Federal da Paraíba (UFPB),
Mestre e Doutorando em Cirurgia, UFPE

² Prof. Titular de Clínica Pediátrica Cirúrgica, CCS, UFPE

³ Prof. Adjunto em Medicina Tropical, CCS, UFPE

⁴ Bolsista de Iniciação Científica - CNPq

Trabalho realizado no Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)
e no Laboratório de Imunopatologia Keiso Azami (LIKA)

+ Corresponding author:

Carlos Roberto Carvalho Leite

Rua Maria Rosa, 441, Apt. 1701, Bloco B, Manaíra

João Pessoa – PB

CEP 58038 – 460

E-mail: leite.carlos@bol.com.br

* Artigo submetido para publicação e formatado de acordo com as normas da Revista *Memórias do Instituto
Oswaldo Cruz* memorias@fiocruz.br (Anexo VIII)

ABSTRACT

Interleukin 6 (IL-6) and interleukin 12 (IL-12) are associated with cytotoxicity against helminth parasites including *Schistosoma mansoni*. The purpose of this investigation was to compare IL-6 and IL-12 production by peripheral blood mononuclear cells (PBMC) in patients with hepatosplenic schistosomiasis mansoni (HSM), who underwent splenectomy, and ligation of the left gastric vein (SLGV) associated with spleen morsels autotransplantation in the major omentum. The volunteers of the investigation were divided in four groups: G1 – 12 patients with HSM, without any treatment (SMH); G2 – 13 SMH patients, who underwent SLGV (SMH/SLGV); G3 – 19 patients similar to G2 group, but additionally received autotransplantation of spleen morsels in the major omentum (SMH/SLGV/AI); and G4 – 15 healthy individuals (Control Group – CG). The means of IL-6 and IL-12 production were significantly lower and higher, respectively, in SMH patients as compared to the other three groups. There were no statistical differences among the means of IL-6 and IL-12, from SMH/SLGV, SMH/SLGV/AI; and CG groups. The mean levels of IL-6 and IL-12 from the SMH/SLGV/AI group were no different from CG adding further support to the hypothesis that spleen morsels autotransplantation after splenectomy, in carriers of surgical SMH may contribute to the protection of these patients against infections.

KEY WORDS: *Schistosoma mansoni*; Splenectomy; Spleen morsels autotransplantation; Monocyte; Interleukin-6; Interleukin-12

INTRODUCTION

Schistosomiasis is a chronic disease that affects over 200 million people worldwide (WHO 1993). The disease is caused by infection of *Schistosoma mansoni* (*S. mansoni*), which adult worms live in the mesenteric blood vessels around the gut (Boros 1994).

The disease presents large distribution in Brazil, but nowadays the transmission occur with more intensity in the Northeast Region of country, mainly on the States of: Pernambuco; Sergipe; Bahia, and Minas Gerais state, representing the third mortality cause among the so-called rural endemic diseases (Katz & Peixoto 2000, Coura & Amaral 2004).

Roughly 10% of patients developed hepatosplenic form of the disease morbidity, characterized by hepatosplenomegaly, hepatic periportal fibrosis, and portal hypertension, which may lead to the formation of esophageal varices and upper digestive bleeding (Kelner 1992). These patients are treated, in State of Pernambuco, with splenectomy and ligation of left gastric vein, that reduces the portal pressure, cures the hypersplenism, decreases the upper digestive bleeding bouts and improves the hepatic functional reserve, and the somatic development (Brandt et al. 1995, Lacerda et al. 1998, Brandt et al. 2001).

Although splenectomy is often necessary in these patients, the procedure has been implicated in several consequences, including immunologic abnormalities, such as decreased circulating immunoglobulin M (IgM), impaired activation of the alternative complement cascade (properdin), and reduced levels of tuftsin (Carlisle & Saslaw 1959, Brandt et al. 1998, Karakantza et al. 2004). It has been well established that the spleen is an important immune organ, serving as a large phagocyte. The anatomical structure of this organ and its central position in the route of the portal vein highlight its importance both innate and in adaptive immunity (Karakantza et al. 2004). For this reason, after splenectomy, patients have an increased risk of overwhelming postsplenectomy infection (OPSI), especially in children. This can be explained because when a functional spleen is present, even poorly opsonized

pneumococcus can be cleared by mononuclear phagocyte system (MPS), due to the specific spleen low flow blood in the red pulp architecture (Leemans et al. 1996, Kyaw et al. 2006).

The OPSI is mainly due to encapsulated bacteria, such as *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitides*, and *Haemophilus influenzae* (Norris et al. 1996). It is a usually fulminant and often fatal condition, occurring days to decades after removal of the spleen. It begins abruptly, frequently lacks of an identifiable focus, and usually progress rapidly, despite appropriate antibiotics therapy, resulting in a mortality rate of 50-75% (Traub et al. 1987). The infection can occurs at any age, although the risk is greater in childhood, because the compartment of the marginal zone B cells is not totally developed (Cooper & Williamson 1984, Torres et al. 2005).

Thus, spleen morsel autotransplantation into the major omentum seems to be a good alternative for preserving spleen functions, when splenectomy is necessary and the maintenance of splenic tissue is not contraindicated. The technical aspects of this procedure have been widely reported from several research groups (Brandt et al. 1996, Leemans et al. 1999, Marques & Petroianu 2002, Sipka et al. 2006).

Therefore, in children with the hepatosplenic form of *S. mansoni* infection, spleen morsel autotransplantation in the great and omental pouch has been added to protocol of splenectomy and ligation of left gastric vein, as a way of protection against OPSI. The decreased susceptibility to systemic infection may be due to maintenance of the MPS activity (Shokouh-Amiri et al. 1990, Brandt et al. 2001, Brandt et al. 2003, Petroianu & Petroianu 2005, Brandt et al. 2005).

The MPS is a major component of host defense against infection and is responsible for the clearance of particulate material, and bacteria from the bloodstream. This system, constituted by monocyte and macrophage cells, have two functions in the infection control: 1. release, by this cells, of reactive oxygen and nitrogen species, like superoxide, hydrogen

peroxide, nitric oxide and peroxynitrite, which together are regarded as playing a major role in intracellular bacteria killing; and 2. cytokine production, like alpha tumor necrosis factor (TNF- α), interleukin 1 (IL-1), 6 (IL-6) and 12 (IL-12) (Tracey & Lowry 1990, Abbas et al. 1998).

IL-6 was originally identified as a B-cell differentiation factor. It is a pleiotropic cytokine produced by monocytes, T-cells, macrophages and endothelial cells and is released in response to IL-1 and TNF- α (Kishimoto 1989). This cytokine is well recognized for its role in the acute inflammatory phase response which is characterized by the production of a variety of hepatic proteins, called acute-phase proteins, such as C-reactive protein, which increases the phagocytosis rate of bacteria; serum amyloid A; and fibrinogen, an important clotting agent. These proteins are involved in the accumulation of phagocytes at an inflammatory site and the killing of microbial pathogens (Archararit et al. 2000).

In addition to its role in the acute phase response, IL-6 is especially important in the differentiation of activated, but not resting, B cells culminating in production of immunoglobulin, mainly IgM (Keller et al. 1996). Moreover, IL-6 acts in the early stages of T-cell differentiation. In this phase, it reinforces the effect of IL-2 and promotes the differentiation of CD4 cells into T-helper 2 cells (T_H2) (Keller et al. 1996).

It has been also reported that IL-6 is expressed in cells of acute inflammatory granulomas experimentally induced in mice by eggs of *S. mansoni*. Moreover, *in vitro* IL-6 was shown to enhance the cytotoxic activity of human platelets against larvae of *S. mansoni*. This activity is in close cooperation with monocytes. Thus, there is both a local and a systemic role of IL-6 in the host immune response, following infection of mice and human with *S. mansoni* (Pancre et al. 1990, Khalil et al. 1996).

Although IL-12 was discovered as a product of B cell lines, B lymphocytes do not appear to be the most important physiological producers of IL-12, which *in vivo* and *in vitro*

appear to be produced mainly by phagocytic cells (monocytes, macrophages and neutrophils) and other cell types with antigen-presenting capabilities, such as dendritic cells (Trinchieri 1994). Macrophages, especially when infected by intracellular bacteria, are potent producers of IL-12, directing the T_H cell development towards T_H1 response (Trinchieri 1996).

IL-12 was originally identified by its capacity in stimulate the natural killer (NK) cell activity. In addition to this function, IL-12 promotes the differentiation of the T cell and the induction of the synthesis and secretion of other cytokines (Kobayashi et al. 1989). But, the most important function, nowadays, is the induction of the gamma interferon (IFN- γ) (Galvão da Silva & Abrahamsohn 2001).

The IL-12 production represents cellular T_H1 and T_H2 immune response and is associated with chronic schistosomiasis. Thus, many researchers have studied its role in shaping the immune responses induced by various parasite infections, including the *S. mansoni* (Wynn et al. 1994, Mountford et al. 1998, el-Shazly et al. 2005).

Considering all this, this present study was undertaken to assess the peripheral blood mononuclear cell (PBMC) activity and to measure the cytokine profile (IL-6 and IL-12 production) in supernatants of these cells, from carriers of *S. mansoni* in its hepatosplenic form, who underwent splenectomy, ligation of left gastric vein and auto-implantation of spleen morsels in the major omental pouch.

MATERIALS AND METHODS

This is a prospective cross-sectional study, performed at the Department of Surgery (Pediatric Surgery Service) and Laboratory of Immunopathology Keizo Asami (LIKA), both Federal University of Pernambuco.

Subjects

PBMC were available from four groups (G), including 59 subjects:

Group 1 (G1) – 12 patients with *S. mansoni* infection in its hepatosplenic form without any kind of treatment (SMH). Ten were women and two were men, with ages ranging from 10 to 30 years (Mean $\pm$ SD; 20.0 ± 5.1 years). All patients came from endemic area for *S. mansoni*. Kato-Katz parasitological examination was positive in each patient (Reference clinical group - SMH).

Group 2 (G2) – 13 SMH patients, similar to G1, but presented upper digestive bleeding. Nine were women and four were men. Ages varied from 18 to 30 years (Mean $\pm$ SD; 24.6 ± 3.4 years). They underwent medical treatment and portal hypertension descompression by splenectomy, ligature of the left gastric vein and devascularization of the great stomach curvature (Reference surgical group - SMH/SLGV).

Group 3 (G3) - 19 patients with SMH, being 13 women and six men, with ages ranging from 16 to 25 years (Mean $\pm$ SD; 20.2 ± 3.6 years). All of them received pre-operative medical treatment with a single dose of oxaminiquine 20mg/Kg of weight. They underwent splenectomy, ligature of the left gastric vein and auto-implantation of ten slices of spleen tissue, without the capsule, in the great omental pouch. The measurements and weights of the implanted slices were approximately: 3.0 x 2.0 x 2.0 cm and 10g each. In this regard, all patients in this group presented satisfactory splenosis assed by nuclear medicine (Study Group - SMH/SLGV/AI).

Patients presenting recurrent upper digestive hemorrhage in the follow-up were included in the protocol for endoscopic sclerosis of esophageal varices. All patients who presented this complication after surgical treatment were successfully controlled using this protocol.

The patients of this group underwent colonoscopy every year in the postoperative follow-up, which average in this group is seven years, for continuous observation of the colopathy, and also for assessing residual infection of *S.mansoni* by the quantitative egg count in a routine three submucosal colon biopsies. Five patients (26.3%) with positive viable eggs received a second medical treatment with praziquantel in a single dose of 30mg/Kg of weight.

Laboratory investigation in this group included liver function tests for assessing hepatic functional reserve. Before medical and surgical treatment 14 (73.7%) patients were classified as Child-Pugh A and five (26.3%) were Child-Pugh B. In the last post-operative follow-up evaluation 17 (89.5%) patients were Child-Pugh A and two (10.5%) were Child-Pugh B.

Apart from improving the hepatic functional reserve the patients have not increased the rate of infection, and none of them presented OPSI.

Group 4 (G4) - 15 healthy individuals, free of *S. mansoni* infection. They lived in the same geographical area and presenting similar socio-economical status of patients enrolled in groups G1, G2 and G3. Eight were women and seven were men. Ages varied from 15 to 28 years (Mean $\pm$ SD; 19.3 ± 4.3 years) - (Control group - CG).

Immunologic procedures

Obtaining of PBMC

The procedure followed the protocol described by Johnston (Johnston 1984). Briefly, 15mL samples of whole blood were aseptically collected by peripheral venous puncture in a

vacuotainer tube with EDTA. Next, after being placed in 50mL Ficoll tubes (*Talpiot Industrial*, Israel), the blood was diluted on the proportion of 1:1 in Roswell Park Memorial Institute – RPMI 1640 (*Gibco BRL, Gaithersburg, MD, USA*) culture medium and added 20mL of Ficoll-Hypaque (*LMS Litton Biometrics, Kensington, MD, USA*) to reach a volume of 50mL. The samples were centrifuged for 30 minutes (1400 rpm, 2° to 8°C). The aspirated plasmas and layers of PBMC were then collected and transferred to 50mL sterile centrifuge tubes (*Corning Incorporated, USA*), to reach a volume of 50mL, once again with RPMI 1640. Two further washes were performed and the precipitates re-suspended in 2mL RPMI 1640 culture medium, supplemented with 3% bovine fetal serum, 100U/mL of penicillin and 100 mg/mL of streptomycin. Next, PBMC were counted in a Neubauer chamber. The cell concentrations were adjusted to 1.0×10^6 cells in 1mL of culture medium. After being placed on plates, 1mL was dispensed from the suspension (1.0×10^6 cells for 1mL of RPMI 1640) in each well and transferred to a sterilizer in a humid environment at 37°C with 5% of CO₂ for 1 hour. Next, following washes performed with RPMI 1640 to remove non-adherent cells, the plates were left in the sterilizer for another 60 minutes. After this time, the supernatants were collected and stored at 0°C for the measurement of the cytokine levels produced by the stimulated PBMC.

Cytokine assays for IL-6 and IL-12

After obtaining of the PBMC by density gradient centrifugation of EDTA blood on Ficoll-Hypaque, these cells were stimulated with lipopolysaccharide (LPS) from *E. coli* with the dosage of 10µg/10⁶ cells/mL lasting 24 hours. Samples of 100µL from the supernatant cell, after culture, was used to measurement of cytokine quantification using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) method. A commercial kit (Quantikine M, R&D Systems) was

used for measurement of cytokine, according to the manufacturer's instructions. In briefly, flat-bottom plates were coated with appropriate antibodies for the detection of IL-6 and IL-12. The plates were blocked with 5% evaporated milk in PBS at 37°C for 2 h and washed four times in 0,05% Tween-20 in PBS. Test samples and serial dilutions of standards were diluted in 1% bovine serum albumin – 0.05% Tween-20 in PBS (ELISA diluent), added to the plates, and incubated overnight at 4°C. A standard curve was obtained of each plate using recombinant human cytokines. Cytokine levels were expressed in µg/mL.

Statistical analysis

The quantitative results were expressed by their means and standard deviations (SD). The difference among the groups were evaluated using a non-parametric one way analysis of variance (ANOVA), by the Kruskal-Wallis test, followed by Dunn' test, because the data did not follow a Gaussian distribution. A $p < 0.05$ was used to reject the null hypothesis. These statistical analyses were performed using Jandel Sigma Stat software, version 2.0.

Ethics

This study followed the principles of Helsinki Declaration (1975, revised in 1989) and was approved by the Ethics Committee of the Health Sciences Center – Federal University of Pernambuco. All patients and individuals or guardian of minors signed an informed consent that was obtained after thorough explanation in Portuguese.

RESULTS

The mean levels of IL-6 produced by cultured from PBMC of patients and control individuals are expressed in Table I, and on the table II are showed the multiple comparisons by Dunn' test. The mean production IL-12 from four groups is showed in table III, and on the table IV are expressed the results from Dunn multiple comparison test.

DISCUSSION

In Brazil, schistosomiasis is considered as a spreading severe problem of public health. The control of disease should be two purposes: 1. transmission control, by individual or massive treatment and use of molluscicides and 2. morbidity control, by health and sanitary educations (Prata 2004). The hepatosplenic form is more frequent in areas with high prevalence of the disease and larger quantity of eggs eliminated by the population (Coura & Amaral 2004). It's associated with the development of periportal fibrosis described by Symmers (Prata 2004).

Although the clinical treatment of the schistosomiasis mansoni has been very successful with praziquantel, there has been report of *S. mansoni* strain resistant to this drug in humans (Fallon 1998). In this regard, there is the need of searching for new drugs, or an adjuvant therapy, which has been tested in mice with the purpose of enhancing the antischistosomal efficacy (Botros et al. 2006). In the study group (SMH/SLGV/AI), the second treatment for some patients with residual *S. mansoni* infection was associated with the improvement of liver function (Brandt et al. 2001) and may also be related to a better immune response.

As regard to the surgical treatment for portal hypertension in patients with *S. mansoni* infection the hurdles have been overcome, and the results related to survival are very high. Furthermore, the widespread use of vein endoscopic sclerotherapy has reduced the frequency of esophageal hemorrhage due to varices in the post-operative follow-up of these patients (Ferraz et al. 2001). This protocol was successfully used in all patients who presented upper digestive bleeding after surgical treatment, included in this study.

Until 1990, the classic surgical approach in child carriers of schistosomal portal hypertension with bleeding esophageal varices, hypersplenism and/or splenic underdevelopment, in Pernambuco, was the same as in adults, splenectomy associated to

ligature of left gastric vein (Lacerda et al. 1998). The morbidity, in regarding to recurrence of upper gastrointestinal bleeding, was similar to adult; however, the mortality rate was significantly higher due to OPSI (Brandt et al. 1995).

Thus, since 1990, it was standardized in the Pediatric Surgery Service, University Hospital/UFPE, the protocol including splenectomy, ligature of left gastric vein and autotransplantation of spleen tissue in the major omentum. The results in respect to hypersplenism and/or splenic underdevelopment have been satisfactory, and the immunologic features seem to demonstrate the beneficial effects of the splenosis in the humoral and cellular immunity (Brandt et al. 1996, Brandt et al. 1998, Brandt et al. 2001). An evidence of this is that, from the clinical follow-up, it was not observed any case of OPSI since 1991. It is believed that the improvement of the liver function is also associated with the immune protective effect observed in the study group (SMH/SLGV/AI).

On the response to invading pathogens, cytokines are undoubtedly key molecules. The effects of the cytokines can be synergistic or antagonistic amongst themselves. An example of this antagonism is the dichotomy in the pattern of cytokines production T_H1 (IL-2, IL-12 and IFN- γ), that induces a predominant cellular response, and T_H2 (IL-1, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13 and TNF- α), that induce a preferentially humoral response. The macrophage cells are stimulated directly by LPS to secrete a wide variety of cytokines that includes, mainly, TNF- α and IL-1, IL-6 e IL-12 (Abbas et al. 1998, Tracey & Lowry 1990).

IL-6 is a multifunctional cytokine with a major role in the host immune response to infectious agents and in the induction of hepatic acute phase reaction (Khalil et al. 1996). In regarding IL-6 production from PBMC in this study, there was no observed difference between the control group (CG), group test (SMH/SLGV/AI) and reference surgical group (SMH/SLGV).

These results indicated a normal capacity of IL-6 production by monocytes of the patients of these three groups, and therefore demonstrate that the kinetics of generation of this cytokine is not change after splenectomy with or without spleen autotransplantation, or in other words, the production of IL-6 it cannot be exclusive of the spleen. In fact, has been showed high levels of IL-6 in the liver, kidney and peripheral blood leucocyte from healthy individuals (Tovey et al. 1988). But, in contrast to our results, has been demonstrated that the splenectomy in dogs induced the decreased of IL-6 (Moeniralam et al. 1997).

A mechanism that can be implicated in this normal production of IL-6 for those patients' PBMC is the action of TNF- α , the largest physiologic inducer in IL-6 synthesis (Van Snick 1990). Indeed, several authors demonstrated statistically similar levels of those cytokines after splenectomy in comparison with control group (Brandt et al. 2005, Torres et al. 2005). At the same time, these results can be justify the maintenance of IgG and IgM and increase of IgA levels in the follow-up of these patients, like demonstrated by Brandt *et al*, in 1993, once IL-6 induces the differentiation of LB, could be increase the production of antibodies (Brandt et al. 1993).

