

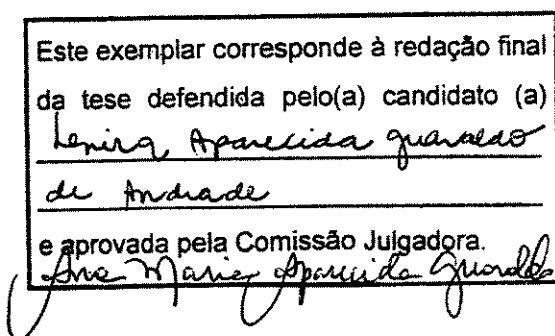
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA



LENIRA APARECIDA GUARALDO DE ANDRADE

ESQUISTOSSOMOSE MANSÔNICA EM CAMUNDONGO NOD/Uni
(non-obese diabetic), MODELO DO DIABETES MELLITUS TIPO 1



Tese de Mestrado
apresentada ao Instituto de
Biologia da UNICAMP para
obtenção do título de Mestre
em Parasitologia.

Orientadora: Profa. Dra. Ana Maria Aparecida Guaraldo

CAMPINAS

2003

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

UNIDADE	30
Nº CHAMADA	UNICAMP
	Ana24e
V	EX
TOMBO BC	53875
PROC.	124103
C	☐
D	☒
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	20/05/03
Nº CPD	

ii

CM001B4056-6

B1B 10 290966

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP

An24e

Andrade, Lenira Aparecida Guaraldo de

Esquistossomose mansônica em camundongo NOD/Uni (non-obese diabetic), modelo do Diabetes Mellitus Tipo 1/Lenira Aparecida Guaraldo de Andrade. -- Campinas, SP:[s.n.], 2003.

Orientadora: Ana Maria Aparecida Guaraldo

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas.

Instituto de Biologia

1. *Schistosoma mansoni*. 2. Diabetes Mellitus. 3. Granuloma. 4. Vermes.
- I. Ana Maria Aparecida Guaraldo. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.

Campinas, 18 de fevereiro de 2003

Banca Examinadora:

Profa. Dra Ana Maria Aparecida Guaraldo (Orientadora) Ana Maria Aparecida Guaraldo

Profa. Dra. Eliana Maria Zanotti-Magalhães Eliana Magalhães

Prof. Dr. Francesco Langone Francesco Langone

Prof. Dr. Odair Benedito Ribeiro _____

Profa. Dra. Leonilda Maria Barbosa dos Santos _____

200312370

Dedicatória e Agradecimentos.

Dedico este trabalho
À minha mãe Olívia
Ao meu pai Aldo (*in memoriam*).
Aos meus filhos, Francine, Frederico Guilherme e Felipe Alexandre, pelo apoio.
Ao meu abnegado, competente e compreensivo marido, Júlio César
O meu amor e gratidão por estes anos de paciência.
Às minhas irmãs gêmeas, Ana Maria e Lireny,
Espelhos de exemplo profissional,
Sem as quais meu caminho seria muito mais difícil.
À minha Orientadora, pelo aprendizado constante,
Fé nas minhas qualidades e parceria em todos os momentos.
Aos meus amigos que me acompanharam,
E que me amam incondicionalmente,
Que me ampararam com seu estímulo, carinho e suporte,
em especial à Delma, Daniele e Maria Helena.
Aos meus colegas do CEMIB em especial ao Marcos Zanfolin,
no pronto atendimento das necessidades do trabalho.
Em especial ao Dr. Rovilson Gilioli,
pelos ensinamentos, exemplo e amizade.
Aos funcionários e docentes do Departamento de Parasitologia,
Pela compreensão, amizade, disponibilidade e paciência,
especialmente ao Ivo, pelo auxílio inicial com a manutenção do parasita.
Aos colegas de curso, pelo companheirismo.
Aos professores Dra. Eliana, Dr. Odair e Dr. Francesco,
Pelas valiosas sugestões na análise prévia.
Ao Dr. Humberto de Araújo Rangel,
emérito fundador do CEMIB, por me aceitar.
Aos docentes Marlene Tiduko Ueta, Leonilda Maria Barbosa dos Santos e Tomomaza Yano,
pelo estímulo durante estes anos.
À Dra. Sílvia Gatti, pelo empréstimo de infra-estrutura para uso de isoladores.
Aos animais NOD, que deram a vida pelos meus resultados
Obrigada