On the other hand, the reference clinical group (SMH) presented a steep decrease of IL-6. These results did not reflect the pattern of immune response observed in the chronic infection, with prevalence of cytokine type 2 (Sher et al. 1991, Wynn et al. 1993, Fallon 2000), and this could be explained by several mechanisms. First, it has been demonstrated that the IL-12 is capable of inhibiting the suppression of the T_H1 response, and that has effect in the production of IFN- γ , a cytokine that activates the destructive capacity of the macrophage (Mahanty & Nutman 1995). The increased levels of the IL-12 in the hepatosplenic patients (G3), as it will be seen ahead, corroborate this possibility. Second, it has been showed that the IL-10 (T_H2) can be inhibit by the synthesis of IL-6, as it can be observed in other diseases, as the paracoccidiomycosis (Peraçoli et al. 2003). And third, it can

also be speculated that not always in SMH a cytokine pattern T_H2 dominates the immune response. Indeed, evidences suggest that the hepatosplenic disease can be associated also with response type T_H1 , depending on other immunologic factors (Mwatha et al. 1998, Fallon 2000, Morais et al. 2002).

Collectively, the results in regarding to production of IL-6 in the patient carriers of schistosomiasis in its hepatosplenic form demonstrate that, in spite of the presence of a response predominantly type T_H2 in the humans infected by *S. mansoni*, there are no clear evidences that suggest the immunopathology of the chronic disease is driven for the cytokines T_H2 . Those disagreement results that are in line with most of the others papers can also be explained by age and the differences in the stages of the disease, the influence in the immune response of the infection intensity and the other parasitic disease, that commonly are associated with schistosoma infection in the group of patients (G3), but also due to the effect of the drug that was not completely effective in the eradication of the disease, allowing, therefore, the maintenance of residual parasitic load.

IL-12 is a cytokine that is involved in the induction of IFN- γ production by the NK and T cells. In respecting IL-12 production by PBMC in this study, it was observed no significant difference statistically among the SMH/SLGV, SMH/SLGV/AI groups, and the control group (CG).

The similar release of IL-12, in these three groups, can reveal, again, that the production of this cytokine is maintained preserved after splenectomy, with or without spleen morsel autotransplantation. At the same time, it can demonstrate that its production is independent of the exclusive splenic macrophages secretion. In spite of these results, it has been demonstrated that splenectomy promotes alteration in the balance among the subpopulations of lymphocytes T helper, usually characterized by an inhibition of the cytokines response T_H1 , like IFN- γ , IL-2 and IL-12 and increase of cytokines response T_H2 ,

such as IL-4, IL-5, IL-10 (Miniello et al. 2002, Panitsas & Mouzaki 2004, Kuranaga et al. 2005). This dichotomy T_H1/T_H2 was observed in the present investigation that revealed high levels of IL-6 as compared to IL-12 levels, possibly a consequence of the down regulation mechanism between these two cytokines.

On the other hand, an overproduction of IL-12 was observed in the clinical reference group (SMH), and the results, again, are not also in agreement with the data of the literature, if we consider the classic pattern of cytokines release, with prevalence of the T_H2 response. However, two reasons can explain this. First, it has been already proven that the IL-12 is not a cytokine necessarily obligatory for maintenance of a T_H1 response *in vivo* and second, it was demonstrated that the IL-4 can have a synergistic effect with the IL-12 in the induction of the activity proliferative of the cells $CD56^+$ (Naume et al 1993, D'Andrea et al 1995). Thus, a higher production of IL-12 mediated by IL-4 in this group chronically infected by *S. mansoni* can be a possible reason for the results of the present study. But it is necessary to say that discovery is particularly surprising because the IL-12 and the IL-4 are known for having antagonistic role in the development of the immune response T_H1 and T_H2 , respectively.

Besides, it should be taken into account that the IL-12, for being responsible for the development of the T_H1 response, usually protects the organism of the intracellular parasites, but it is ineffective against other parasites, as the pathogenic helminth (Trinchieri 1994). Thus, the increased production of the IL-12 can demonstrate a response of the NK cells to infection for *S. mansoni* in an attempt for the production of IFN- γ necessary to macrophage activation. However, as it is known, this parasite is extracellular, and like this, this response does not produce the necessary effects, which it is the destruction and death of the pathogen, possibly contributing to the chronicity of the infection.

CONCLUSIONS

These results demonstrate that there is a great variability in the profile of immune response in humans and that there is still no a consensus about the production of cytokines release by macrophage cell during the *Schistosoma mansoni* infection, as well as, after splenectomy and spleen autotransplantation. The uniformity lack among the results of the different works can be due to the heterogeneity of the samples that can implicate very different pathogenic mechanisms. An example of this is the possibility of re-infection of the patients after the parasite cure, since this fact is very common in the endemic areas, mainly in children. The maintenance of normal levels, as compared with the control group (CG), of IL-6 and IL-12 production, in the hepatosplenic schistosomiasis treated groups is an indicative that the PBMC activity after splenectomy, with or without spleen autotransplantation, maintains preserved, in regard to these cytokines production. Taken together, the results point to a restoration of IL-6 and IL-12 normal production by monocytes in carriers of hepatosplenic schistosomiasis mansoni who underwent medical and surgical treatments, including in those who had received auto implantation of spleen tissue in the major omentum after splenectomy and ligation of the left gastric vein. The data gives further support to the hypothesis that this additional procedure keeps the antiparasite ability and is important in the restoration of the immune response of these patients, since IL-6 and IL-12 normal production by the monocytes is associated with protective immunity response against infection, thus, protecting them against overwhelming postsplenectomy infection.

REFERENCES

1. Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS 1998. *Imunologia celular e molecular*. Revinter 2 ed.
2. Archararit N, Chuncharunee S, Pornvoranunt A, Atamasrikul K, Rachakom B, Atichartakarn V 2000. Serum protein C-reactive level in postsplenectomized thalassemic patients. *J Med Assoc Thai* 83 Suppl 1: 63-9.
3. Boros DL 1994. The role of cytokines in formation of the schistosome egg granuloma. *Immunobiology* 191:441.
4. Botros S, Mahmoud M, Hammam O, Salah F, Zidek Z, Masek K 2006. Effect of adamantylamide dipeptide as adjuvant therapy to praziquantel in mice infected with different *S. mansoni* isolates. *APMIS* 114: 480-491.
5. Brandt CT, Tavares DJS 1993. Esplenose associada à esplenectomia em crianças esquistossomóticas: análise sequencial das imunoglobulinas G, A e M e dos componentes 3 e 4 do sistema complemento. *An Fac Med Uni Fed Pernam* 38:24-29.
6. Brandt CT, Frei Caneca OA, Tavares DJS, Santos de Azevedo FA, Agra Jr VG, Cordeiro F 1995. Hipertensão portal esquistossomótica na criança: avaliação crítica. *An Fac Med Uni Fed Pernam* 40:106-10.
7. Brandt CT, Lopes TL, Neves JR, Nogueira JB, Oliveira BS 1996. Esquistossomose hepatoesplênica em crianças: corpúsculo de Howell-Jolly após esplenectomia e esplenose. *An Fac Med Uni Fed Pernam* 41:103-7.
8. Brandt CT, Castro CMMB, Santana EM, Maciel DT, Lopes TL 1998. Esplenose após esplenectomia e auto-implante esplênico em crianças portadoras de hepatoesplenomegalia esquistossomótica e varizes sangrantes de esôfago: atividade da tuftsina. *An Fac Med Uni Fed Pernam* 43: 37-40.

9. Brandt CT, Maciel DT, Frei Caneca AO, Castro CMMB, Araújo LB 2001. Autotransplant of spleen tissue in children with schistosomiasis: Evaluation of splenic function after splenosis. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 96: 117-21.
10. Brandt CT, Braga MVM, Melo KL 2001. Surgical hepatosplenic mansonic schistosomiasis in adolescents: repercussions of the post-treatment schistosomiasis burden on the hepatic functional reserve. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 96: 113-115.
11. Brandt CT, Leite CRC, Castro RM, Brandt Filho C, Castro FMM, Castro CMMB 2003. Aderência e atividade microbicida de monócitos em portadores de esquistossomose mansônica na forma hepatoesplênica cirúrgica. *Acta Cir Bras* 18: 143-53.
12. Brandt CT, Leite CRC, de-Castro RM, Filho CB, de-Castro FMM, de-Castro CMMB 2005. Avaliação do efeito da esplenectomia e auto-implante esplênico sobre algumas funções de monócitos em crianças com esquistossomose mansônica. *Rev Soc Bras Med Trop* 38 (1):38-42.
13. Carlisle HN, Saslaw S 1959. Properdin levels in splenectomized persons. *Proc Soc Exp Biol Med* 102:150-55.
14. Cooper MJ, Williamson RCN 1984. Splenectomy: indications, hazards and alternatives. *Br J Surg* 71:173-180.
15. Coura JR, Amaral RS 2004. Epidemiological and control aspects of schistosomiasis in Brazilian endemic areas. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 99: 13-19.
16. D'Andrea A, Ma X, Aste-Amezaga M, Paganin C, Trinchieri G 1995. Stimulatory and inhibitory effects on the production of cytokines by human peripheral blood mononuclear cells: priming for IL-12 and tumor necrosis factor γ production. *J Exp Med* 181:537-546.

17. El-Shazly AM, Azab MS, elBeshhishi SN, el-Nahas HA, Abdel Magied AA, Abou el-Hasan M, Monib Mel-S, Morsy TA 2005. Some molecular aspects of schistosomiasis mansoni and toxoplasmosis. *J Egypt Soc Parasitol* 35: 795-808.
18. Fallon PG 1998. Schistosome resistance to praziquantel. *Drug Resist Updat* 1: 236-241.
19. Fallon PG 2000. Immunopathology of schistosomiasis: a cautionary tale of mice and men. *Immunol Today* 21:29-35.
20. Ferraz AAB, Lopes EPA, Barros FMR, Sette MJA, Arruda SMB, Ferraz EM 2001. Esplenectomia com ligadura da veia gástrica esquerda e desvascularização da grande curvatura do estômago no tratamento da esquistossomose hepatoesplênica. É necessária a escleroterapia endoscópica pós-operatória? *Arq Gastroenterol* 38(2): 84-88.
21. Galvão da Silva AP, Abrahamsohn IA 2001. Interleukin-12 stimulation of lymphoproliferative responses in *Trypanosoma cruzi* infection. *Immunology* 104: 349-54.
22. Johnston Jr RB 1984. Measurement of O_2^- secreted by monocytes and macrophages. *Methods in enzymology* 105:365-9.
23. Karakantza M, Theodorou GL, Mouzaki A, Theodori E, Vagianos C, Maniatis A 2004. *In vitro* study of the long-term effects of post-traumatic splenectomy on cellular immunity. *Scand J Immunol* 59:209-219.
24. Katz N, Peixoto SV 2000. Análise crítica da estimativa do número de portadores de esquistossomose mansoni no Brasil. *Rev Soc Bras Med Trop* 33:303-8.
25. Keller ET, Wanagat J, Ershler WB 1996. Molecular and cellular biology of interleukin-6 and its receptor. *Frontiers Bioscience* 1:340-357.

26. Kelner S 1992. Critical evaluation of surgical treatment of schistosomiasis portal hypertension. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 87: 357-68.
27. Khalil RM, Hultner L, Mailhammer R, Luz A, Moeller J, Mohamed AA, Omran S, Dormer P 1996. Kinetics of interleukin-6 production after experimental infection of mice with *Schistosoma mansoni*. *Immunology* 89: 256-61.
28. Kishimoto T 1989. The biology of interleukin-6. *Blood* 74(1): 1-10
29. Kobayashi M, Fitz L, Ryan M, Hewick R, Clark SC, Chan S Loudon R, Sherman F, Perussia B, Trinchieri G 1989. Identification and purification of natural killer stimulatory factor (NKSf), a cytokine with multiple biologic effects on human lymphocytes. *J Exp Med* 170:827-845.
30. Kuranaga N, Kinoshita M, Kawabata T, Shinomiya N, Seki S 2005. A defective Th1 response of the spleen in the initial phase may explain why splenectomy prevent a *Listeria* infection. *Clin Exp Immunol* 140(1):11-21.
31. Kyaw MH, Holmes EM, Toolis F, Wayne B, Chalmers J, Jones IG, Campbell H 2006. Evaluation of severe infection and survival after splenectomy. *Am J Med* 119: 1-7.
32. Lacerda CM, Freira W, Melo PSV, Carvalho GL, Kirzner CF 1998. Esplenectomia e ligadura da veia gástrica esquerda na esquistossomose mansônica: efeito sobre a pressão das varizes de esôfago aferida por técnica não invasiva. *Rev Col Bras Cir* 26: 15-9.
33. Leemans R, Beekhuis H, Timens W, Hauw The T, Klasen HJ 1996. Fc-receptor function after splenic autotransplantation. *Br J Surg* 83:543-6.
34. Leemans R, Harms G, Rijkers GT, Timens W 1999. Spleen autotransplantation provides restoration of functional splenic lymphoid compartments and improves the humoral immune response to pneumococcal polysaccharide vaccine. *Clin Exp Immunol* 117: 596-604.

35. Mahanty S, Nutman TB 1995. Immunoregulation in human lymphatic filariasis: the role of IL-10. *Parasite Immunol* 17:385-392
36. Marques RG, Petroianu A, Coelho JMC, Portela MC 2002. Regeneration of splenic autotransplants. *Ann Hematol* 81:622-626.
37. Miniello S, Testini M, Jirillo E, Piccini G, Urgesi G, Lissidini G, Angrisano A, Tomasicchio N, Bonomo GM 2002. Postsplenectomy immunodepression and its implications: an underestimated problem. *Int Surg* 87:245-251.
38. Moeniralam HS, Bemelman WA, Endert E, Koopmans R, Sauerwein HP, Romijn A 1997. The decrease in nonsplenic interleukin-6 (IL-6) production after splenectomy indicates the existence of a positive feedback loop of IL-6 production during endotoxemia in dos. *Infect Immun* 65(6): 2299-2305.
39. Morais CNL, Souza JR, de Melo WG, Aroucha ML, Domingues ALC, Wynn T, Abath FGC, Montenegro SML 2002. Studies on the production and regulation of interleukin, IL-13, IL-4 and interferon- γ in human schistosomiasis mansoni. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 97 (Suppl 1): 113-114.
40. Mountford AP, Shires VL, Anderson S 1998. Interleukin-12 and protective immunity to schistosomes. *Braz J Med Biol Res* 31: 163-69.
41. Mwatha JK, Kimani G, Kamau T, Mbugua GG, Ouma JH, Mumo J Fulford AJC, Jones FM, Butterworth AE, Roberts MB, Dunne DW 1998. High levels of TNF, soluble TNF receptors, soluble ICAM-1, and IFN- γ , but low levels of IL-5, are associated with hepatosplenic disease in human schistosomiasis. *J Immunol* 160: 1992-1999.
42. Naume B, Gately MK, Desai BB, Sundan A, Espevik T 1993. Synergistic effects of interleukin 4 and interleukin 12 on NK cell proliferation. *Cytokine* 5(1):38-46.

43. Norris RP, Vergis EN, Yu VL 1996. Overwhelming postsplenectomy infection. *Infect Med* 13:779-83.
44. Pancre V, Monte D, Delanoye A, Capron A, Auriault C 1990. Interleukin-6 is the main mediator of the interaction between monocytes and platelets in killing of *Schistosoma mansoni*. *Eur Cytokine Netw* 1: 15-9.
45. Panitsas FP, Mouzaki A 2004. Effect of splenectomy on type-1/type-2 cytokine gene expression in a patient with adult idiopathic thrombocytopenic purpura (ITP). *BMC Blood Disorders* 4:4.
46. Peraçoli MT, Kurokawa CS, Calvi SA, Mendes RP, Pereira PC, Marques AS, Soares AMVC 2003. Production of pro- and anti-inflammatory cytokines by monocytes from patients with paracoccidiomycosis. *Microbes Infect* 5:413-418.
47. Petroianu A, Petroianu L 2005. Splenic autotransplantation for treatment of portal hypertension. *J Can Chir* 48(5): 382386.
48. Prata A 2004. The role of scientific research in the control of schistosomiasis in endemic areas. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 99(Suppl 1): 5-11).
49. Sher A, Fiorentino D, Caspar P, Pearce E, Mosmann T 1991. Production of IL-10 by CD4⁺ T lymphocytes correlates with down-regulation of Th1 cytokine synthesis in helminth infection. *J Immunol* 147: 2713-2716.
50. Shokouh-Amiri MH, Kharazami A, Rahimi-Saber S, Hansen CP, Jensen SL 1990. Phagocyte function after splenic autotransplantation. *Arch Surg* 125:595-7.
51. Sipka S, Bráth E, Tóth FF, Aleksza M, Kulcsár A, Fábian A, Baráth S, Balogh P, Sipka S, Furka I, Mikó I 2006. Cellular and serological changes in the peripheral blood of splenectomized and spleen autotransplanted mice. *Transplant Immunology* 16:99-104.

52. Torres MB, Vega VL, Bedri M, Saad D, Trentzsch H, Reeves RH, De Maio A 2005. IL-10 plasma levels are elevated after LPS injection in splenectomized A/J mice. *J Surg Research* 129, 101-106.
53. Tovey MG, Content J, Gresser I, Gugenheim J, Blanchard B, Guymarko J 1988. Genes for IFN- γ -2 (IL-6), tumor necrosis factor, and IL-1 are expressed at high levels in the organs of normal individuals. *J Immunol* 141:3106-3110.
54. Tracey KJ, Lowry SF 1990. The role of cytokine mediators in septic shock. *Adv Surg* 23:21-56.
55. Traub A, Giebink GS, Smith C, Kuni C, Brekke ML, Edlund D, Perry J 1987. Splenic reticuloendothelial function after splenectomy, spleen repair and spleen auto-transplantation. *New Engl J Med* 317:1159-64.
56. Trinchieri G 1994. Interleukin-12: a cytokine produced by antigen-presenting cells with immunoregulatory functions in the generation of T-helper cells type 1 and cytotoxic lymphocytes. *Blood* 84(12): 4008-4027.
57. Trinchieri G, Gerosa F 1996. Immunoregulation by interleukin-12. *J Leuco Biol* 59: 505-511.
58. Van Snick J 1990. Interleukin-6: an overview. *Annu Rev Immunol* 8:253-278.
59. Wynn TA, Eltoun I, Cheever AW, Lewis FA, Gause WC, Sher A 1993. Analysis of cytokine mRNA expression during primary granuloma formation during induced by eggs of *Schistosoma mansoni*. *J Immunol* 151:1430-1440.
60. Wynn TA, Eltoun I, Oswald IP, Cheever AW, Sher A 1994. Endogenous interleukin 12 (IL-12) regulates granuloma formation by eggs of *Schistosoma mansoni* and exogenous IL-12 both inhibits and prophylactically immunizes against egg pathology. *J Exp Med* 179: 1551-61.

61. WHO – World Health Organization 1993. *The Control of Schistosomiasis*, Technical Report Series, 83, 86pp.

TABELAS

TABLE I: Mean levels of IL-6 produced by PBMC ($\mu\text{g/ml}$) of the four groups.

Groups	Mean ? SD
Carriers of hepatosplenic schistosomiasis mansoni (SMH/G1)	468.0 ? 198.0
Splenectomized patients (SMH/SLGV/G2)	628.6 ? 23.4
Spleen tissue auto implanted patients (SMH/SLGV/AI/G3)	632.9 ? 12.8
Health individuals (CG/G4)	639.2 ? 32.2

TABLE II: Comparison between means of IL-6 production by four groups

Comparison*	Mean difference	Q	P value
CG vs SMH/SLGV/AI	4,863	0,820	p > 0.05
CG vs SMH/SLGV	7,600	1,168	p > 0.05
CG vs SMH	28,808	4,332	p < 0.05
SMH/SLGV/AI vs SMH/SLGV	2,737	0,443	p > 0.05
SMH/SLGV/AI vs SMH	23,945	3,782	p < 0.05
SMH/SLGV vs SMH	21,208	3,085	p < 0.05

* Dunn multiple comparison test

TABLE III: Mean levels of IL-12 produced by PBMC ($\mu\text{g/ml}$) of the four groups.

Groups	Mean ? SD
SMH	4.6 ? 2.3
SMH/SLGV	1.3 ? 0.6
SMH/SLGV/AI	1.7 ? 1.3
CG	2.2 ? 1.0

TABLE IV: Comparison between means of IL-12 production by four groups

Comparison*	Mean difference	Q	P value
CG vs SMH/SLGV/AI	8,505	1,474	p > 0.05
CG vs SMH/SLGV	13,092	2,068	p > 0.05
CG vs SMH	18,308	2,830	p < 0.05
SMH/SLGV/AI vs SMH/SLGV	4,587	0,763	p > 0.05
SMH/SLGV/AI vs SMH	26,814	4,353	p < 0.05
SMH/SLGV vs SMH	31,401	4,695	p < 0.05

* Dunn multiple comparison test

DISCUSSÃO GERAL

Do ponto de vista clínico, o auto-implante de tecido esplênico pode ter contribuído, no grupo de estudo, para redução da prevalência e da taxa de mortalidade associada à SFPE, desde a instituição do protocolo de tratamento das crianças portadoras de EHE, no SCGC do HC/UFPE, em 1990, constituído de esplenectomia, ligadura da veia gástrica esquerda e auto-implante de tecido esplênico em bolsa no omento maior. Historicamente, esta taxa no serviço era de 40%, o que tornava quase proibitivo esta forma de tratamento. Desde o início do protocolo até 2006, já foram tratadas 121 crianças, com uma taxa de mortalidade de 3,1%.

Entretanto, apesar de vários trabalhos na literatura mostrarem o benefício deste procedimento na prática clínica, ainda há quem ponha em dúvida a sua importância na manutenção da função imunológica do baço. De fato, alguns casos de SFPE têm sido descritos em pacientes com evidência de tecido esplênico heterotópico ou regenerado, tanto em adultos quanto em crianças, mostrando que o auto-implante esplênico não garante proteção efetiva contra a sepse²⁹. Para ratificar este fato, Smith *et al* mostraram que o auto-implante esplênico em ratos não restaurou, *in vitro*, a capacidade fagocítica após esplenectomia³⁰.

Estas controvérsias na literatura fazem com que este procedimento permaneça sob constante investigação, justificando, assim, estudos dessa natureza.

O grupo de estudo deste trabalho (Grupo EHE/ELGE/AI/G3) foi composto de 19 pacientes portadores de esquistossomose mansônica na forma hepatoesplênica, submetidos à esplenectomia, ligadura da veia gástrica esquerda e auto-implante esplênico, entre 1991 e 2005, no SCGC do HC/UFPE, com idades variando entre 16 e 25 anos e média de $20,2 \pm 3,6$. Foram excluídos deste grupo pacientes com antígeno positivo para hepatite viral, pacientes com história de uso abusivo de bebidas alcoólicas e/ou com biópsia hepática com lesões sugestivas de doença hepática alcoólica, pacientes em tratamento com imunossuppressores ou

estimulantes do sistema imunológico durante o período do estudo e pacientes com doenças hematológicas.

Os grupos de referência foram constituídos por 12 pacientes portadores de esquistossomose mansônica na forma hepatoesplênica sem nenhuma forma de tratamento, com idades entre 10 e 30 anos e média de $20,0 \pm 5,1$ (grupo clínico de referência – EHE/G1), atendidos no SCGC do HC/UFPE, e por 13 pacientes similares aos pacientes do G1, mas submetidos, no Serviço de Cirurgia Geral do HC/UFPE à esplenectomia, ligadura da veia gástrica esquerda e desvascularização da grande curvatura gástrica (grupo cirúrgico de referência – EHE/ELGE/G2), com idades entre 18 e 30 anos e média de $24,6 \pm 3,4$. Os critérios de exclusão foram os mesmos do grupo de estudo.

O grupo controle (CT/G4) foi formado por 15 indivíduos saudáveis, com exame físico normal (grupo CT/G4), todos alunos da Escola Estadual Jader de Andrade, em Timbaúba – PE, com idades variando entre 15 e 28 anos e média de $19,3 \pm 4,3$. Foram excluídos deste grupo indivíduos com doenças associadas, positividade de coproparasitológico para *S. mansoni* (técnica qualitativa de Hofmann, Pons e Janner) e antecedentes de banho de rio.

A análise de variância (ANOVA) das idades mostrou diferença entre os grupos ($F = 4,817$; $p = 0,005$) e, em função da normalidade dos dados, foi empregado o teste de Tukey-Kramer para localizar estas diferenças. Assim, diferenças estatisticamente significantes foram observadas entre os grupos G2 e G1 ($q = 3,980$; $p < 0,05$), G2 e G3 ($q = 4,275$; $p < 0,05$) e G2 e G4 ($q = 4,812$; $p < 0,05$), revelando, portanto, uma média de idade significativamente maior no grupo de pacientes esplenectomizados sem autoimplante esplênico. A justificativa para este fato é que os pacientes deste grupo foram oriundos do Serviço de Cirurgia Geral do HC/UFPE, cuja população alvo são os maiores de 18 anos, e onde procedimento do autoimplante esplênico não é rotina. Esta talvez tenha sido uma limitação do presente estudo, porém, não se conhece na literatura pesquisada interferência do fator etário nas variáveis

estudadas neste tipo de paciente (esplenectomizado), razão pela qual julgamos que este fato não deva ser considerado como um fator que possa ter interferido grosseiramente nos resultados.

A decisão de avaliar a atividade funcional dos monócitos neste trabalho partiu do princípio de que estas células representam as principais apresentadoras de antígenos, são os maiores alvos celulares para o efeito das endotoxinas e secretam mediadores cruciais no processo infeccioso, como o óxido nítrico e as interleucinas 6 e 12¹⁵.

Assim, a *primeira variável* estudada foi a geração do ³NO pelos monócitos, cujos níveis (Anexo IX) foram determinados de maneira indireta, usando um ensaio que mensura a produção de um dos seus metabólitos, o nitrito (NO₂⁻), como descrito por Green *et al* em 1982 (GREEN)³¹. Seus níveis foram expressos em ³mol/ml.

A análise desta produção demonstrou níveis crescentes nos quatro grupos estudados: EHE (esquistossomóticos, na forma hepatoesplênica, não tratados), EHE/ELGE (esplenectomizados), EHE/ELGE/AI (auto-implantados) e CT (controles). Assim, os monócitos do grupo EHE são os que produziram menores quantidades de ³NO e ao contrário, a maior geração deste radical livre foi observada no grupo CT, porém diferença formalmente significativa só foi observada entre os grupos CT e EHE e EHE/ELGE/AI e EHE. Os níveis de ³NO dos pacientes dos grupos CT e EHE/ELGE/AI foram estatisticamente semelhantes.

Com estes resultados, é possível inferir que os monócitos dos pacientes esplenectomizados e daqueles com fragmentos de baço auto-implantados são capazes de gerarem ³NO em quantidades que parecem simular a cinética de produção dos indivíduos saudáveis. Estes resultados apontam, assim, para o restabelecimento da normalidade da produção deste radical pelos monócitos do sangue periférico dos portadores de EHE que receberam tratamento clínico e se submeteram ao tratamento cirúrgico, especialmente, aqueles que receberam auto-implante de fragmentos de tecido esplênico no omento maior após

esplenectomia e ligadura da veia gástrica esquerda. Apesar de cinco pacientes (26,3%) do grupo EHE/ELGE/AI apresentarem no seguimento pós-operatório ovos viáveis no oograma, indicando possivelmente uma reinfecção, um segundo tratamento médico destes pacientes com praziquantel, na dose única de 40mg/Kg de peso, pode ter contribuído para a função imune normal, uma vez que a mesma tem relação direta com a boa reserva funcional hepática.

Entretanto, foi demonstrado, neste mesmo grupo de pacientes, que a esplenectomia reduz a produção de outro produto tóxico oxidativo, o O_2^{-2} , cujos níveis só são normalizados após o auto-implante de tecido esplênico²¹. Da mesma forma, tem sido mostrado que a esplenectomia afeta a distribuição das subpopulações de LT no sangue periférico, caracterizada por uma diminuição no número absoluto ou na percentagem das células T $CD4^+$ e uma redução na proporção $CD4^+/CD8^+$. Este fato é justificado pela ausência do baço como um reservatório de linfócitos circulantes³². Assim, baseado neste trabalho, no grupo EHE/ELGE seria esperada uma redução da produção de 3NO , já que a diminuição da subpopulação de linfócitos T $CD4^+$, induzida pela esplenectomia, pode determinar uma baixa produção de citocinas T_H1 , que estimulam o fagócito mononuclear a produzirem radicais como o 3NO . Esta hipótese, entretanto, não é aceita por Westermann *et al*, que mostraram que tanto a esplenectomia quanto o auto-implante esplênico causaram linfocitose nos pacientes³³.

Nossos resultados diferiram do estudo de McCarthy *et al*, realizado em 1995. Estes autores, comparando grupos de ratos adultos, controles, esplenectomizados e outro grupo submetido a operações simuladas (*sham*), avaliaram defeitos na função dos macrófagos peritoneais no período precoce da esplenectomia e verificaram que houve redução da liberação de 3NO , leucopenia e redução da atividade microbicida intracelular 24h após o procedimento, quando comparada aos controles⁷. Mas deve ser levado em consideração que este foi um estudo realizado em modelos murinos e em macrófagos não esplênicos, o que pode conduzir a resultados diversos.

Em relação à produção baixa de ^2NO pelos monócitos dos pacientes do grupo EHE, trata-se de um achado que pode estar relacionado a vários fatores.

A infecção por helmintos, como o *S. mansoni*, tipicamente induz uma resposta T_H2 , caracterizada pela produção de citocinas antiinflamatórias como a IL-4, IL-10 e IL-13³⁴. Esta resposta T_H2 foi, durante algum tempo, considerada prejudicial ao hospedeiro, mas na verdade ela é protetora do mesmo. De fato, na ausência de uma resposta T_H2 , a resposta inflamatória e a produção de ^2NO ocorrem de modo não regulado, sendo responsável pelo aumento da morbidade nos hospedeiros infectados. Assim, uma função importante desta resposta que se desenvolve durante a infecção é regular a produção de ^2NO ³⁵.

Portanto, o primeiro fator relacionado aos resultados seria uma inibição da produção de IFN- γ , mediada pela IL-4 e IL-10, o padrão bioquímico que caracteriza a fase crônica da doença. Hoje se sabe que o IFN- γ é uma citocina que estimula a liberação do ^2NO *in vitro*³⁶. Esta redução na geração de ^2NO foi também encontrada recentemente por Bocca *et al* durante a cromoblastomicose, uma infecção fúngica causada pelo parasita *Fonsecaea pedrosoi*. Estes autores demonstraram que os macrófagos dos portadores desta doença são incapazes de produzir ^2NO , mesmo após estímulo com LPS e IFN- γ ³⁷. Além disso, tem sido especulado que o ^2NO produzido por células T_H1 pode contra-regular a resposta destas próprias células de modo autócrino e ao mesmo tempo promover a resposta T_H2 , fato que ajuda a compreender o mecanismo descrito acima³⁸.

O segundo fator seria uma inibição da atividade da enzima NOS nestes pacientes, como consequência de uma competição, pelo mesmo substrato (L-arginina), com outra enzima, a arginase I, relacionada ao desenvolvimento da fibrose hepática na infecção esquistossomótica³⁹. A arginase I é uma enzima expressa em altos níveis nos hepatócitos e hidrolisa a L-arginina em uréia e ornitina. A ornitina é um metabólito necessário para a produção de poliaminas e prolina que controlam a proliferação celular e a produção do

colágeno, respectivamente. A evidência mais patente disto pode ser observada no trabalho de Chang *et al*, no qual foi demonstrado que a arginase modula a produção de ^2NO pelos macrófagos, e este mecanismo é particularmente importante quando o suprimento extracelular de L-arginina está limitado⁴⁰.

Finalmente, pode ser cogitado que em função da resposta T_H2 nestes pacientes crônicos, haveria liberação de IL-4, citocina que inibe a ativação dos macrófagos e contraregula a atividade da enzima NOS, suprimindo a liberação de ^2NO por estas células, fato muito bem documentado pelo trabalho de Bogdan *et al*⁴¹.

La Flamme *et al* concluíram que na ausência de IL-4, ratos infectados com o *S. mansoni* manifestaram maior dano hepático, e este dano estava associado com a superprodução de O_2^{2-} e ONOO^- pelas células dentro do granuloma e de NO^2 pelos hepatócitos. Ao contrário, o tratamento dos ratos com IL-4 resultou em uma diminuição do prejuízo hepático e uma prolongada sobrevida, sugerindo que a IL-4 tem um papel importante na prevenção do dano oxidativo no fígado durante a infecção esquistossomótica⁴².

Entretanto, nossos resultados não estão de acordo com o estudo de Dunne *et al*, conduzido em pacientes com a forma hepatoesplênica da esquistossomose mansônica, nos quais foram encontrados níveis elevados tanto de ^2NO como de $\text{IFN-}\gamma$ ⁴³. Entretanto, Abo-Shousha *et al* demonstraram que os níveis de ^2NO são altos na fase aguda da doença e baixos no estágio crônico⁴⁴. Recentemente, foi demonstrado que as células mononucleares do sangue periférico de pacientes infectados com o *S. mansoni* são capazes de induzir a produção de ^2NO *in vitro*, e que a inibição desta produção é responsável pela exacerbação da reação granulomatosa⁴⁵.

A segunda variável estudada foi a atividade da SOD pelos monócitos. Esta metaloenzima é responsável pela dismutação do radical O_2^{2-} , transformando-o em outro produto microbicida, o peróxido de hidrogênio. Neste estudo, os seus níveis (Anexo IX)

foram determinados como unidade de SOD/mg de proteína usando um ensaio que mensura a diferença entre a redução do ferricitocromo C pelo $O_2^{-\cdot}$, gerado pelo sistema xantina-xantina-oxidase, e a inibição desta redução pela SOD extraída de eritrócitos bovinos, como descrito por Corbisier *et al*, em 1987⁴⁶.

A análise da produção de SOD pelos monócitos do sangue periférico demonstrou níveis decrescentes nos quatro grupos estudados (EHE, EHE/ELGE, EHE/ELGE/AI e CT), mas diferenças formalmente significantes só foram observadas entre os grupos EHE e CT e EHE/ELGE e CT. A atividade mais baixa da SOD foi observada nos indivíduos sadios, semelhante estatisticamente à atividade da enzima nos pacientes do grupo EHE/ELGE/AI.

Achados semelhantes foram encontrados por Imai *et al*. Estes autores demonstraram que a atividade da SOD hepática foi significativamente maior em ratos esplenectomizados do que nos controles, o mesmo não ocorrendo com outros sistemas enzimáticos antioxidativos, como o glutathion-peroxidase e a catalase. A conclusão deste estudo é que a esplenectomia pode atenuar a peroxidação lipídica, causada pelo $ONOO^{-\cdot}$, em função da diminuição das reservas de $O_2^{-\cdot}$ ⁴⁷.

Os resultados do nosso trabalho podem explicar, por um lado, a redução da geração do ânion $O_2^{-\cdot}$ nos pacientes esplenectomizados, e por outro, a manutenção da produção deste radical nos indivíduos sadios e nos pacientes com fragmentos auto-implantados de baço como demonstrado por Brandt *et al*, em 2005, em estudo realizado no mesmo grupo de doentes²¹. A esse respeito, Mizukami *et al* também demonstraram que a esplenectomia em ratos reduz a liberação de $O_2^{-\cdot}$ dentro dos sinusóides hepáticos⁴⁸. Esta dicotomia da atividade da SOD e da produção do $O_2^{-\cdot}$ nos pacientes esplenectomizados e auto-implantados pode ser a responsável pela ocorrência e redução da SFPE nestes doentes, respectivamente.

Entretanto, os resultados do nosso trabalho estão, de certa forma, em discordância com a avaliação de outro sistema enzimático envolvido na explosão respiratória, feita em

pacientes esplenectomizados por trauma esplênico. Nesse grupo de pacientes, foi observada diminuição da atividade intracelular da mieloperoxidase, uma enzima presente nos grânulos azurófilos dos monócitos e que potencializa fortemente a ação do H_2O_2 , conhecidamente um agente oxidativo usado pelos fagócitos para matar as bactérias⁴⁹. Mas é preciso levar em consideração que estas enzimas envolvidas no estresse oxidativo podem ser reguladas por mecanismos diferentes.

A maior atividade da SOD foi observada nos monócitos dos pacientes do grupo EHE. Este achado pode justificar a cronicidade da infecção, pela dismutação (detoxificação) rápida do $O_2^{\cdot-}$ produzido pelos macrófagos em resposta à infecção esquistossomótica, um possível mecanismo usado pelo parasita para escapar da ação oxidativa deste radical⁵⁰. De fato, alguns estudos mostraram que a morte de muitas bactérias foi evitada pela SOD⁵¹.

Da mesma forma, Larrea *et al* avaliaram a atividade da Mn-SOD em pacientes portadores de hepatite crônica por vírus C, demonstrando uma superexpressão desta enzima nas células mononucleares do sangue periférico⁵². Estes achados pode sugerir um possível papel da SOD no mecanismo de sobrevivência do parasita nas infecções crônicas.

Nossos resultados estão, de certa forma, em consonância com o estudo de Shaheen *et al* que avaliaram a atividade da SOD em ratos infectados com *S. mansoni* e verificaram que a atividade desta enzima estava aumentada no fígado, mas não no baço⁵³.

Tem sido demonstrado também que a superexpressão da MnSOD em células de insulinoma resulta em uma marcante redução da produção de 1NO , um achado correlacionado com a redução dos níveis da forma induzível da NOS⁵⁴. Este fato pode justificar a baixa produção de 1NO nos nossos pacientes esquistossomóticos, como demonstrado anteriormente.

Finalmente, foi estudada como *terceira variável* a produção de duas citocinas (IL-6 e IL-12) secretadas pelas células monocíticas/macrofágicas em resposta a uma variedade de estímulos, incluindo o LPS, e que são importantes na defesa do hospedeiro. Os níveis de IL-6

e IL-12 (Anexo IX) foram determinados pelo método de *Enzyme-Linked Immunosorbent Assays* (ELISA), usando um kit comercial, conforme instruções do fabricante e os seus níveis foram expressos em $\mu\text{g/ml}$.

Em relação à produção de IL-6 pelos monócitos do sangue periférico foram demonstrados níveis crescentes nos quatro grupos estudados (EHE, EHE/ELGE, EHE/ELGE/AI e CT), mas nenhuma diferença formal foi observada entre os grupos EHE/ELGE, EHE/ELGE/AI e CT.

Os resultados indicam uma capacidade normal de geração da IL-6 pelos monócitos dos pacientes desses três grupos e, portanto, demonstram que a cinética de geração desta citocina não se altera após a esplenectomia com ou sem auto-implante esplênico ou, em outras palavras, que a produção de IL-6 pode não ser exclusiva do baço. De fato, Tovey *et al* detectaram altos níveis da IL-6 no fígado, rim e leucócitos do sangue periférico de indivíduos normais⁵⁵. Desta forma, a produção normal de IL-6 nestes pacientes pode ser creditada aos macrófagos esplênicos e/ou às células de Kupffer, os macrófagos hepáticos.

Entretanto, Moeniralam *et al* demonstraram que a esplenectomia em cães induziu a diminuição de IL-6, mas essa redução não foi causada pela ausência da produção de IL-6 esplênica, e sim por uma diminuição da produção da IL-6 fora do baço, cuja principal fonte é o fígado⁵⁶. Uma possível explicação para isso é que a esplenectomia inibe fortemente o aumento do número de células de Kupffer, como normalmente ocorre após infecção devida à migração dos macrófagos esplênicos para o fígado⁵⁷.

Um mecanismo que pode estar implicado nesta produção normal de IL-6 pelos monócitos desses pacientes é a ação do TNF- α sobre esta citocina. De fato, o TNF- α é o maior indutor fisiológico na síntese e secreção de IL-6 por diversas células em resposta a um estímulo, como o LPS⁵⁸. Os achados de Brandt *et al*, em 2005, avaliando a produção de TNF- α neste mesmo grupo de doentes, também sem diferença estatística, confirma esta hipótese²¹.

Corroborando estes resultados, foi demonstrado que a produção de IL-6 e TNF- α por macrófagos peritoneais de ratos estimulados pelo LPS foi estatisticamente semelhante após a esplenectomia quando comparada ao grupo de ratos não operados ou submetidos a operações *sham*⁵⁹.