Três coisas

De tudo ficaram três coisas
A certeza de que estamos começando,
A certeza de que é preciso continuar, e
A certeza de que podemos ser interrompidos antes de terminar

Fernando Sabino

SUMÁRIO

	PÁGINA
RESUMO	xi
ABSTRACT	xiii
1.INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	3
2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	3
3.REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
3.1. DIABETES MELLITUS	4
3.2 DIABETES EXPERIMENTAL	5
3.3.O DIABETES EM CAMUNDONGO NOD	6
3.3.1. DESCRIÇÃO DA LINHAGEM	6
3.3.2.DESTRUIÇÃO DA CÉLULAS BETA DAS ILHOTAS DE LANGERHANS	7
3.4.ESQUISTOSSOMOSE MANSÔNICA	10
3.4.1.A DOENÇA	10
3.4.2.GRANULOMAS E RESPOSTA IMUNE	10
3.4.3.DOENÇAS CONCOMITANTES À ESQUISTOSSOMOSE	13
3.4.4.O PÂNCREAS NA ESQUISTOSSOMOSE	13
3.4.5.ESQUISTOSSOMOSE E DIABETES	15
4.MATERIAL E MÉTODOS	18
4.1.MOLUSCOS	18
4.2. <i>SCHISTOSOMA MANSONI</i>	18
4.3.INFEÇÃO DE <i>BIOMPHALARIA GLABRATA</i>	18
4.4.CAMUNDONGOS NOD/Uni	18
4.5.DETERMINAÇÃO DA GLICOSÚRIA	19
4.6.GRUPOS EXPERIMENTAIS	20
4.7.MANUTENÇÃO DOS ANIMAIS EM ISOLADORES	20
4.8.INFEÇÃO DE CAMUNDONGOS NOD/Uni	21
4.9.SOBREVIDA DOS CAMUNDONGOS	21
4.10.PERFUSÃO DOS CAMUNDONGOS INFECTADOS	22
4.11.PREPARAÇÕES HISTOLÓGICAS	22
4.12. DETERMINAÇÃO DO COMPRIMENTO DOS VERMES	22
4.13 FOTOGRAFIAS	23
4.14.MONITORAMENTO SANITÁRIO DOS ANIMAIS	23
4.15. MEDIDAS DE GRANULOMAS HEPÁTICOS	23
4.16.ANÁLISE ESTATÍSTICA	24
5.RESULTADOS	25
5.1.PREVALÊNCIA DO DIABETES EM CAMUNDONGOS NOD/Uni	25
5.2.IDADE MÉDIA DA EXPRESSÃO DO DIABETES NOS CAMUNDONGOS NOD/Uni	25
5.3.QUALIDADE SANITÁRIA DE CAMUNDONGOS SPF	25
5.4.CONSTATAÇÃO DA INFECÇÃO PELO <i>SCHISTOSOMA MANSONI</i>	26
5.5.AVALIAÇÃO DA SOBREVIDA DE CAMUNDONGOS NOD/Uni	26
5.6. GRUPO FDNI	26
5.7.GRUPO FDI	27
5.8. GRUPO MDNI	27
5.9. GRUPO MDI	28
5.10 ASSOCIAÇÃO DO DIABETES COM PREENHES E ESQUISTOSSOMOSE	28
5.10.1. GRUPO DE DIABÉTICAS PREENHES NÃO INFECTADAS-FDPNI	28
5.10.2. GRUPO DE DIABÉTICAS PREENHES INFECTADAS- FDPI	28
5.11. PÂNCREAS	29
5.12.HEPATOMEGALIA	31
5.13.HISTOPATOLOGIA DOS GRANULOMAS HEPÁTICOS	33