Ao mesmo tempo, a produção normal de IL-6 nestes pacientes pode justificar os resultados do estudo de Brandt *et al*, realizado em 1993. Estes autores avaliaram a síntese de imunoglobulinas em pacientes esquistossomóticos hepatoesplênicos submetidos à esplenectomia e auto-implante esplênico, e verificaram a manutenção dos níveis de IgG e IgM e aumento da produção de IgA no período pós-operatório⁹. Como se sabe, a IL-6 induz a diferenciação dos LB, podendo aumentar a produção de anticorpos, especialmente as imunoglobulinas G, M e A.

Por outro lado, uma baixa produção pelos monócitos dos pacientes esquistossomóticos crônicos (EHE) foi nitidamente revelada e estatisticamente diferente da produção dos outros três grupos.

Tem sido demonstrado que um padrão de citocina T_H2 domina a resposta imune em humanos cronicamente infectados pelo *S. mansoni*. Nestes pacientes, a formação dos granulomas em torno dos ovos do parasita é mediada pelas células T CD4⁺, e explicada pela inibição clássica da ativação dos macrófagos, mediada principalmente pela IL-4, IL-10 e IL-13⁶⁰. De fato, infecção de humanos pelo *S. mansoni* é caracteristicamente associada com níveis aumentados de IgE e eosinofilia, próprios da resposta das citocinas T_H2^{61,62}.

Além disso, tem sido demonstrado por vários autores que os mecanismos regulatórios são diferentes nas infecções aguda e crônica, caracterizados por uma produção de IFN- γ , na infecção precoce, e de liberação de IL-10, na doença tardia, sugerindo, portanto, um papel contra-regulador entre as citocinas T_H1 e T_H2 na esquistossomose mansônica humana^{63,64,65}. Ratificando estes achados, Booth *et al* também mostraram que os baixos níveis

de IFN- γ , produzidos pelos monócitos do sangue periférico, estimulados pelos antígenos solúveis dos ovos, são associados com a presença de fibrose hepática severa⁶⁶.

Considerando tudo isto, os níveis diminuídos de IL-6 (citocina T_H2) no grupo EHE não refletiram o padrão de resposta imune observada na infecção crônica, com predomínio de citocinas T_H2, em detrimento de citocinas T_H1, e isso pode ser explicado por vários mecanismos.

Primeiro, tem sido demonstrado que a IL-12 é capaz de inibir a supressão da resposta T_H1, e isso tem efeito na produção de IFN- γ , uma citocina que ativa a capacidade destrutiva dos macrófagos⁶⁷. Montenegro *et al* observaram uma restauração da produção de IFN- γ nas culturas de células esplênicas de pacientes com EHE, após o tratamento com IL-12⁶⁴. Os níveis aumentados da IL-12 nos nossos pacientes esquistossomóticos, como será visto adiante, corroboram esta possibilidade.

Um segundo mecanismo é a inibição da síntese de IL-6 pelos monócitos/macrófagos ativados destes pacientes, coordenada pela IL-10 (T_H2), como pode ser observado em outras doenças, como a paracoccidiomicose. Isso viria a comprovar o papel central da IL-10 na modulação da resposta inflamatória, representado por um importante *feedback* negativo na produção excessiva de outras citocinas antiinflamatórias, como a IL-6⁶⁸.

Finalmente, pode também ser especulado que nem sempre na EHE um padrão de citocina T_H2 domina a resposta imune. De fato, evidências sugerem que a doença hepatoesplênica pode estar associada também com resposta tipo T_H1, dependendo de outros fatores imunológicos⁶².

Morais *et al* encontraram quantidades maiores de IFN- γ nos pacientes crônicos hepatoesplênicos, em comparação com os pacientes agudos, com uma diferença estatisticamente significativa, revelando um padrão de citocina do tipo T_H1 nesta fase da doença⁶⁹.

No estudo de Mwatha *et al*, conduzido na África, pacientes com a forma hepatoesplênica da doença apresentaram níveis aumentados de TNF- α e IFN- γ , com baixos níveis de IL-5, quando comparados aos pacientes sem acometimento hepatoesplênico. Entretanto, os próprios autores não afastam a possibilidade de infecção malárica associada nesta população, que é uma conhecida causa de hepatoesplenomegalia, o que explicaria o padrão inverso de liberação de citocina neste estudo⁷⁰.

Conjuntamente, esses resultados da produção de IL-6 nos pacientes portadores de esquistossomose mansônica na forma hepatoesplênica demonstram que, apesar da presença de uma resposta predominantemente tipo T_H2 nos humanos infectados pelo *S. mansoni*, não há atualmente evidências claras que sugiram que a imunopatologia da doença crônica seja dirigida para as citocinas T_H2.

Esses resultados discordantes com a maioria dos trabalhos da literatura também podem ser explicados pelas diferenças nos estágios da doença, mas também pelo fato de que muitas variáveis podem influenciar a magnitude da resposta imune na esquistossomose mansônica como, por exemplo, a intensidade da infecção. Assim, aumento da idade está associado com um aumento da resposta imune T_H1 e infecções com carga parasitária alta (mais do que 200 ovos/grama de fezes) estão associadas com aumento da resposta T_H2^{71,72}.

Outras possíveis explicações responsáveis pelos achados seriam a influência na resposta imune de outras parasitoses, que comumente estão associadas à esquistossomose no nosso grupo de doentes, pelas condições precárias de habitação e saneamento, mas também ao efeito da droga não ter sido completamente eficaz na erradicação da doença, permitindo, assim, a manutenção de carga parasitária residual.

Em relação à produção de IL-12 pelos monócitos do sangue periférico foram demonstrados níveis estatisticamente maiores no grupo EHE em relação aos outros três

grupos estudados (EHE/ELGE, EHE/ELGE/AI e CT) que, ao contrário, não mostraram diferenças formais entre si na produção desta citocina.

A liberação similar de IL-12 nestes três grupos novamente revela que a produção desta citocina mantém-se preservada após esplenectomia, com ou sem auto-implante esplênico, ou, da mesma forma, pode demonstrar que a produção da IL-12 é independente da secreção exclusiva dos macrófagos esplênicos. Apesar desses achados, tem sido demonstrado que a esplenectomia promove alteração no equilíbrio entre as subpopulações de linfócitos T helper, geralmente caracterizada por uma inibição da resposta de citocinas T_H1 , como o IFN- γ , IL-2 e IL-12^{73,74}.

Panitsas *et al* demonstraram também um balanço T_H1/T_H2 marcadamente reduzido sete meses após a esplenectomia em um paciente portador de púrpura trombocitopênica idiopática, caracterizado por uma diminuição de IL-2 e IFN- γ e aumento de IL-4, IL-5 e IL-10⁷⁵.

Esta dicotomia T_H1/T_H2 foi observada em nosso trabalho, que revelou níveis altos de IL-6 se comparados aos níveis de IL-12, possivelmente uma consequência dos mecanismos contra-regulatórios entre estas duas citocinas. Em relação a isso, um dado importante que merece consideração é que tem sido mostrado que a produção pelos monócitos/macrófagos de uma variedade de citocinas, incluindo a IL-12, pode ser inibida pela ação do γ NO, por mecanismos ainda desconhecidos⁷⁶. Esta hipótese pode ser sustentada pelo achado de altos níveis de γ NO nestes três grupos de doentes, sem diferença estatística como demonstrado anteriormente.

Os resultados de uma superprodução de IL-12 nos pacientes esquistossomóticos crônicos também não estão de acordo com os dados da literatura, se consideramos o padrão clássico de liberação de citocinas, com predomínio da resposta T_H2 . Assim, baseada na dicotomia T_H1/T_H2 , era de se esperar uma diminuição na produção de IL-12, uma citocina

tipo T_H1 . O que corrobora esta afirmação é a inibição dos efeitos da IL-12 promovida pela IL-10, IL-4 e o TGF- β , todas citocinas T_H2 ⁷⁷.

Duas razões, entretanto, podem explicar estes achados. Primeiro, já está provado que a IL-12 não é uma citocina necessariamente obrigatória para manutenção de uma resposta T_H1 *in vivo*⁷⁸. E segundo, foi demonstrado que a IL-4 pode ter um efeito sinérgico com a IL-12 na indução da atividade proliferativa das células CD56⁺⁷⁹.

D'Andrea *et al* mostraram que o pré-tratamento de células mononucleares do sangue periférico com IL-4 e IL-13 por 20 horas fez aumentar a produção de IL-12 em resposta ao *Staphylococcus aureus* ou ao LPS⁷⁸. Portanto, isso pode ser uma possível explicação para os nossos resultados, ou seja, uma liberação maior de IL-12 mediada pela IL-4 neste grupo de doentes cronicamente infectados pelo *S. mansoni*. Mas é preciso dizer que esse achado é particularmente surpreendente porque a IL-12 e a IL-4 são conhecidas por terem papel antagônico no desenvolvimento das respostas imunes T_H1 e T_H2 , respectivamente.

Além disso, deve ser levado em consideração que a IL-12, por ser responsável pelo desenvolvimento da resposta T_H1 , geralmente protege o organismo dos parasitas intracelulares, mas é ineficaz contra outros parasitas, como os helmintos patogênicos⁷⁷. Assim, essa produção aumentada da IL-12 pode demonstrar uma resposta das células NK à infecção pelo *S. mansoni* em uma tentativa de produção de IFN- γ necessária à ativação dos macrófagos. Entretanto, como se sabe, este parasita é extracelular, e dessa forma, esta resposta pode não produzir os efeitos necessários, qual seja a destruição e morte do patógeno, possivelmente contribuindo para a cronicidade da infecção.

Conjuntamente, a manutenção dos níveis normais, quando comparado ao grupo controle, da produção de IL-6 e IL-12, nos pacientes portadores de esquistossomose mansônica na forma hepatoesplênica, que receberam tratamento clínico-cirúrgico é um indicativo que a atividade das células mononucleares do sangue periférico após

esplenectomia, com ou sem auto-implante esplênico, mantém-se preservada, em relação à produção destas duas citocinas.

Os resultados obtidos neste trabalho, entretanto, demonstram que existe uma grande variabilidade no perfil de respostas imunes em humanos e que não há ainda um consenso sobre a produção de citocinas e de moléculas envolvidas nos stress oxidativo e nitrosativo liberadas pelos macrófagos durante a esquistossomose mansônica, assim como após a esplenectomia e auto-implante esplênico. A falta de uniformidade entre os resultados dos diferentes trabalhos pode ser devida à heterogeneidade das amostras que podem implicar mecanismos patogênicos muito diferentes. Um exemplo disso é a possibilidade de reinfecção dos nossos doentes após a cura parasitológica, já que este fato é muito comum nas áreas endêmicas, principalmente em crianças.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

CONCLUSÕES

Os resultados obtidos, nas condições de trabalho apresentadas, permitem concluir que:

1. A produção de óxido nítrico pelos monócitos do sangue periférico dos pacientes submetidos ao auto-implante esplênico foi semelhante a dos pacientes esplenectomizados e indivíduos saudáveis, e maior do que a dos pacientes esquistossomóticos hepatoesplênicos não tratados. Este grupo apresentou níveis significativamente menores, quando comparados aos indivíduos saudáveis;
2. Os níveis de interleucina 6 pelos monócitos do sangue periférico dos pacientes submetidos ao implante heterotópico do baço não mostraram nenhuma diferença formal em relação aos pacientes esplenectomizados e os indivíduos saudáveis. Níveis significativamente mais baixos foram observados nos pacientes esquistossomóticos hepatoesplênicos não tratados, em comparação com os outros três grupos;
3. A liberação de interleucina 12 pelos monócitos do sangue periférico dos pacientes com fragmentos de baço auto-implantados foi semelhante à dos pacientes esplenectomizados e dos indivíduos saudáveis. Liberação significativamente mais elevada ocorreu nos pacientes esquistossomóticos hepatoesplênicos não tratados, quando comparada aos outros três grupos;
4. A atividade da enzima superóxido dismutase pelos monócitos do sangue periférico dos pacientes submetidos ao auto-implante esplênico foi semelhante à dos indivíduos saudáveis. Esta atividade foi significativamente maior nos pacientes esquistossomóticos hepatoesplênicos não tratados e nos esplenectomizados, em comparação com os indivíduos saudáveis.

RECOMENDAÇÕES

A esquistossomose mansônica está associada à pobreza e ao baixo desenvolvimento econômico, que obriga a utilização de águas naturais contaminadas para o exercício da agricultura, trabalho doméstico e/ou lazer².

A região Nordeste é a que apresenta a maior prevalência do Brasil, sendo que mais de 90% dos pacientes infectados apresentam a forma leve e moderada, e cerca de 4% a 10% a forma grave, hepatoesplênica¹.

No Estado de Pernambuco, houve redução das formas graves da esquistossomose mansônica, resultado do Programa Especial de Controle da Esquistossomose (PECE), implantado na região Nordeste entre 1975 e 1979, com tratamento clínico em larga escala, e, mais recentemente, do Programa de Controle das Doenças Endêmicas do Nordeste (PCDEN), a partir de 1990. Porém, uma recente análise geográfica temporal neste Estado revelou um aumento do número de regiões onde a doença foi diagnosticada, incluindo a região metropolitana do Recife e municípios do Sertão e do vale do São Francisco⁸⁰.

Por tudo isso, a doença ainda representa um importante problema de saúde pública, que ocasiona perda da capacidade laborativa, e cuja solução deve se concentrar nas atividades educativas e preventivas.

Existem várias ações visando o controle da esquistossomose mansônica. Entre elas, destacam-se o uso de moluscocidas para diminuir o número de hospedeiros intermediários, a melhoria das condições de higiene e sanitária da população exposta, a educação sanitária desta população, o tratamento intensivo com praziquantel, individual ou coletivo nas áreas de alta prevalência e a proteção individual contra a penetração das cercárias¹.

Todavia, os obstáculos a serem vencidos são igualmente numerosos, incluindo o custo alto do controle do hospedeiro intermediário, do saneamento básico e do provimento de

água potável, a dificuldade do controle da doença devido ao intenso contacto dos indivíduos com águas infestadas pelo parasita nas regiões de alta prevalência, o tempo longo para que medidas comunitárias de educação sanitária tenham êxito, a ineficácia dos tratamentos intensivos de comunidades em reduzir substancialmente a prevalência das novas infecções e a inexistência, até o presente momento, de uma vacina específica para controle desta endemia¹.

Na verdade, embora estas considerações sejam verdadeiras, particularmente porque o nível de re-infecção é alto, a principal razão para não eliminação desta endemia no Brasil é a falta de investimento em medidas sanitárias básicas e em educação, o que poderia diminuir o grande fosso social entre os diversos extratos da população brasileira.

Em nosso meio, esplenectomia tem sido realizada com relativa frequência como parte do tratamento da hipertensão porta de causa esquistossomótica, tratando os efeitos indesejáveis da esplenomegalia e do hiperesplenismo. O procedimento é associado à ligadura da veia gástrica esquerda, que encontra suporte no trabalho de Lacerda, e ao auto-implante esplênico, baseado nos estudos de Brandt e Petroianu^{9,81,82}. Este último procedimento tem sido usado para contornar, na criança, as conseqüências imunológicas da retirada do baço.

Entretanto, estas conseqüências estão longe de serem totalmente esclarecidas. Prova disso é que a esplenectomia pode promover prejuízo para alguns pacientes, mas benefícios para outros. Recentemente, foi demonstrado que o baço limita naturalmente a resposta febril pela inibição da avidéz das células de Kupffer ao LPS. Isto explicaria os episódios febris que comumente são vistos nos pacientes esplenectomizados, sugerindo infecção suspeita ou declarada. Os resultados desse estudo são clinicamente importantes e altamente inesperados, porque se confirmado este achado na espécie humana, isto representa a descoberta de uma nova função do baço: a inibição da resposta febril⁸³.

A idéia deste estudo foi dar maior consistência à hipótese de que o auto-implante de tecido esplênico possa influir de forma positiva na atividade fagocítica, na imunidade celular e humoral dos pacientes, o que pode ser capaz de manter a função original do baço e reduzir a ocorrência da SFPE.

Infelizmente, até agora, não existem testes ou experimentos que avaliem diretamente a função do auto-implante esplênico após esplenectomia total. Conclusões definitivas só poderão ser alcançadas avaliando-se a capacidade fagocítica dos macrófagos esplênicos, o que implica estudar funcional e histologicamente, através de biópsia, os fragmentos auto-implantados, mas isso é operacionalmente difícil e eticamente questionável.

A despeito dos resultados que indicam um possível benefício do auto-implante heterotópico do baço, este trabalho, porém, não responde ainda totalmente a uma questão crítica, ou seja, se o procedimento fornece realmente tecido esplênico capaz de prevenir a ocorrência da infecção fulminante. Esta é a pergunta crucial que tem sido feita por vários pesquisadores, principalmente porque é muito difícil de estabelecer, assim como ocorre em outros campos da imunopatologia, a relação entre as alterações detectadas no sangue periférico e as doenças. Apesar disso, entendemos que este estudo tem o mérito de trazer novas informações que poderão subsidiar futuras pesquisas nesta área. A propósito, até onde se sabe, não há registro na literatura de nenhum trabalho avaliando conjuntamente as variáveis aqui estudadas após esplenectomia e auto-implante esplênico.

Estas pesquisas deverão ser direcionadas na avaliação da participação do sistema fagocítico mononuclear na manutenção da função imunitária do baço, já que este complexo sistema é responsável pela depuração de partículas, bactérias e antígenos estranhos originados no sangue.

Assim, os estudos deverão focalizar o comportamento de substâncias bioativas e mediadores pró-inflamatórios produzidos pelas células monocíticas/macrofágicas,

especialmente outros produtos tóxicos derivados do O_2 . Entre estes, destacam-se o radical hidroxila (OH), produto da reação do $O_2^{-\cdot}$ com o H_2O_2 (pela então chamada Reação de Haber-Weiss), o próprio H_2O_2 , formado pela reação do $O_2^{-\cdot}$ com ele mesmo, espontaneamente ou catalizado pela enzima SOD, e o ânion peroxinitríico ($OONO^{-\cdot}$), um poderoso radical livre fruto da combinação dos estresses oxidativo e nitrosativo e que pode causar peroxidação lipídica. Dentro desse contexto, poderá também ser alvo de pesquisa a atividade da enzima mieloperoxidase, que aumenta fortemente o potencial de ação do H_2O_2 . A importância desta enzima no sistema microbicida de fagócitos reportada por Klebanoff em 1967 tem sido amplamente confirmada⁸⁴.

Pelo mesmo raciocínio, estudar também a atividade da enzima NOS pode ajudar a entender melhor o padrão de liberação do radical $^{\cdot}NO$ tal qual encontrado no nosso estudo. Apesar disso, a existência de uma via nos monócitos/macrófagos humanos para produção de $^{\cdot}NO$ não tem sido aceita por muitos investigadores. Isto significa dizer que as células monocíticas/macrofágicas humanas exercem efetiva atividade antimicrobiana, mas podem não ter o $^{\cdot}NO$ como mediador. Ao que parece, muitas células expressam a NOS, mas a geração de $^{\cdot}NO$ imunologicamente significativa ainda tem sido seriamente questionada, fato que merece, portanto, novas investigações^{85,86}.

Mais recentemente, foi descoberto pelo grupo de Anthony Segal que não são os radicais livres que dão o poder destrutivo às células fagocíticas, mas um outro sistema microbicida independente de oxigênio, representado por duas proteases, a elastase e a catepsina G. Foi demonstrado que a produção dessas enzimas é iniciada por um fluxo de potássio mineral dentro do fagossomo. Quando o fluxo é bloqueado, as células se tornam incapazes de matar os microrganismos. Desta forma, presume-se que os oxidantes e as proteases trabalham juntos para a morte bacteriana, e que os radicais livres não são as partículas tóxicas que se pensava⁸⁷. Porém, a conclusão de que as espécies reativas de

oxigênio e de nitrogênio não têm lugar nesse processo ainda é prematura. Este estudo traz uma nova perspectiva no diagnóstico e tratamento de várias doenças, principalmente as de natureza infecciosa, devendo o assunto, desta forma, ser incluído no bojo dos estudos sobre o baço, a esplenectomia e o auto-implante esplênico.

Finalmente, sugerimos também fazer parte dessa linha de pesquisa a avaliação do comportamento de outras citocinas, importantes na resposta inflamatória do hospedeiro, como a IL-1 e a IL-10, que têm participação ativa na imunidade natural, sendo co-estimuladoras de LT, e o IFN- γ , um potente ativador dos fagócitos mononucleares e que tem um papel importante na regulação imune da doença esquistossomótica.

REFERÊNCIAS*

1. Amaral RS, Coura JR. Epidemiological and control aspects of schistosomiasis in brazilian endemic areas. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2004; 99 (Suppl 1): 13-19.
2. Katz N, Peixoto SV. Análise crítica da estimativa do número de portadores de esquistossomose mansoni no Brasil. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2000; 33:303-8.
3. Brandt CT, Frei Caneca OA, Tavares DJS, de Azevedo FAS, Agra Jr VG, Cordeiro F. Hipertensão portal esquistossomótica na criança: avaliação crítica. *An Fac Med Uni Fed Pernam*. 1995; 40:106-10.
4. Brandt CT, Maciel DT, Santos de Azevedo FA. Esquistossomose hepatoesplênica em crianças: desenvolvimento pondo-estatural após tratamento cirúrgico. *An Fac Med Uni Fed Pernam*. 1995; 40:56-60.
5. Brandt CT, Frei Caneca OA, Tavares DJS, Ávila JR. Surgical hepatosplenic mansonic schistosomiasis in children: a Doppler Duplex study of the portal vein and hepatic artery. *Trans Soc Trop Med Hyg*. 1995; 89:70-1.
6. Brandt CT, Oliveira BS, Nogueira JBM, Neves JR, Lopes TL. Esquistossomose hepatoesplênica em crianças: avaliação morfológica e funcional após esplenectomia e auto-implante esplênico. *Rev Col Bras Cir*. 1998; 25: 399-402.
7. McCarthy JE, Remond PH, Duggan SM, Watson RW, Condrón CM, Donnel JR et al. Characterization of the defects in murine macrophage function in the early postsplenectomy period. *J Immunol* 1995; 155:387-96.
8. Singer DB. Postsplenectomy sepsis. *Perspectives in Paediatric Pathology*. 1976; 1:285-311.

* Estilo do *International Committee of Medical Journal Editors – ICMJE* (Estilo de Vancouver). Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals. *Ann Inter Med*, 997; 126:36-47. Referências bibliográficas referentes à Introdução Geral, Discussão Geral e Conclusões Gerais.

9. Brandt CT, Tavares DJS. Esplenose associada a esplenectomia em crianças esquistossomóticas: análise seqüencial das imunoglobulinas G, A e M e dos componentes 3 e 4 do sistema complemento. An Fac Med CCS. UFPE 1993; 38:24-29.
10. Alvarez FE, Greco RS. Regeneration of the spleen after ectopic implantation and parcial splenectomy. Arch Surg 1980; 115:772-75.
11. Patel JM, Williams JS, Shijel B, Hinshaw JR. Preservation of splenic function by autotransplantation of traumatized spleen in man. Surgery. 1981; 90: 683-88.
12. Vega A, Howell C, Krasna I, Campos J, Heyamn S, Ziegler M, et al. Splenic autotransplantation: optimal functional factors. J Ped Surg 1981; 16:898-904.
13. Lüdtke FE, Mack SC, Schuff-Werner P, Noth E. Splenic function after splenectomy for trauma. Role of autotransplantation and splenosis. Acta Chi Scand 1989; 155:533-39.
14. Brandt CT, Maciel DT, Caneca OAF, Castro CMMB, Araújo LB. Autotransplant of spleen tissue in children with schistosomiasis: evaluation of splenic function after splenosis. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2001; 96: 117-22.
15. Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS, editores. Imunologia celular e molecular. 2ª ed. Rio de Janeiro: Revinter; 1998.
16. Markert M, Andrews PC, Babior BM. Measurement of O_2^- production by human neutrophils. The preparation and assay of NADPH oxidase-containing particles from human neutrophils. Methods Enzimol. 1984; 105:358-65.
17. Babior BM. Superoxide: a two-edged sword. Braz J Med. 1997; 30: 141-55.
18. Glass GA, Delisle DM, Detogni P, Gabig TG, Magee BH. The respiratory burst oxidase of human neutrophils. J Biol Chem 1986; 264: 13247-51.
19. Hidalgo E, Demple B. Adaptative responses to oxidative stress: The soxrs and oxyr regulons. In: Lin ECC, Lynch AS. Regulation of gene expression in *Escherichia coli*. Austin: RG Landes Company; 1996. p.433-50.

20. Leite CRC. Aderência e produção de superóxido por monócitos em portadores de esquistossomose mansônica, na forma hepatoesplênica, submetidos à esplenectomia, ligadura da veia gástrica esquerda e auto-implante esplênico. [Dissertação de Mestrado]. Universidade Federal de Pernambuco. Recife, 2001.
21. Brandt CT, Leite CRC, de Castro RM, Filho CB, de Castro FMM, de Castro CMMB. Avaliação do efeito da esplenectomia e auto-implante esplênico sobre algumas funções de monócitos em crianças com esquistossomose mansônica. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2005; 38(1): 38-42.
22. Dusse LMS, Vieira LM, Carvalho MG. Revisão sobre óxido nítrico. *J Bras Pat Med Laborat*. 2003; 39(4): 343-350.
23. Cerqueira NF, Yoshida WB. Óxido nítrico. Revisão. *Act Cir Bras*. 2002; 17(6): 417-423.
24. Förstermann U, Closs EI, Pollock JS, Nakane M, Schawarz P, Gath I et al. Nitric oxide synthase isozymes: characterization, purification, molecular cloning and functions. *Hypertension*. 1994; 23 (part 2): 1121-31.
25. Papanicolaou DA, Wloder RL, Manolagas SC, Chrousos GP. The pathophysiologic roles of interleukin-6 in human disease. *Ann Int Med*. 1998; 128(2):127-37.
26. Trinchieri G, Gerosa F. Immunoregulation by interleukin-12. *J Leuko Biol*. 1996; 59: 505-11.
27. Brandt CT, Leite CRC, de Castro CMMB, de Castro RM, Filho CB. Esquistossomose mansônica hepatoesplênica humana: produção de TNF- α em monócitos. *Rev Col Bras Cir*. 2003; 30 (6): 447-451.
28. Souza MSL, autora. Guia para redação e apresentação de monografias, dissertações e teses. 3º ed. Belo Horizonte: Ed. Coopmed; 2005.
29. Moore FA, Moore EE, Moore GE, Millikan JS. Risk of splenic salvage after trauma. Analysis of 200 cases. *Am J Surg* 1984; 148:800-805.

30. Smith E, Young NJ, Drew PA. Decreased phagocytic capacity of autotransplanted splenic tissue. *ANZ J Surg* 2003; 73:894-98.
31. Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannebaum SR. Analysis of nitrate, nitrite and [15N] nitrate in biological fluids. *Anal Biochem*. 1982; 126:131-8.
32. Karakantza M, Theodorou GL, Mouzaki A, Theodori E, Vagianos C, Maniatis A. *In vitro* study of the long-term effects of post-traumatic splenectomy on cellular immunity. *Scand J Immunol*. 2004; 59:209-19.
33. Westerman J, Schwinzer R, Jecker P, Pabst R. Lymphocyte subsets in the blood. The influence os splenectomy, splenic autotransplantation, ageing, and the site of blood sampling on the number of B, T, CD4+, and CD*+ lymphocytes in the rat. *Scand J Immunol*. 1990; 31(3): 327-34.
34. Brunet LR. Nitric oxide in parasitic infections. *Inter Immunopharmacol*. 2001; 1:1457-67.
35. Brunet LR, Beall M, Dunne DW, Pearce EJ. Nitric oxide and the Th2 response combine to prevent severe hepatic damage during *Schistosoma mansoni* infection. *J Immunol* 1999; 163:4976-84.
36. Royer B, Varadaradjalou S, Saas P, Guillosson JJ, Kantelip JP, Arock M. Inhibition of IgE-induced activation of human mast cells by IL-10. *Clin Exp Allergy*. 2001; 31: 694-704.
37. Bocca AL, Brito PPMS, Figueiredo F, Tosta CE. Inhibition of nitric oxide production by macrophages in chromoblastomycosis: a role for *Fonsecaea pedrosi* melanin. *Mycopathol* 2006; 161: 195-203.
38. Coleman JW. Nitric oxide in immunity and inflammation. *Int Immunopharmacol*. 2001; 1:1397-1406.
39. Hesse M, Modolell M, Flamme ACL, Schito M, Fuentes JM, Cheever A et al. Differential regulation of nitric oxide synthetase-2 and arginase-1 by type 1/type 2 cytokines in vivo:

- granulomatous pathology is shaped by the pattern of L-arginine metabolism. *J Immunol*. 2001; 167:6533-44.
40. Chang CI, Liao JC, Kuo L. Arginase modulates nitric oxide production in activated macrophages. *Am J Physiol*. 1998; 274: H342-348.
41. Bogdan C, Vodovotz Y, Paik J, Xie QW, Nathan C. Mechanism of suppression of nitric oxide synthase expression by interleukin 4 in primary mouse macrophages. *J Leukocyte Biol*. 1994; 55:227.
42. La Flamme AC, Patton EA, Bauman B, Pearce E. IL-4 plays a crucial role in regulating oxidative damage in the liver during schistosomiasis. *J Immunol*. 2001; 166:1903-11.
43. Dunne DW, Pearce EJ. Immunology of hepatosplenic schistosomiasis mansoni: a human perspective. *Microbes Infect*. 1999; 1:553-560.
44. Abo-Shousha S, Khalil SS, Rashwan EA. Oxygen free radical and oxide nitric production in single or combined human schistosomiasis and fascioliasis. *J Egypt Soc Parasitol*. 1999; 29(1):149-56.
45. Oliveira DM, Silva-Teixeira DN, Carmo SA, Goes AM. Role of nitric oxide on human schistosomiasis mansoni: upregulation of in vitro granuloma formation by nomega-nitro-l-arginine methyl ester. *Nitric Oxide: Biology and Chemistry*. 1998; 2(1):57-65.
46. Corbisier P, Houbion A, Remacle J. A new technique for highly sensitive detection of superoxide dismutase activity by chemiluminescence. *Anal Biochem*. 1987; 164(1): 240-7
47. Imai T, Nishimaki K, Shiga T, Kawasaki S, Makuuchi M. Lipid peroxidation and antioxidant activities in regeneration liver after partial hepatectomy in splenectomized rats. *Res Exp Med*. 1996; 196(1): 1-7.

48. Mizukami T, Yokoyama H, Okamura Y, Ohgo H, Fukuda M, Kamegaya Y et al. Splenectomy attenuates superoxide anion release into the hepatic sinusoids after lipopolysaccharide challenge. *J Hepatol*. 1999; 31:235-41.
49. Wysochi H, Wierusz-Wysocka B, Karon H, Dotka J, Wykretowicz A, Szczepanik A et al. Polymorphonuclear neutrophils function in splenectomized patients. *Clin Exp Immunol*. 1989; 75:392-95.
50. Callahan HL, Crouch RK, James ER. Helminth anti-oxidant enzymes: a protective mechanism against host oxidants? *Parasitology Today*. 1988; 4(8):218-225.
51. Babior BM, Curnutte JT, Kipnes LS. Biological defense mechanisms: evidence for the participation of superoxide in bacterial killing by xanthina oxidase. *J Lab Clin Med*. 1975, 85:235-44.
52. Larrea E, Beloqui O, Muñoz-Navas MA, Civeira MP, Prieto J. Superoxide dismutase in patients with chronic hepatitis C virus infection. *Free Radic Biol Med*. 1998; 24(7):1235-41.
53. Shaheen AA, El-Fattah A, Ebeid FA. Effect of praziquantel treatment on lipid peroxide levels and superoxide dismutase activity in tissue of healthy and *Schistosoma mansoni* infected mice. *Drug Res*. 1994; 44:94-96.
54. Hohmeier HE, Thigpen A, Tran VV, Davis R, Newgard CB. Stable expression of manganese superoxide dismutase (MnSOD) in insulinoma cells prevents IL-1 β -induced cytotoxicity and reduces nitric oxide production. *J Clin Invest*. 1998; 101(9):1811-20.
55. Tovey MG, Content J, Gresser I, Gugenheim J, Blanchard B, Guymarko J. Genes for IFN- γ -2 (IL-6), tumor necrosis factor, and IL-1 are expressed at high levels in the organs of normal individuals. *J Immunol*. 1988; 141:3106-10.
56. Moeniralam HS, Bemelman WA, Endert E, Koopmans R, Sauerwein HP, Romijn A. The decrease in nonsplenic interleukin-6 (IL-6) production after splenectomy indicates the

- existence of a positive feedback loop of IL-6 production during endotoxemia in dos. Infect Immun. 1997; 65(6): 2299-2305.
57. Billiar TR, West MA, Hyland BJ, Simmons RL. Splenectomy alters Kupffer cell response to endotoxin. Arch Surg 1988;123:327-32.
58. Van Snick J. Interleukin-6: an overview. Annu Rev Immunol. 1990; 8:253-278.
59. Torres MB, Vega VL, Bedri M, Saad D, Trentzsch H, Reeves RH. IL-10 plasma levels are elevated after LPS injection in splenectomized A/J mice. J Surg Res. 2005; 129: 101-106.
60. Wynn TA, Eltoun I, Cheever AW, Lewis FA, Gause WC, Sher A. Analysis of cytokine mRNA expression during primary granuloma formation induced by eggs of *Schistosoma mansoni*. J Immunol. 1993; 151:1430-40.
61. Magalhães A, Miranda DG, Miranda RG, Araújo MI, Jesus AA, Silva A et al. Cytokine profile associated with human chronic schistosomiasis mansoni. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2004; 99 (Suppl 1): 21-26.
62. Fallon PG. Immunopathology of schistosomiasis: a cautionary tale of mice and men. Immunol Today. 2000; 21:29-35.
63. Sher A, Fiorentino D, Caspar P, Pearce E, Mosmann T. Production of IL-10 by CD4⁺ T lymphocytes correlates with down-regulation of Th1 cytokine synthesis in helminth infection. J Immunol. 1991; 147: 2713-2716.
64. Montenegro SML, Miranda P, Mahanty S, Abath FGC, Teixeira KM, Coutinho EM, et al. Cytokine production in acute versus chronic human schistosomiasis mansoni: the cross-regulatory role of interferon- γ and interleukin-10 in the responses of peripheral blood mononuclear cells and splenocytes to parasite antigens. J Infect Dis. 1999; 179:1502-14.
65. Silveira AMS, Gazzinelli G, Oliveira LFA, Bethony J, Gazzinelli A, Queiroz CC, et al. Human schistosomiasis mansoni: intensity of infection differentially affects the

- production of interleukin-10, interferon- γ and interleukin-13 by stimulated egg antigen or adult worm antigen stimulated cultures. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2004; 98:514-19.
66. Booth M, Mwatha JK, Joseph S, Jones FM, Kadzo H, Ileri E, et al. Periportal fibrosis in human Schistosomiasis mansoni infection is associated with low IL-10, low IFN- γ , high TNF- α , or low rantes, depending on age and gender. J Immunol. 2004; 172: 1295-303.
67. Mahanty S, Nutman TB. Immunoregulation in human lymphatic filariasis: the role of IL-10. Parasite Immunol. 1995; 17:385-92.
68. Peraçoli MT, Kurokawa CS, Calvi SA, Mendes RP, Pereira PC, Marques SA, et al. Production of pro- and anti-inflammatory cytokines by monocytes from patients with paracoccidiomycosis. Microbes Infect. 2003; 5:413-18.
69. Morais CNL, Souza JR, de Melo WG, Aroucha ML, Domingues ALC, Wynn T et al. Studies on the production and regulation of interleukin, IL-13, IL-4 and interferon- γ in human schistosomiasis mansoni. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2002; 97(Suppl 1): 113-14.
70. Mwatha JK, Kimani G, Kamau T, Mbugua GG, Ouma JH, Mumo J, et al. High levels of TNF, soluble TNF receptors, soluble ICAM-1, and IFN- γ , but low levels of IL-5, are associated with hepatosplenic disease in human schistosomiasis. J Immunol. 1998; 160: 1992-99.
71. Araújo MI, Jesus AR, Bacellar O, Sabin E, Pearce E, Carvalho EM. Evidence of a T helper type 2 activation in human schistosomiasis. Eur J Immunol. 1996; 26: 1399-403.
72. Scott JT, Vereecken K, Diakhaté MM, Vanagt T, Sambou V, Diop M. Are the cellular immune responses of children and adults with *Schistosoma mansoni* infection intrinsically different? Cytokines produced *ex vivo* in response to antigens and mitogens. Parasite Immunol. 2004; 26:29-36.

73. Miniello S, Testini M, Jirillo E, Piccini G, Urgesi G, Lissidini G, et al. Postsplenectomy immunodepression and its implications: an underestimated problem. *Int Surg* 2002; 87:245-251.
74. Kuranaga N, Kinoshita M, Kawabata T, Shinomiya N, Seki S. A defective Th1 response of the spleen in the initial phase may explain why splenectomy prevent a *Listeria* infection. *Cli Exp Immunol* 2005; 140(1):11-21.
75. Panitsas FP, Mouzaki A. Effect of splenectomy on type-1/type-2 cytokine gene expression in a patient with adult idiopathic thrombocytopenic purpura (ITP). *BMC Blood Disorders*. 2004; 4:4.
76. Huang FP, Niedbala W, Wei XQ, Xu D, Feng GJ, Robinson JH, et al. Nitric oxide regulates Th1 cell development through the inhibition of IL-12 synthesis by macrophages. *Eur J Immunol* 1998; 28:4062-4067.
77. Trinchieri G. Interleukin-12: a cytokine produced by antigen-presenting cells with immunoregulatory functions in the generation of T-helper cell type 1 and cytotoxic lymphocytes. *Blood*. 1994;84(12):4008-27.
78. D'Andrea A, Ma X, Aste-Amezaga M, Paganin C, Trnchieri G. Stimulatory and inhibitory effects on the production of cytokines by human peripheral blood mononuclear cells: priming for IL-12 and tumor necrosis factor ? production. *J Exp Med*. 1995; 181:537-46.
79. Naume B, Gately MK, Desai BB, Sundan A, Espevik T. Synergistic effects of interleukin 4 and interleukin 12 on NK cell proliferation. *Cytokine*. 1993; 5(1):38-46.
80. Resendes APC, Souza-Santos R, Barbosa CS. Internação hospitalar e mortalidade por esquistossomose no Estado de Pernambuco, Brasil, 1992/2000. *Cad Saúde Pública*. 2005; 21(5): 1392-401.

81. Lacerda CM, Freira W, Melo PSV, Carvalho GL, Kirzner CF. Esplenectomia e ligadura da veia gástrica esquerda na esquistossomose mansônica: efeito sobre a pressão das varizes de esôfago aferida por técnica não invasiva. *Rev Col Bras Cir*. 1998; 26: 15-9.
82. Petroianu A, Barbosa AJA. Quantitative studies on macrophage phagocytosis in whole spleen and in remnant of subtotal splenectomy. *Med Sci Res*. 1991; 19:373-5
83. Feleder C, Li Z, Perlik V, Evans A, Blatteis CM. The spleen modulates the febrile response of guinea pigs to LPS. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2003; 284:1466-476.
84. Klebanoff SJ. Antimicrobial mechanisms in neutrophilic polymorfonuclear leukocytes. *Semin Hemat*. 1975; 12:117-42.
85. Abina JE. On the expression of nitric oxide synthase by human macrophages. Why no NO? *J Leuko Biol*. 1995; 58:643-49.
86. Denis M. Human monocyte/macrophages: NO or no NO? *J Leuko Biol*. 1994; 55:682-84.
87. Reeves EP, Lu H, Jacobs HL, Messina CGM, Bolsover S, Gabella G, et al. Killing activity of neutrophils is mediated through activation of proteases by K^+ flux. *Nature*. 2002; 416:291-97.