5.14. ÁREA DE GRANULOMAS HEPÁTICOS	33
5.14.1 EM CAMUNDONGOS FÊMEOS	33
5.14.2. EM CAMUNDONGOS MACHOS	34
5.14.3.EFEITO DA PRENHEZ EM CAMUNDONGO NOD/Uni DIABÉTICO	34
PRANCHAS DE FOTOS	37
5.15. COMPRIMENTO DE VERMES ADULTOS DE <i>SCHISTOSOMA MANSONI</i>	54
5.15.1. AVALIAÇÃO DO GRUPO CONTROLE FND E MND	54
5.15.2. VERMES FÊMEOS	54
5.15.3. VERMES MACHOS	55
5.15.4.EFEITO DA GLICOSÚRIA SOBRE O COMPRIMENTO DE VERMES MACHOS	56
TABELA 4	58
TABELA 5	59
FIGURAS	60
6.DISSCUSSÃO	74
7.CONCLUSÕES	85
8.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	87
APENDICE A- Análise Estatística da área dos granulomas hepáticos em camundongos NOD	105
APENDICE B- Análise Estatística do efeito do diabetes sobre o comprimento de vermes adultos de <i>Schistosoma mansoni</i>	109

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Sobrevida de camundongos NOD/Uni diabéticos e não diabéticos, infectados ou não pelo <i>S. mansoni</i>	27
Tabela 2- Médias de peso de pâncreas (g) nos grupos infectados de acordo com a glicosúria aos 49 dias de infecção por <i>S. mansoni</i>	30
Tabela 3 - Hepatomegalia média nos grupos experimentais de camundongos NOD/Uni em função do número de cercárias de <i>S. mansoni</i> e da categoria de diabetes	32
Tabela 4 - Média de comprimento (mm) de vermes machos (VM) e fêmeos (VF) na sétima semana de infecção pelo <i>Schistosoma mansoni</i> em camundongos NOD/Uni fêmeos e machos, diabéticos, não diabéticos e fêmeo diabético prenhe, em função da glicosúria e número de cercárias	58
Tabela 5 - Porcentagem de Redução de comprimento de vermes machos e fêmeos em relação aos grupos controles não diabéticos (MNDI, FNDI), segundo a glicosúria	59

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Idade (semanas) de camundongos NOD/Uni machos e fêmeos no início da expressão do diabetes (≥ 100 mg glicose/dL urina) no primeiro ano do experimento.....	60
Figura 2 - Idade (semanas) de camundongos NOD/Uni machos e fêmeos no início da expressão do diabetes (≥ 100 mg glicose/dL urina) no segundo ano do experimento.....	61
Figura 3 - Sobrevida de fêmeas diabéticas não infectadas.....	62
Figura 4 - Sobrevida de machos diabéticos não infectados após a expressão do diabetes	63
Figura 5 - Média de sobrevida (%) de fêmeas NOD/Uni infectadas com 10 cercárias de <i>S. mansoni</i> comparado com o grupo controle não infectado após a expressão do diabetes.....	64
Figura 6 - Média de sobrevida (%) de machos NOD/Uni infectados com 10, 25, ou 50 cercárias de <i>S. mansoni</i> comparado com o grupo não infectado após a expressão do diabetes.....	65
Figura 7 - Pesos médios de pâncreas (g) em MNDI/FNDI (glicosúria 0) e MDI/FDI de acordo com as glicosúrias ao final da infecção com 10, 25 ou 50 cercárias.....	66
Figura 8 - Hepatomegalia média em camundongos NOD/Uni machos diabéticos e não diabéticos, controle e infectados pelo <i>Schistosoma mansoni</i> em função do número de cercárias e das categorias de diabetes.....	67
Figura 9 - Hepatomegalia média em camundongos NOD/Uni fêmeos diabéticos e não diabéticos, controle e infectados pelo <i>Schistosoma mansoni</i> em função do número de cercárias e das categorias de diabetes.....	68
Figura 10 - Diagrama de caixa (Box Plot) da área dos granulomas hepáticos em camundongos NOD/Uni machos diabéticos e não diabéticos, em função da glicosúria.....	69
Figura 11 - Diagrama de caixa (Box Plot) da área dos granulomas hepáticos em camundongos NOD/Uni fêmeos diabéticos e não diabéticos, em função da glicosúria	69
Figura 12 - Diagrama de caixa (Box Plot) da área dos granulomas hepáticos em camundongos NOD/Uni fêmeos não diabéticos e fêmeos diabéticos prenhes, em função da glicosúria.....	70