ANEXOS

ANEXO I

Certificado de apresentação oral do Artigo 3 no I Encontro de Pós-Graduação do CCS/UFPB

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
Centro de Ciências da Saúde
Curso de Pós-Graduação

Certificado

O **Carvalho Leite (relator), Carlos Teixeira Barbosa de Castro e Francisco Machado**iram o trabalho **Produção de superóxido metidos à esplenectomia e auto-implante UNICAÇÃO ORAL**, durante o **I ENCONTRO DE E CIÊNCIAS DA SAÚDE**, realizado no período de **25 de novembro a 01 de dezembro de 2006**.

- PB, 01 de dezembro de 2006.

Clara Regina de Almeida Rosa
Marize Rêquel Diniz da Rosa
Assessora Adjunta de Pós-Graduação do CCS
Coordenadora do Evento

Margareth de Fátima Formiga Diniz
Margareth de Fátima Formiga Diniz
Diretora do Centro de Ciências da Saúde

Certificado de premiação do Artigo 3 com "Menção Honrosa"

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA

Centro de Ciências da Saúde

Anuário de Pós-Graduação

Certificado

Carvalho Leite (Relator), Carlos Teixeira
Barbosa de Castro e Francisco Machado
do trabalho "Produção de superóxido
metidos á esplenectomia e auto-implante
COM MENÇÃO HONROSA na modalidade
CENTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO DO CENTRO DE
o pela Assessoria de Pós-Graduação do CCS, no
1 de dezembro de 2006.

a - PB, 01 de dezembro de 2006.

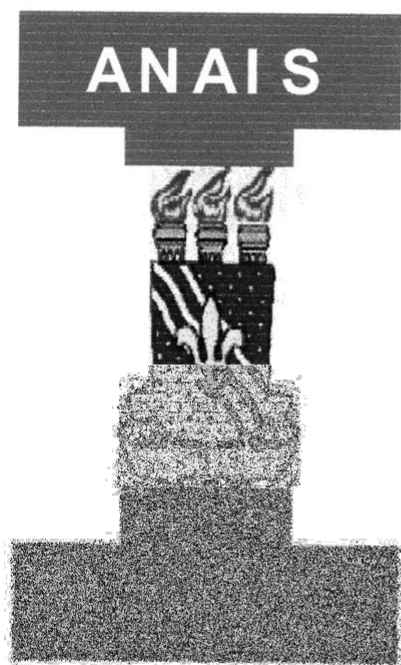
Solange Formiga Dimiz
Solange de Fátima Formiga Dimiz
Assessora de Pós-Graduação do CCS
Coordenadora do Evento

Margareth de Fátima Formiga Dimiz
Margareth de Fátima Formiga Dimiz
Assessora Adjunta de Pós-Graduação do CCS
Coordenadora do Evento

Margareth de Fátima Formiga Dimiz
Margareth de Fátima Formiga Dimiz
Diretora do Centro de Ciências da Saúde

Cópia da publicação do Artigo 3 nos Anais do I Encontro de Pós-Graduação do CCS/UFPB

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**



**ENCONTRO
PÓS-GRADUAÇÃO
DO CCS**

Atividade de Pós-Graduação

**25 de novembro a 01 de dezembro de 2006
JOÃO PESSOA-PARAÍBA**

Anais do I Encontro de Pós-Graduação do CCS/UFPB
João Pessoa-PB, 29 de novembro a 01 de dezembro de 2006 - ISBN 85.7745-045

**PRODUÇÃO DE SUPERÓXIDO DISMUTASE EM PACIENTES SUBMETIDOS À
ESPLENECTOMIA E AUTO-IMPLANTE ESPLÊNICO**

Carlos Roberto Carvalho Leite¹

Carlos Teixeira Brandt²

Célia Maria Machado Barbosa de Castro³

Francisco Machado Manhaes-de-Castro⁴

OBJETIVOS: Superóxido dismutase (SOD) é uma enzima que catalisa o desdobramento de radical superóxido, importante não apenas na proteção do *S. mansoni* contra o sistema imune do homem, mas também, na resposta desse hospedeiro contra este parasita ou agente infeccioso. Assim, investigou-se os níveis de produção de SOD por monócitos periféricos de portadores jovens de esquistossomose hepatoesplênica que tinham se submetido a esplenectomia, ligadura da veia gástrica esquerda e auto-implante de tecido esplênico. **MÉTODO:** Quatro grupos foram envolvidos na investigação: G1 - 12 portadores de esquistossomose hepatoesplênica (EHE) sem tratamento; G2 - 13 portadores de EHE que receberam tratamento clínico e se submeteram à cirurgia para descompressão do sistema porta - esplenectomia e ligadura da veia gástrica esquerda (EHE/ELGE); G3 - 19 pacientes jovens similares a G3, mas que receberam também auto-implante de tecido esplênico no omento maior (EHE/ELGE/AI); e G4 - 15 indivíduos sem infecção pelo *S. mansoni* advindos da mesma área geográfica, apresentando as mesmas condições sócio-econômicas (GC). **RESULTADOS:** Os indivíduos normais (GC - sem esquistossomose) apresentam níveis de SOD significativamente menores que os portadores de EHE sem tratamento ($p < 0,01$); e aqueles do grupo EHE/ELGE ($p < 0,05$). Os níveis de SOD do grupo EHE/ELGE/AI são estatisticamente similares ao grupo GC ($p > 0,05$). **CONCLUSÃO:** Os resultados emprestam suporte adicional à hipótese de que o tratamento clínico, e a esplenectomia, ligadura da veia gástrica esquerda e auto-implante de tecido esplênico, em portadores jovens de esquistossomose hepatoesplênica, tendem a manter a resposta imune desses indivíduos.

Palavras-chave: Esquistossomose hepatoesplênica. Auto-implante esplênico. Superóxido dismutase. Resposta imune.

¹ Professor Assistente do Departamento de Cirurgia, CCS, UFPB

² Professor Assistente do Departamento de Cirurgia, CCS, UFPB

³ Prof. Adjunto em Medicina Tropical, CCS, UFPE

⁴ Bolsista de Iniciação Científica - CNPq

ANEXO II

Certificado de apresentação oral no XXI Fórum de Pesquisa em Cirurgia



ANEXO III

Resumo a ser submetido para publicação de acordo com as normas da Revista Brasileira de Ciências da Saúde, rebrasa@ccs.ufpb.br

Autor da Tese

Carlos Roberto Carvalho Leite

Grau acadêmico: Mestre em Cirurgia/Professor Assistente, Departamento de Cirurgia, Universidade Federal da Paraíba (UFPB)

Título da Tese: Produção de óxido nítrico, superóxido dismutase e interleucinas 6 e 12 por monócitos de pacientes com hipertensão porta esquistossomótica submetidos à esplenectomia e auto-implante esplênico

Data da defesa pública: 22/02/07

Programa: Programa de Pós-Graduação em Cirurgia – Nível Doutorado

Universidade: Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

Orientador: Prof. Carlos Teixeira Brandt

RESUMO

Objetivo: Este estudo teve o objetivo de avaliar o efeito do auto-implante esplênico (AIE) na atividade funcional das células mononucleares do sangue periférico (PBMC), através da análise da produção de óxido nítrico (^1NO) em $\mu\text{mol/ml}$, IL-6 e IL-12, em $\mu\text{g/ml}$ e superóxido dismutase (SOD), em uSOD/mg proteína. **Material e Métodos:** Níveis de ^1NO , IL-6, IL-12 e SOD foram determinados no sobrenadante das PBMC. Quatro grupos foram constituídos: G1 – 12 pacientes com hipertensão portal esquistossomótica (HPE) não tratados; G2 – 13 pacientes com HPE submetidos à esplenectomia e ligadura da veia gástrica esquerda (ELGE); G3 – 19 pacientes com HPE submetidos à ELGE e AIE e G4 – 15 indivíduos saudáveis. **Resultados:** Produção de ^1NO mostrou resultados similares entre os grupos G2 ($6,7 \pm 0,4$), G3 ($7,4 \pm 1,6$) e G4 ($8,2 \pm 2,7$). Entretanto, pacientes do G1 demonstraram baixos níveis de ^1NO ($5,3 \pm 1,3$), quando comparados ao G3 e G4. Em relação à liberação de IL-6, os monócitos do G1 mostraram uma reduzida habilidade de produzir esta citocina ($468,0 \pm 198$), quando comparada ao G2 ($628,6 \pm 23,4$), G3 ($632,9 \pm 12,8$) e G4 ($639,2 \pm 32,2$). Ao contrário, nenhuma diferença estatística foi encontrada entre esses três grupos. A produção de IL-12 foi maior no G1 ($4,6 \pm 2,3$) em comparação com G2 ($1,3 \pm 0,6$), G3 ($1,7 \pm 1,3$) e G4 ($2,2 \pm 1,0$). Entretanto, não houve diferença entre G2, G3 and G4. A atividade da SOD foi maior no G1 ($9,2 \pm 3,8$) e G2 ($8,5 \pm 3,2$), em comparação com G4 ($5,1 \pm 2,1$), enquanto sua atividade no G3 ($7,3 \pm 3,1$) foi similar comparada ao G4 ($q=2,954$ $p>0,05$). **Conclusão:** Coletivamente, os resultados sugerem múltiplos padrões no perfil da resposta imune durante a HPE e igualmente após esplenectomia com ou sem auto-implante esplênico. Este estudo suporta a hipótese de que o auto-implante esplênico é capaz de manter a atividade do sistema fagocítico mononuclear, que pode ter contribuído para proteger os pacientes do grupo G3 da sepse fulminante pós esplenectomia. **Palavras-chaves:** Esquistossomose; Esplenectomia; Auto-implante esplênico; Monócito; Óxido nítrico; Superóxido dismutase; Interleucina 6; Interleucina 12.

ABSTRACT

Objective: This study had the objective to evaluate the effect of spleen autotransplantation (SAT) on the functional activity of the peripheral blood mononuclear cell (PBMC), through the analysis of the production of nitric oxide (^2NO), in $\mu\text{mol/ml}$, interleukin 6 (IL-6) and 12 (IL-12), in $\mu\text{g/ml}$, and superoxide dismutase (SOD), in uSOD/mg protein . **Material and Methods:** ^2NO , IL-6, IL-12, SOD levels were determined in supernatants of PBMC. Four groups were constituted: G1 – 12 patients with portal hypertension schistosomal (PHS) not treated; G2 – 13 patients with PHS underwent splenectomy and ligation of left gastric vein (SLGV); G3 – 19 patients with PHS underwent SLGV and SAT; G4 – 15 healthy individuals. **Results:** ^2NO production showed similar results between groups G2 (6.7 ± 0.4), G3 (7.4 ± 1.6) and G4 (8.2 ± 2.7). However, patients from G1 showed lower level of ^2NO (5.3 ± 1.3), when compared G3 and G4. Respecting IL-6 release, the monocytes of G1 showed a reduced ability to produce this cytokine ($468,0 \pm 198$), when compared to G2 ($628,6 \pm 23,4$), G3 ($632,9 \pm 12,8$) and G4 ($639,2 \pm 32,2$). In contrast, no statistical difference was found between these three groups. IL-12 production was higher in G1 ($4,6 \pm 2,3$) in comparison with G2 ($1,3 \pm 0,6$), G3 ($1,7 \pm 1,3$) and G4 ($2,2 \pm 1,0$). Nevertheless, there were no differences among G2, G3 and G4. The SOD activity was higher in G1 ($9,2 \pm 3,8$) and G2 ($8,5 \pm 3,2$), in comparing with G4 ($5,1 \pm 2,1$), whereas its activity in G3 ($7,3 \pm 3,1$) was similar as compared to G4 ($q=2,954$ $p>0,05$). **Conclusion:** Taken together, the results suggest multiple patterns in the profile of the immune response during the SMH and likewise after splenectomy and SAT. This study supports the hypothesis that SAT is able of maintaining the activity of mononuclear phagocyte system, which may be contributed to protect the patients with PHS against overwhelming postsplenectomy infection. **Key Words:** Schistosomiasis; Splenectomy; Spleen autotransplantation; Monocyte; Nitric oxide; Superoxide dismutase; Interleukin 6; Interleukin 12.

Normas de Publicação

Recomendações, Informações e Instruções aos Autores

A **Revista Brasileira de Ciências da Saúde** é uma publicação científica dirigida à produção acadêmica, na área de Ciências da Saúde. Publica, preferencialmente, estudos científicos inseridos na realidade brasileira e divulga contribuições visando a melhoria da qualidade do Ensino, da Investigação Científica e da Assistência à Saúde no Brasil. Poderão ser submetidos para avaliação, artigos para publicação nas seguintes seções: a) Pesquisa, b) Relato de Caso, c) Bioética, d) Ensino, e) Metodologia, f) Resumo de Tese e g) Carta ao Editor. As seções Ensaio, Revisão e Atualização terão autores convidados, podendo os leitores sugerir à Comissão Editorial, temas e autores.

RECOMENDAÇÕES

Autoria: A atribuição da autoria dos artigos deve ser baseada, exclusivamente, em contribuição significativa na realização do trabalho. Deve-se evitar numerosos autores, estudos multicêntricos deverão ter autor corporativo (Programa ou Instituição) ou como autor o Coordenador principal. Participação na coleta de dados, realização de exame de rotina etc., não justificam autoria. Este tipo de participação deve ser mencionada nos Agradecimentos. Técnicos e estudantes de graduação não deverão constar como autor principal.

A participação de estudantes de Graduação como co-autores deve ser restrita, exclusivamente quando relacionados ao projeto de Iniciação Científica ou participação efetiva e declarada em relato de caso. Esta participação deverá ser, no máximo, de dois em artigos de pesquisa e de um em relatos de caso. As outras seções não cabem a participação de estudantes de Graduação. Quando não estiver especificada a participação do estudante de graduação na carta de encaminhamento e os editores considerarem necessário, será solicitada esta informação. A ordem em que devem

aparecer os autores na publicação é definida por estes, sendo a responsabilidade legal atribuída a todos, independente da ordem em que apareçam na publicação. Geralmente, quem redige o artigo ou o seu principal redator, torna-se o primeiro autor, no entanto, o critério desta ordem é atributo exclusivo dos autores.

Ética: Todos os artigos, de qualquer natureza ou categoria, devem seguir o mais alto padrão de senso ético. Os artigos de experimentação clínica, medicamentosa, cirúrgica etc., com humanos, devem ser indicados no texto aonde os procedimentos realizados seguiram as exigências da Comissão de Bioética da Instituição. Todo artigo que envolver indivíduos humanos deve vir acompanhado do parecer da Comissão de Bioética da Instituição em que foi realizado o trabalho. Não deve ser usado nome do paciente, iniciais, números de registros, inclusive registro hospitalar, no texto e em nenhuma ilustração. Artigos envolvendo experimentação animal devem explicitar que estão de acordo com a legislação internacional de uso de animais de laboratório em pesquisa.

INFORMAÇÕES

Seções

Pesquisa: Esta seção consta de artigos inéditos, contribuições originais resultante de observações experimentais ou de estudos de natureza epidemiológica, representando novos resultados ou o progresso nos diversos campos das Ciências da Saúde. Os artigos enviados para esta seção terão prioridade sobre os demais. Esta seção está formalmente dividida nos seguintes itens: Introdução, Material e Métodos, Resultados, Discussão, Referências, além de Resumo.

Relato de Caso: Relato de caso altamente informativo ou incomum constando de três itens: *Introdução*, curta e objetiva; *Relato*, o relato propriamente dito e *Comentários*. As *Referências* devem ser restritas às essenciais, no máximo a dez e deve-se evitar citações de livro texto.

Metodologia: Seção dedicada a artigos descritivos sobre métodos estatísticos, físicos, químicos, citológicos etc., aplicados à pesquisa científica na área de Ciências da Saúde. Esta seção consta de três itens: *Introdução*, sobre os fundamentos teóricos do método; *Método*, descrição do método propriamente dito e *Aplicação*, sobre as aplicações práticas do mesmo.

Ensino: Seção composta de artigos descritivos de relevância sobre aspectos técnicos e avaliativos do ensino ou sobre propostas educacionais inovadoras na área de Ciências da Saúde.

Carta ao Editor: Seção reservada ao comentário crítico e opinativo exclusivamente sobre artigo publicado na Revista Brasileira de Ciências da Saúde. Os Editores avaliarão a pertinência da crítica e sendo considerada de interesse geral, será dada aos autores do artigo em questão, o direito de réplica, a qual será publicada no mesmo número da Revista. A Carta não deverá ultrapassar a uma página (300 palavras de texto).

Resumo de Tese: Esta seção aceitará, exclusivamente, resumos do trabalho final da Pós-Graduação *Stricto Sensu*, isto é, de Dissertações de Mestrado e Teses de Doutorado. O Resumo terá o máximo de 330 palavras. As outras informações necessárias são: palavras-chaves (Key Words), grau acadêmico, título, data da defesa pública, denominação do Curso de Pós-Graduação e da Universidade, nome completo do Orientador.

Itens da seção Pesquisa

Introdução: Neste item são caracterizados, de modo sumário, o problema estudado, as hipóteses levantadas, a importância do estudo e os objetivos.

Material e Métodos: Descrição espaço-temporal da amostra e sub-amostras, quando houver, especificando o número de observações, dos métodos de averiguação e de análise estatística dos dados (ver Métodos Estatísticos).

Resultados: A apresentação dos resultados deve ser de maneira racional e em sequência lógica no texto, nas tabelas, quadros e figuras (ilustrações). Restringir o número de tabelas, quadros e figuras àquelas indispensáveis ao entendimento do assunto. Gráficos podem ser uma alternativa a tabelas de muitas entradas. Não devem ser duplicados dados em tabelas, quadros e gráficos, nem repetidas informações contidas em itens anteriores da seção. Apenas dados importantes das tabelas devem ser mencionados no texto. Não devem ser realizadas discussões neste item (ver Quadros, Tabelas e Figuras).

Discussão: Os resultados mais importantes devem ser analisados criticamente, interpretados e quando for possível, comparados com dados semelhantes aos da literatura. Informações citadas nos itens anteriores só devem ser mencionadas quando absolutamente necessárias. As conclusões devem ser relacionadas de modo sucinto e objetivo. Recomendações quando apropriadas podem ser incluídas no final deste item.

Julgamento

Todo artigo submetido à Revista será primeiramente apreciado pela Comissão Editorial nos seus aspectos gerais e normativos. Havendo alguma irregularidade será devolvido aos autores para correção, não havendo, será encaminhado aos consultores externos para apreciação especializada do conteúdo. Os pareceres dos consultores serão encaminhados aos respectivos autores para eventuais ajustes. Excepcionalmente quando se tratar de assunto muito especializado, os autores poderão sugerir, à Comissão Editorial da Revista, dois consultores com reconhecimento nacional ou internacional e que sejam externos às suas respectivas instituições.

ANEXO IV

Aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa do CCS/UFPE



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
Comitê de Ética em Pesquisa

Of. N.º 368/2004-CEP/CCS

Recife, 02 de agosto de 2004

Ref. Protocolo de Pesquisa nº170/2004-CEP/CCS

Intitulado: “ Produção de óxido nítrico, peróxido de hidrogênio, interleucinas 1, 6 e 12 e determinação da superóxido dismutase em portadores de Esquistossomose Hepato-Esplênica submetidos a esplenectomia, ligadura da veia gástrica esquerda a auto-implante esplênico ”.

Senhor (a) Pesquisador (a):

Informamos que o Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo seres humanos do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco CEP/CCS/UFPE analisou, de acordo com a Resolução nº 196/96 do Conselho Nacional de Saúde, o protocolo de pesquisa em epígrafe aprovando-o e liberando-o para início da coleta de dados em 02 de agosto de 2004.

Ressaltamos que ao pesquisador responsável deverá apresentar relatório, em 01/08/2005.

Atenciosamente,


Carlos Teixeira Brant
Apo. Coordenador do Comitê de
Ética em Pesquisa - CCS/UFPE

Ao
Professor Carlos Teixeira Brant
Departamento de Cirurgia CCS/UFPE

ANEXO V

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

PESQUISA: Produção de óxido nítrico, interleucinas 6 e 12 e atividade da superóxido dismutase (SOD), em portadores de hipertensão porta esquistossomótica, submetidos à esplenectomia e auto-implante esplênico

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Dr. Carlos Roberto Carvalho Leite

ORIENTADOR: Dr. Carlos Teixeira Brandt

INSTITUIÇÃO: Serviço de Cirurgia Geral da Criança - HC-UFPE, Fone: 3271-8519

Menores de 18 anos

Eu _____, RG Nº _____, aceito e estou ciente da participação do menor _____, como voluntário nesta pesquisa científica, e de que a sua identidade e privacidade serão mantidas em sigilo durante toda a pesquisa, de que terá a garantia de esclarecimentos suficientes antes e durante o curso da pesquisa, de que terá a liberdade de recusar sua participação ou retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, de que será reembolsado, pelos pesquisadores, caso surja alguma despesa eventual decorrente de sua participação nesta pesquisa, bem como das formas de indenização, caso se sinta lesado por danos eventuais. Estou ciente de que esta pesquisa não colocará em risco a sua vida e sua saúde, pois ela será realizada em condições corretas, segundo as exigências de normas técnicas, condições adequadas de laboratório e por profissional qualificado. Estou ciente que será retirado de uma veia do meu braço 15ml de sangue para a pesquisa. Compreendo também a importância e os benefícios pelos esclarecimentos que esta pesquisa trará, sobre a doença esquistossomose e as melhorias para o tratamento dos portadores da doença.

Recife ____ de _____ de 2004

Paciente

Responsável

Testemunha

Testemunha

Pesquisador

Maiores de 18 anos

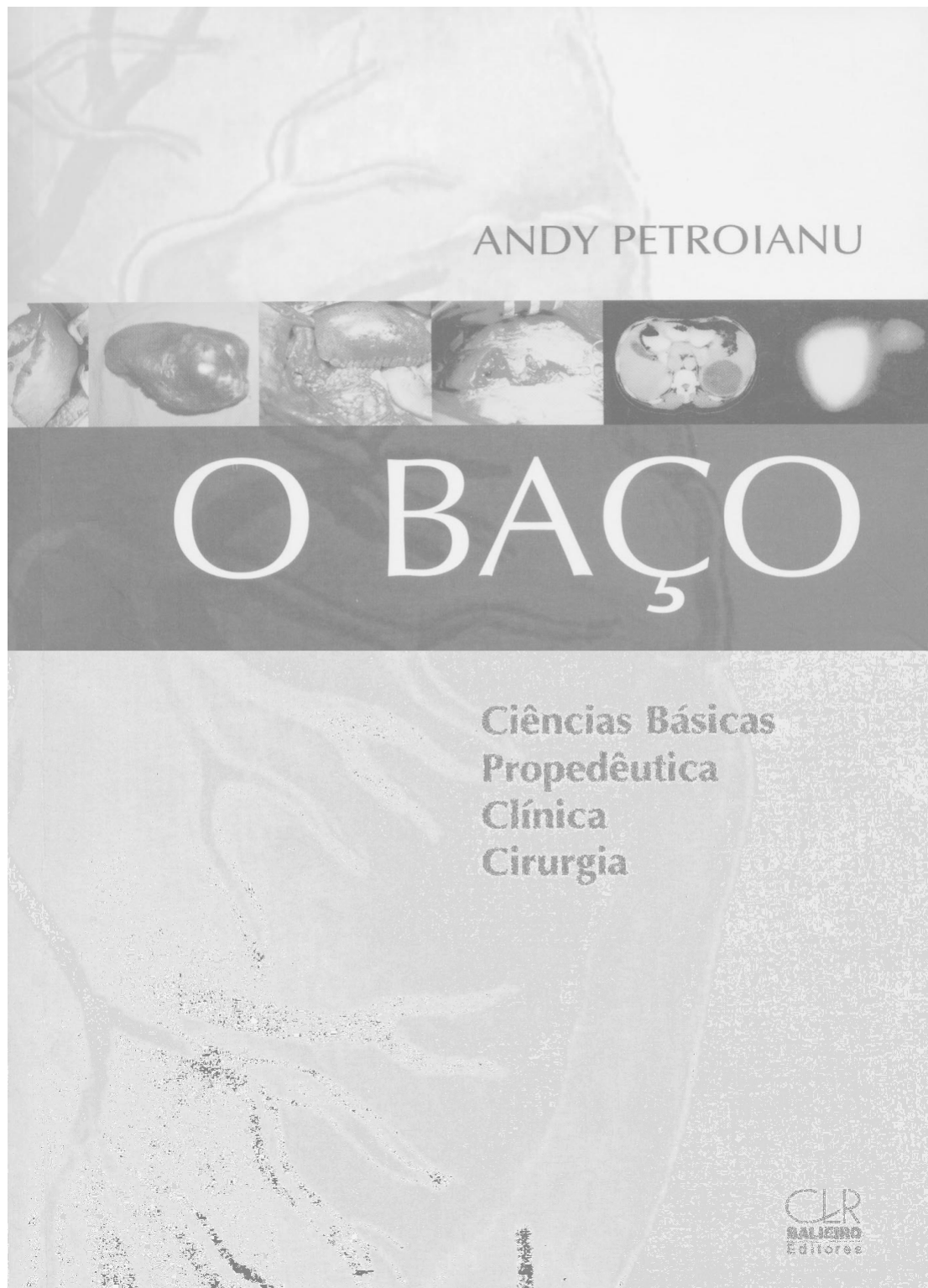
Eu _____, RG Nº _____, aceito a participação como voluntário nesta pesquisa científica, e estou ciente de que a minha identidade e privacidade serão mantidas em sigilo durante toda a pesquisa, de que terei a garantia de esclarecimentos suficientes antes e durante o curso da pesquisa, de que terei a liberdade de recusar sua participação ou retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, de que serei reembolsado, pelos pesquisadores, caso surja alguma despesa eventual decorrente de minha participação nesta pesquisa, bem como das formas de indenização, caso me sinta lesado por danos eventuais. Estou ciente também que esta pesquisa não colocará em risco a minha vida e minha saúde, pois ela será realizada em condições corretas, segundo as exigências de normas técnicas, condições adequadas de laboratório e por profissional qualificado. Estou ciente que será retirado de uma veia do meu braço 15ml de sangue para a pesquisa. Compreendo também a importância e os benefícios pelos esclarecimentos que esta pesquisa trará, sobre a doença esquistossomose e melhorias para o tratamento dos portadores da doença.

Recife _____ de _____ de 2004

Paciente_____
Testemunha_____
Testemunha_____
Pesquisador

ANEXO VI

Capítulo “Cirurgia esplênica na criança” (livro “O baço”)



CAPÍTULO 50

Cirurgia Esplênica na Criança

Carlos Teixeira Brandt
Carlos Roberto Carvalho Leite

INTRODUÇÃO

Em face do sucesso da esplenectomia na solução de problemas clínicos e da falta de efeito desfavorável desse procedimento, foi difundida, durante muito tempo, a idéia de que o baço não era essencial para o organismo. Sua perda era bem tolerada, não causando impacto no paciente. Entretanto, mudança nesses conceitos veio com a observação da ocorrência de sepsse fulminante em crianças submetidas a esplenectomia^{34,49}. Estudos clínicos e experimentais mostraram a importância do baço na defesa imunológica do organismo, o que obriga a uma postura cirúrgica mais conservadora em relação às doenças que atingem esse órgão⁴⁹.

DESENVOLVIMENTO ONTOGENÉTICO DO BAÇO

O baço, maior órgão linfóide do organismo, difere dos outros pelo fato de agir como um filtro mais para a circulação vascular do que para a circulação linfática^{4,85}.

A evolução das funções do baço depende do desenvolvimento de canais vasculares, do influxo de células reticulares para a formação de uma rede de filtração, do influxo de células do timo e da medula óssea para a formação do baço maduro e da maturação de populações celulares transitórias e residentes⁴⁵. O baço, juntamente com o timo, é o elemento mais precoce do sistema linforreticular que aparece filogeneticamente; surge como uma coleção de células mesenquimais, um espessamento no epitélio colônico do mesogástrico dorsal, tornando-se evidente, como um órgão, no início do terceiro mês, assumindo sua posição final no quadrante superior esquerdo em relação com o estômago e outros órgãos no quarto mês de vida fetal³⁴.

O baço, inicialmente, é formado por uma rede ramificada de tecido conjuntivo e células reticulares. Com oito semanas, os vasos sangüíneos aparecem como finas alças. A vasculogênese prossegue de um sistema de alças fechadas até a formação de seios revestidos por endotélio. A maturação vascular e a das células reticulares são processos interdependentes que permitem o surgimento de áreas destinadas a transformar-se nas polpas vermelha e branca. No primeiro trimestre, o baço desempenha eritropoese, sendo substi-

tuído, subsequentemente, pela medula óssea. Os granulócitos e os macrófagos chegam ao baço antes dos linfócitos, que aparecem com 13 a 15 semanas⁴⁵.

Ao nascimento, a relação do órgão com o peso do corpo é maior do que em qualquer outra época da vida. Ele aumenta o peso durante o primeiro ano de vida, excedendo em 300 a 400% a taxa de crescimento de todos os outros órgãos. Entretanto, poucos folículos linfóides estão presentes, e não há centros germinativos que começam a aparecer três semanas após o nascimento. Com um ano, a polpa branca é muito desenvolvida com um grande número de folículos linfóides e centros germinativos. O baço, então, adquire o aspecto histológico adulto^{4,34}.

ESTRUTURA E FUNÇÃO

Anatomia

O baço é um órgão friável e muito vascularizado, localizado no hipocôndrio esquerdo. É recoberto por peritônio, exceto no hilo, e mantém-se na sua posição pelos ligamentos esplenogástrico, esplenofrênico, esplenorenal e frenocólico⁴. Contém 25% do tecido linfóide corporal. O órgão adulto pesa aproximadamente 150g e pode ser visto em uma secção transversal, consistindo de uma polpa vermelha com pequenas ilhas de agregados linfocitários formando a polpa branca²⁷.

O baço adulto é envolto em uma cápsula de tecido conjuntivo com vários milímetros de espessura. A cápsula contém poucas fibras musculares, porém não é capaz de uma contração significativa. A cápsula fibroelástica sofre espessamento e estende-se para dentro do parênquima esplênico na forma de trabéculas. Estas compartimentalizam o baço e o subdividem para formar uma delicada estrutura reticular de apoio⁴.

A artéria esplênica é um ramo do tronco celíaco. Transporta 5% do débito cardíaco, ou aproximadamente 250 litros de sangue por dia, no adulto^{85,87}. Esse rico suprimento vascular é essencial para que o baço possa funcionar como um filtro vascular no sistema reticuloendotelial. A artéria esplênica divide-se em ramos segmentares no hilo do baço. Esses ramos seguem o trajeto das trabéculas esplênicas e são as artérias trabeculares. Essa distribuição segmentar do suprimento sangüíneo ajuda a compreender as fraturas transversais observadas freqüentemente e o padrão segmentar

Normas para publicação na Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgias



INSTRUÇÕES AOS AUTORES

A Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgias, órgão oficial do CBC, é publicada bimestralmente, em um único volume anual, e se propõe à divulgação de artigos de todas as especialidades cirúrgicas, que contribuam para o seu ensino, desenvolvimento e integração nacional.

Os artigos publicados na revista do Colégio Brasileiro de Cirurgias seguem os requisitos uniformes recomendados pelo Comitê Internacional de Editores de Revistas Médicas (www.icmje.org), e são submetidos à avaliação por pares (peer review). O Conselho de Revisores é composto por especialistas, Membros do CBC, que recebem os textos de forma anônima e decidem por sua publicação. No caso de ocorrência de conflito de pareceres, o Diretor de Publicações avalia a necessidade de um novo parecer. Artigos recusados para publicação são devolvidos aos autores. Somente serão submetidos à avaliação os trabalhos que estiverem dentro das normas para publicação na Revista. Os artigos aprovados para publicação poderão sofrer pequenas alterações de ordem editorial, por parte do Diretor de Publicações.

A responsabilidade de conceitos ou asserções emitidos em trabalhos e anúncios publicados na Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgias cabe inteiramente ao(s) autor(es) e aos anunciantes. Não serão aceitos trabalhos já publicados ou simultaneamente enviados para avaliação em outros periódicos.

Todo artigo enviado para publicação deverá ser acompanhado de carta assinada por todos os autores, ressaltando que o mesmo é inédito e autorizando sua publicação na Revista do CBC. Esta carta deve incluir ainda:

- 1) **Declaração de Conflito de Interesse**, para cumprimento da Resolução do CFM nº 1595/2000, que veda artigos, mensagens e matérias promocionais de produtos ou equipamentos de uso na área médica.
- 2) **Informações sobre fonte(s) de financiamento do trabalho**, se houver, incluindo o número do processo.
- 3) **Certificado de aprovação do trabalho pela Comissão de Ética em Pesquisa da Instituição**. Toda matéria relacionada à investigação humana e à pesquisa animal deve ter aprovação prévia da Comissão de Ética da Instituição onde o trabalho foi realizado, de acordo com as recomendações da Declaração de Helsinki (de 1975 revisada em 1983), das Normas Internacionais de Proteção aos Animais e da Resolução nº 196/96 do Ministério da Saúde sobre pesquisa envolvendo seres humanos.

O **Conselho de Revisores** é responsável pela avaliação científica dos trabalhos encaminhados à Revista e pela indicação ou não para sua publicação. Os pareceres dos revisores podem sugerir modificações com o intuito de melhorar a qualidade do trabalho e adaptá-lo para publicação.

Os **Consultores** são membros do CBC cujos pareceres são solicitados pelo Diretor de Publicações em casos de avaliações conflitantes por parte dos revisores.

O **Conselho Editorial** é composto pelos membros do Diretório Nacional do CBC, eleitos para o biênio, e por seus ex-presidentes, responsável pela política editorial da Revista.

INFORMAÇÕES GERAIS

Os artigos apresentados para publicação devem ser inéditos, impressos em computador, espaço duplo, papel branco, nos formatos de 210 mm x 297 mm ou A4, em páginas separadas, devidamente numeradas e com margens de 2,5 cm, acompanhadas de disquete contendo o respectivo material, digitados no programa Word for Windows 6.0 ou o mais recente, corpo de letra arial, tamanho 12. O(s) autor(es) deverá(ão) enviar duas cópias do trabalho (inclusive das ilustrações) para:

COLÉGIO BRASILEIRO DE CIRURGIAS
Diretoria de Publicações
Rua Visconde Silva, 52 / 3º andar
CEP 22271-090 - Rio de Janeiro - RJ - Brasil
Tel.: (21) 2537-9164 / Fax.: (21) 2286-2595
E-mail: publicacao@cbc.org.br
<http://www.cbc.org.br>

A Revista do CBC avalia para publicação os seguintes tipos de artigos: Editoriais (encaminhados pelo Diretor de Publicações), Artigos originais, Artigo de atualização (Revisão), Notas prévias, Relatos de casos e Cartas ao Editor.

Editorial: É o artigo inicial de um periódico. Geralmente a respeito de um assunto atual solicitado a Membros do CBC de reconhecida capacidade técnica e científica.

Artigo original: É o relato completo de investigação clínica ou experimental, prospectivo ou retrospectivo, estudo randomizado, ou duplo cego. Deve ser constituído de Resumo, Introdução, Método, Resultados, Discussão, Abstract e Referências. Recomenda-se cuidadosa seleção das referências, limitando-as em cerca de quarenta (40) procurando acrescentar sempre que possível artigos de autores nacionais. Deve conter no máximo seis (6) autores.

Artigo de atualização (Revisão): O Conselho Editorial incentiva a publicação de matéria de grande interesse para a Comunidade do CBC. O formato é livre, devendo ser preciso, completo e atual, acompanhado de uma análise do autor. A extensão (número de páginas) depende do assunto. Não é necessário resumo, apenas o abstract. É permitido um (1) autor e apenas um colaborador.

Nota Prévia: Constitui observação clínica original, ou descrição de inovações técnicas, apresentada de maneira concisa, de preferência não excedendo a quinhentas palavras, cinco referências, duas ilustrações, e abstract não estruturado. Permite-se três (3) autores.

Relato de caso: Descrição de casos clínicos de interesse geral seja pela raridade na literatura médica ou pela forma de apresentação não usual do mesmo. Não deve exceder a 600 (seiscentas palavras) e não necessita resumo, apenas abstract não estruturado, cinco referências e duas ilustrações. Número de autores até cinco (5).

Cartas ao Editor: Comentários científicos ou controvérsias com relação aos artigos publicados na Revista do CBC. Em geral tais cartas são enviadas ao autor principal do artigo em pauta para resposta e ambas as cartas são publicadas no mesmo número da Revista, não sendo permitida réplica.

Comunicação Científica: Conteúdo que aborde a forma da apresentação da comunicação científica, investigando os problemas existentes e propondo soluções. Por suas características, essa Seção será multidisciplinar, recebendo contribuições de médicos, cirurgiões e não-cirurgiões, e de outros profissionais das mais variadas áreas. Artigo com formato livre, com resumo e abstract.

FORMA E ESTILO

Os artigos devem ser concisos e redigidos em português. As abreviações devem ser limitadas aos termos mencionados repetitivamente, desde que não alterem o entendimento do texto, e devem ser definidas a partir da sua primeira utilização. Cada parte do artigo deve ser impressa em páginas separadas na seguinte ordem: 1) Página de Títulos, 2) Resumo e Descritores, 3) Texto, 4) Abstract e Key Words, 5) Referências, 6) Endereço completo do autor e e-mail, para correspondência, 7) Ilustrações e legendas, 8) Tabelas, 9) Outras informações.

ORGANIZAÇÃO DOS ARTIGOS ORIGINAIS

Página de Títulos: O título deve ser redigido em português e em inglês. Deve conter o máximo de informações e o mínimo de palavras. Não deve conter fórmulas, abreviações e interrogações. Deve ser acompanhado do(s) nome(s) completo(s) do(s) autor(es) seguido de seus títulos profissionais e do nome da Instituição onde o trabalho foi realizado.

Resumo estruturado: Necessário apenas para artigos originais. Deve conter no máximo 250 palavras. Deve ser informativo, contendo o objetivo, os procedimentos, os resultados com sua significância estatística e as conclusões. A estruturação deve seguir a seguinte ordem:

Objetivo: com o propósito do trabalho.

Método: descrição do material dos pacientes e dos métodos.

Resultados: descrição dos achados principais com dados

C

Revista do Colégio Brasileiro de

irurgiões

INSTRUÇÕES AOS AUTORES - Continuação

estatísticos e sua significância.

Conclusões: descrição das principais conclusões.

Descritores (antes unitermos): servem para pesquisa e recuperação de assuntos da literatura científica em bases de dados. Devem constar do DeCS (Descritores em Ciências da Saúde) criado pela BIREME e disponível em <http://decs.bvs.br>. Podem ser citados até dez (10) descritores.

TEXTO

Introdução: Deve indicar o objetivo do trabalho e a hipótese formulada. Informações que situem o problema na literatura e suscitem o interesse do leitor podem ser mencionadas. Devem-se evitar extensas revisões bibliográficas, histórico, bases anatômicas e excesso de nomes de autores. Não incluir dados nem conclusões.

Método (antes denominado pacientes ou material e métodos): Texto preciso, breve, evitando-se extensas descrições de procedimentos usuais. É necessário identificar precisamente todas as drogas, aparelhos, fios, substâncias químicas, métodos de dosagem, etc., mas sem utilizar nomes comerciais, nomes ou iniciais de pacientes, nem seus números de registro no Hospital. A descrição dos métodos deve possibilitar a reprodução dos mesmos por outros autores. Incluir descrição geral dos métodos estatísticos e a aprovação do trabalho pela Comissão de Ética da Instituição onde o trabalho foi realizado.

Resultados: Devem ser apresentados em sequência lógica no texto, e exclusivamente neste item, de maneira concisa, fazendo, quando necessário, referências apropriadas a tabelas que sintetizem achados experimentais ou figuras que ilustrem pontos importantes. Não fazer comentários nesta seção reservando-os para o capítulo Discussão. Não repetir o que já estiver nas tabelas.

Discussão: Deve incluir os principais achados, a validade e o significado do trabalho, correlacionando-o com outras publicações sobre o assunto. Deve ser clara e sucinta evitando-se extensa revisão da literatura, bem como hipóteses e generalizações sem suporte nos dados obtidos no trabalho. Neste item devem ser incluídas as conclusões desde que fundamentadas nos dados do trabalho e recomendações quando necessário.

Abstract: Deve conter até 250 palavras e ser estruturado da seguinte maneira:

Background: propósito do trabalho ou investigação.

Methods: descrição do material e métodos.

Results: descrição dos achados principais com dados estatísticos.

Conclusion: descrição das principais conclusões.

Key Words: vide Descritores.

Referências: Devem ser predominantemente de trabalhos publicados nos cinco últimos anos, restringindo-se aos trabalhos referidos no texto, em ordem de citação, numeradas consecutivamente e apresentadas conforme as Normas do Index Medicus. Observações não publicadas ou referências a "Summaries" de Congressos e comunicações pessoais devem ser citadas no texto, entre parênteses. Ex.: (Attie AD, et al: Hepatology, 1981, 1:492, Summary). **Mencionar todos os autores.** Os autores do artigo são responsáveis pela veracidade das referências. Exemplos de formas de referências:

em Revista: Jordan PH, Thonby J. Twenty years after parietal cell vagotomy and antrectomy for treatment of duodenal ulcer. *Ann Surg.* 1994;220(3):283-96.

em Livro: Bogossian I. Choque séptico: recentes avanços de fisiopatologia e do tratamento. Rio de Janeiro: Atheneu; 1992.

em Capítulo de Livro: Barroso FL, Souza JAG. Perfurações pépticas gástricas e duodenais. In: Barroso FL, Vieira OM, editores. *Abdome agudo não traumático - Novas propostas.* 1ª ed. Rio de Janeiro: Robe Editora; 1995. p. 201-220.

em Tese e Monografia: Chinelli A. Colectistomia laparoscópica: estudo de 35 casos [Dissertação]. Niterói: Universidade Federal Fluminense; 1992.

em Material Eletrônico:

Artigo: Morse SS. Factors in the emergence of infectious diseases. *Emerg Infect Dis* [serial on the Internet]. 1995 jan/mar [cited

1996 jun 5]; 1(1):[24 telas]. Available from: <http://www.cdc.gov/ncidod/EID/eid.htm>.

Arquivo de Computador: Hemodynamics III: The ups and downs of hemodynamics [computer program]. Version 2.2 Orlando (FL): Computerized Educational Systems; 1993.

Monografia em formato eletrônico: CDI, Clinical dermatology illustrated [CD-ROM]. Reeves JRT, Maibach H. CMEA Multimedia Group, producers. 2ª ed. Version 2.0 San Diego: CMEA; 1965.

Agradecimentos: Devem ser feitos às pessoas que contribuíram de forma importante para a sua realização.

TABELAS

Devem ser numeradas com algarismos arábicos, encabeçadas por suas legendas com uma ou duas sentenças, explicações dos símbolos no rodapé e digitadas separadamente, uma por página. Cite as tabelas no texto em ordem numérica incluindo apenas dados necessários à compreensão de pontos importantes do texto. Os dados apresentados em tabelas não devem ser repetidos em gráficos. A montagem das tabelas deve seguir as Normas de Apresentação Tabular, estabelecidas pelo Conselho Nacional de Estatísticas (Rev. Bras. Est., 24: 42-60, 1963). Incluir no máximo cinco (5) tabelas.

ILUSTRAÇÕES

São fotografias, gráficos, desenhos, etc., que não devem ser escaneadas e de preferência em preto e branco, medindo 127mmx178 mm. As ilustrações, em preto e branco serão reproduzidas sem ônus para o(s) autor(es), mas lembramos que devido seu alto custo para a Revista, devem ser limitadas a seis (6) para artigos originais e duas (2) para relatos de casos e notas prévias, e utilizadas quando estritamente necessárias. Todas as figuras devem ser referidas no texto, sendo numeradas consecutivamente por algarismo arábico. Cada figura deve ser acompanhada de uma legenda descrita em folha separada e colocada após as referências. Deve ser identificada no verso, através de uma etiqueta, com o nome do autor, número orientação espacial (usar setas) da mesma. Os desenhos e gráficos podem ser feitos em papel vegetal com tinta nanquim, ou ainda, utilizando impressoras jato de tinta ou laser, com boa qualidade, e nunca manuscritas. No caso de figuras ou fotos, devem ser enviados dois (2) conjuntos com indicação da posição, colocadas em envelopes sem usar clips sobre as mesmas.

Os autores que desejarem publicar em seus artigos fotografias coloridas poderão fazê-lo a um custo de R\$ 650,00 para uma foto por página. Fotos adicionais na mesma página sairão por R\$ 150,00 cada. O pagamento será efetuado através de boleto bancário, enviado ao autor principal quando da aprovação do artigo para publicação.

NORMAS PARA PUBLICAÇÕES SUPLEMENTOS OU ENCARTES NA REVISTA DO CBC

Toda e qualquer publicação deverá ter a aprovação Conselho Editorial para onde será encaminhada através da Diretoria de Publicações. Para isto, o interessado encaminhará uma solicitação por escrito endereçada ao Diretor de Publicações.

No caso de publicação de Fórum de Pesquisa, Congresso ou Jornada, o CBC deverá ser participante do evento. É exigido que o(s) organizador(es) da publicação seja(m) membro(s) ativo(s) do CBC.

A avaliação da publicação ficará a cargo do Conselho Editorial da Revista do CBC que, após análise, de acordo com as normas de redação vigentes, terá poderes para solicitar modificações ou recusá-las.

O pagamento das despesas com o trabalho gráfico e postagem será de total e completa responsabilidade do solicitante, e a distribuição de suplementos e encartes deverá incluir todos os membros do CBC.

ANEXO VIII

Normas para publicação na Revista Memórias do Instituto Oswaldo Cruz

MEMÓRIAS DO
INSTITUTO
OSWALDO
CRUZISSN 0074-0276 *printed
version*ISSN 1678-8060 *online
version*

INSTRUCTIONS TO AUTHORS

- ? [Scope and policy](#)
- ? [Format style](#)
- ? [Checklist for manuscripts to be submitted](#)

Scope and policy

The **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** is a multidisciplinary journal which publishes original research throughout the fields of tropical medicine (including pathology, field epidemiology and clinical studies) medical and veterinary parasitology (including protozoology, helminthology, entomology and malacology), and medical microbiology (virology, bacteriology and mycology). It particularly welcomes basic and applied research in biochemistry, immunology, molecular and cell biology, physiology, pharmacology and genetics related to these fields. Short communications are also considered. Review articles are invited. The journal publishes eight issues constituting one volume per year. Occasionally papers presented at symposia or congresses are published as supplements. Submitted papers must be written in Portuguese or English. English of low quality is a major cause of delay in publication and we strongly advise authors with English as a foreign language to have their manuscripts checked by someone with English as a first language, preferably a scientist.

Submission of a paper to the **Memórias** is understood to imply that it has not previously been published (except in an abstract form), and that it is not being considered for publication elsewhere. Responsibility for the accuracy of the material in the manuscript, including bibliographic citations, lies entirely with the authors.

Manuscripts will be peer-reviewed; acceptance will be based on scientific content and presentation of the material.

All material should be sent to the Editorial Office, **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Av. Brasil 4365, Pavilhão Mourisco sala 308, 21040-900 Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

Manuscripts that are not in accordance with these instructions will be immediately returned to authors.

Manuscripts and figures should be sent in quadruplicate (including photographs) together with a diskette containing the text (including tables, graphics and digitalized photographs) in Word or Word Perfect for Windows format (Macintosh formats should be converted). **Each manuscript should be accompanied by a covering letter, signed by all authors, containing the full address of the author who will deal with correspondence, his e-mail**

and fax number.

Authors submitting a manuscript do so on the understanding that if accepted for publication, copyright of the article, including the right to reproduce the article in all form and media, shall be assigned exclusively to the **Memórias**. The journal will not refuse any reasonable request by authors for permission to reproduce any contribution.

For other instructions the authors should consult and follow the most recent number of the **Memórias** or consult the home-page of the **Memórias** (<http://memorias.ioc.fiocruz.br/>), or contact the Editorial Office by phone (+55-21-2598.4335), Telefax (+55-21-2280.5048 / 2561.1442), or e-mails (E-mails: memorias@fiocruz.br/ memorias@ioc.fiocruz.br)

Format style

The manuscript should be prepared using standard word processing software and should be printed (font size 12) double-spaced throughout the text, figure captions, and references, with margins of at least 3 cm.

The manuscript should be arranged in the following order: running title, title, authors' names, institutional affiliations, summary, key words, introduction, materials and methods, results, discussion, acknowledgements, and references. Sponsorships and corresponding author (mentioning fax number and e-mail address) should be as a footnote on the first page.

Summary: up to 200 words (100 words in case of short communications). It should emphasize new and important aspects of the study or observations.

Key words: 3-6 items must be provided. Terms from the Medical Subject Headings (Mesh) list of Index Medicus should be used.

Introduction: should set the purpose of the study, give a brief summary (not a review) of previous relevant works, and state what new advance has been made in the investigation. It should not include data or conclusions from the work being reported.

Materials and Methods: should briefly give clear and sufficient information to permit the study to be repeated by others. Standard techniques need only be referenced.

Ethics: when reporting experiments on human subjects, indicate whether the procedures followed were in accordance with the ethical standards of the responsible committee on human experimentation (institutional or regional) and with the Helsinki Declaration of 1975, as revised in 1983. When reporting experiments on animals, indicate whether the institution's or a national research council's guide for, or any national law on the care and use of laboratory animals was followed.

Results: should be a concise account of the new information discovered, with the least personal judgement. Do not repeat in text all the data in the tables and illustrations.

Discussion: should be limited to the significance of the new information and relate the new findings to existing knowledge. Only unavoidable citations should be included.

Acknowledgements: should be short and concise, and restricted to those absolutely necessary.

References: must be accurate. Only citations that appear in the text should be referenced. Unpublished papers, unless accepted for publication, should not be cited. Work accepted for publication should be referred to as "in press" and a letter of acceptance of the journal must be provided. Unpublished data should only be cited in the text as "unpublished observations", and a letter of permission from the author must be provided. The references at the end of the paper should be arranged in alphabetic order according to the surname of the first author.

The titles of journals should be abbreviated according to the style used in the Index Medicus. Consult www.nlm.nih.gov/serials/lii.html.

- In the text use authors' surname and date: Lutz (1910) or (Lutz 1910).

With two authors it is

(Lutz & Neiva 1912) or Lutz and Neiva (1912).

When there are more than two authors, only the first is mentioned: Lutz et al. (1910) or (Lutz et al. 1910).

- At the end of the paper use the following styles:

Journal article

Chagas C, Villela E 1922. Forma cardiaca da tripanosomíase americana. Mem Inst Oswaldo Cruz 14: 15-61.

Book or Thesis

Morel CM 1983. Genes and Antigens of Parasites. A Laboratory Manual, 2nd ed., Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, xxii + 580 pp.

Chapter in book

Cruz OG 1911. The prophylaxis of malaria in central and southern Brasil. In R Ross, The Prevention of Malaria, John Murray, London, p. 390-398.

Illustrations: Figures and tables must be understandable without reference to the text.

- Figures should be mounted on a manuscript-size sheet. Photographs must be sharply focused, well contrasted, black and white glossy prints. Photographs and line drawings must be marked on the back with the author's name, the figure number and an arrow pointing to the top. If mounted onto a plate, the figures should be numbered consecutively with Arabic numbers. Magnification must be indicated by a line or bar in the figure, and referenced, if necessary in the caption (e.g., bar = 1 mm). Plates and line figures should either fit one column (8 cm) or the full width (16.5 cm) of the page and should be shorter than the page length to allow inclusion of the legend. Legends must be provided on a separate sheet. Letters and numbers on figures should be of a legible size upon reduction or printing. Colour

illustrations can only be accepted if the authors defray the cost. However, a colour photograph illustrates the cover of each issue of the Journal and authors are invited to submit illustrations with legends from their manuscript for consideration for the cover at no charge.

- Tables should supplement, not duplicate, the text and should be numbered with Roman numerals. A short descriptive title should appear above each table, with any explanations or footnotes (identified with a, b, c, etc.) below.

Short communications should communicate rapidly single results or techniques. They should occupy no more than four printed pages including figures and/or tables. They should not contain excessive references. References should be cited at the end of the paper using the same format as in full papers. A brief summary and three key words must be provided.

Alternative format: manuscripts may be submitted following the "Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals" produced by the International Committee of Medical Journal Editors also known as the Vancouver Style. In this case, authors should follow the guidelines in the fifth edition (Annals of Internal Medicine 1997; 126: 36-47, or at the website <http://www.acponline.org/journals/resource/unifregr/htm>) and will be responsible for modifying the manuscript where it differs from the instructions given here, if the manuscript is accepted for publication.

Authors should also follow the Uniform Requirements for any guidelines that are omitted in these Instructions.

Once a paper is accepted for publication, the authors must provide:

- a diskette containing the text of the final approved version of the manuscript (including tables and graphics) in Word or Word Perfect for Windows format (Macintosh formats should be converted);
- an **affidavit**, provided by the Editorial Office, signed by all authors. Authors from different countries or institutions may sign in different sheets containing the same basic statement;
- a copyright assignment form, provided by the Editorial Office, signed by the corresponding author.

Page charges: there will be no page charges.

Proofs: one set of page proofs will be supplied for the author to check for typesetting accuracy, to be returned by the stipulated date. No changes to the original manuscript will be allowed at this stage.

Offprints: authors will receive 30 free offprints. An order form will be sent to the author enabling further offprints to be ordered at prices listed on the form.

Checklist for manuscripts to be submitted

Please check every item below before submitting your manuscript to **Memórias do Instituto**

Oswaldo Cruz.

- Please provide a cover letter, **signed by all authors**, with your submission specifying the corresponding author as well as an address, telephone and facsimile number, and e-mail.
- Submit four printed copies of your manuscript, each with a complete set of original illustrations, and a diskette containing the text, tables, graphics and digitalized photographs.
- The entire manuscript (including tables and references) must be typed double-spaced, font size 12, and printed on standard-sized paper. The left and right margins must be at least 3 cm.
- Please number pages beginning with the title page.
- The title page must include a running headline of not more than 40 characters, a title of no more than three printed lines (250 letters and spaces), authors (no titles or degrees), institutional affiliations, complete address of author to whom correspondence must be addressed, and footnotes indicating sources of financial support and changes of address.
- The order of appearance of material in all manuscripts should be as follows: running headline, title, authors, institutional affiliations, abstract, key words, footnotes, introduction, materials and methods, results, discussion, acknowledgements, references, tables, legends for figures, and figures.
- References must be cited on the line of the text and in parentheses, e.g., (Chagas 1909). References not cited in the text cannot appear in the reference section. Reference citations must follow the format established by the "Index" (see examples in Format style).
- If you reference your own unpublished work (i.e., an "in press" article) you must enclose an acceptance letter from the journal.
- If you cite unpublished data that are not your own, you must provide a letter of permission from the author of that publication.
- Please provide three glossy or laser-produced prints of each figure. Label all figures with the first author's name and figure number (place typed label on back of figure). Provide a figure legend for each figure on a separate page at the end of the manuscript.
- Tables must be on a separate page at the end of the manuscript. A short descriptive title must be provided for each table.

© 1997-2006 **Fundação Oswaldo Cruz**

Av. Brasil, 4365
21040-900 Rio de Janeiro RJ Brazil
Tel.: +55 21 2598-4335
Fax: +55 21 2280-5048 / 2561-1442

memorias@fiocruz.br

ANEXO IX

Dados clínicos e resultados da produção de NO, IL-6, IL-12 e atividade da SOD nos 4 grupos

Dados clínicos e resultados dos pacientes esquistossomóticos hepatoesplênicos (Grupo EHE)

Nº	Idade	Sexo	NO ¹	IL-6 ²	IL-12 ²	SOD ³
1	19	M	5,5	620,0	5,0	14,3
2	24	F	6,4	631,0	4,0	11,4
3	30	F	4,2	437,0	4,0	11,0
4	10	F	3,0	557,0	11,0	9,1
5	19	F	6,8	591,0	3,0	5,5
6	21	M	5,0	88,0	6,0	6,6
7	23	F	5,2	500,0	5,0	4,5
8	22	F	6,9	607,0	2,5	16,2
9	21	F	4,3	49,0	3,0	7,1
10	21	F	7,5	599,0	3,6	4,5
11	17	F	4,1	477,0	4,5	9,3
12	13	F	5,0	459,0	3,5	11,3
Média ± DP	20,0 ± 5,1	2M/10F	5,3 ± 1,3	468,0 ± 198,0	4,6 ± 2,3	9,2 ± 3,8

1: µmol/ml; 2: µg/ml; 3: uSOD/mg proteína

Dados clínicos e resultados dos pacientes esquistossomóticos hepatoesplênicos submetidos à esplenectomia e ligadura da veia gástrica esquerda (Grupo EHE/ELGE)

Nº	Idade	Sexo	NO ¹	IL-6 ²	IL-12 ²	SOD ³
1	18	F	6,9	606,0	1,0	7,7
2	25	M	6,9	650,0	1,0	4,3
3	23	F	6,8	673,0	1,0	7,4
4	27	F	6,6	658,0	1,0	7,3
5	23	M	6,0	598,0	1,0	11,3
6	26	F	6,8	627,0	1,0	12
7	27	M	7,3	608,0	3,2	13,5
8	23	M	6,0	599,0	1,0	5,4
9	30	F	6,9	644,0	1,2	6,8
10	23	F	6,5	620,0	1,0	7,3
11	27	F	6,1	629,0	1,2	5,2
12	28	F	7,2	640,0	2,0	8,6
13	20	F	7,1	620,0	1,1	14,3
Média ± DP	24,6 ± 3,4	4M/9F	6,7 ± 0,4	628,6 ± 23,4	1,3 ± 0,6	8,5 ± 3,2

1: µmol/ml; 2: µg/ml; 3: uSOD/mg proteína

Dados clínicos e resultados dos pacientes esquistossomóticos hepatoesplênicos submetidos à esplenectomia, ligadura da veia gástrica esquerda e auto-implante esplênico (Grupo EHE/ELGE/AI)

Nº	Idade	Sexo	NO ¹	IL-6 ²	IL-12 ²	SOD ³
1	16	M		626,0	1,4	8,7
2	19	F	6,3	618,0	1,0	7,3
3	24	F	6,5	640,0	1,0	4,3
4	19	M	12,0	643,0	1,0	7,3
5	25	M	8,0	622,0	1,0	5,1
6	25	F	6,3	639,0	1,0	6,4
7	24	M	5,4	642,0	6,0	4,5
8	25	F	5,4	648,0	1,3	14,3
9	16	F	8,0	625,0	1,0	4,8
10	22	M	8,2	625,0	1,1	4,5
11	18	F	8,4	635,0	1,0	6,5
12	16	F	7,2	637,0	1,0	8,3
13	17	M	8,1	637,0	1,0	13,9
14	17	F	7,0	631,0	3,8	5,3
15	16	F	7,0	624,0	3,0	3,7
16	22	F	9,1	622,0	2,0	7,8
17	20	F	9,2	621,0	1,0	12,2
18	25	F	8,0	620,0	2,0	7,2
19	17	F	6,0	670,0	2,5	7,1
Média ± DP	20,2±3,6	6M/13F	7,4 ± 1,6	632,9 ± 12,8	1,7 ± 1,3	7,3 ± 3,1

1: µmol/ml; 2: µg/ml; 3: uSOD/mg proteína

Dados clínicos e resultados dos indivíduos sadios (Grupo CT)

Nº	Idade	Sexo	NO ¹	IL-6 ²	IL-12 ²	SOD ³
1	15	M		585,0	3,0	5,3
2	28	F	12,0	595,0	1,0	4,2
3	20	F	12,0	663,0	1,0	8,9
4	24	M	5,0	583,0	1,0	4,3
5	25	F	8,2	655,0	4,0	2,3
6	25	M	6,0	630,0	1,0	5,8
7	20	F	6,6	655,0	4,0	8,2
8	17	F	4,0	677,0	2,0	8,2
9	15	M	6,0	679,0	3,0	5,6
10	15	F	12,0	673,0	2,2	2,7
11	16	F	8,0	642,0	2,1	6,3
12	19	M	7,0	612,0	3,0	4,1
13	17	F	7,8	660,0	2,5	2,9
14	19	M	11,0	643,0	2,0	3,8
15	15	M	11,0	636,0	1,5	4,2
Média ± DP	19,3±4,3	7M/8F	8,2 ± 2,7	639,2 ± 32,2	2,2 ± 1,0	5,1 ± 2,1

1: µmol/ml; 2: µg/ml; 3: uSOD/mg proteína