ÍNDICE DE FIGURAS (continuação)

Página

Figura 13 - Diagrama de caixa (Box Plot) da área dos granulomas hepáticos em camundongos NOD/Uni fêmeos diabéticos e fêmeos diabéticos prenhes, em função da glicosúria.....	70
Figura 14 - Diagrama de caixa (Box Plot) para comprimento (mm) de vermes fêmeas do <i>Schistosoma mansoni</i> em camundongos NOD/Uni fêmeos e machos diabéticos e não diabéticos e fêmeos diabéticos prenhes.....	71
Figura 15 - Diagrama de caixa (Box Plot) para comprimento de vermes machos do <i>Schistosoma mansoni</i> em camundongos NOD/Uni fêmeos e machos diabéticos e não diabéticos e fêmeos diabéticos prenhes.....	71
Figura 16 - Diagrama de caixa (Box Plot) para comprimento (mm) de vermes machos do <i>Schistosoma mansoni</i> em camundongo NOD/Uni fêmeos diabéticos com 100, 250 e 1000 mg glicose/dL urina	72
Figura 17 - Diagrama de caixa (Box Plot) para comprimento de vermes machos do <i>Schistosoma mansoni</i> em camundongos NOD/Uni machos diabéticos com glicosúria de 100 e 2000 mg glicose/dL urina.....	72
Figura 18 - Porcentagem de Redução de comprimento de vermes machos (VM) e vermes fêmeos (VF) nos grupos experimentais em função da glicosúria	73

ÍNDICE DE APÊNDICES

APÊNDICE A – Análise estatística da área dos granulomas hepáticos em camundongos NOD/Uni

Página

Análise das Medidas dos Granulomas no grupo dos animais machos diabéticos e não diabéticos (Figura 10)105

Análise das medidas dos granulomas do grupo de fêmeas não diabéticas e fêmeas diabéticas (Figura 11)106

Análise das medidas dos granulomas do grupo de fêmeas não diabéticas e fêmeas diabéticas prenhes (Figura 12).....107

Análise das medidas dos granulomas do grupo de fêmeas diabéticas e das fêmeas diabéticas prenhes (Figura 13).....108

APÊNDICE B – Análise estatística do efeito do diabetes sobre o comprimento de vermes adultos de *S. mansoni* (Teste de Tukey)

Resultados para vermes fêmeos (Figura14).....109

Resultados para vermes machos (Figura 15).....110

Análise dos comprimentos dos vermes machos em fêmeas diabéticas (não prenhes) em função da glicosúria (Figura 16).....112

Análise dos comprimentos dos vermes machos em machos diabéticos, em função da glicosúria (Figura 17)113

RESUMO

A associação da esquistossomose com diabetes foi estudada em camundongo da linhagem NOD/Uni (non-obese diabetic), modelo para diabetes mellitus tipo 1. Há evidências recentes de que a resposta do tipo Th1 é prejudicial para o hospedeiro e Th2 protege contra o diabetes. A infecção pelo *Schistosoma mansoni* induz resposta celular do tipo Th2 no fígado humano e de camundongos. A evolução da esquistossomose em hospedeiro onde existe predomínio da resposta Th1, vigente no diabetes, pode resultar em alteração da expressão das duas doenças. Grupos de camundongos machos e fêmeas NOD/Uni não diabéticos e diabéticos, em vários estágios do desenvolvimento do diabetes foram infectados por 10, 25 ou 50 cercárias da linhagem BH do *S. mansoni*. Foi constituído também um grupo de camundongas prenhes infectadas e o respectivo controle não infectadas. O grau de glicosúria foi determinado para cada animal ao final da sétima semana de infecção e expresso em mg de glicose/dL de urina. Todos os animais NOD/Uni livres de patógenos específicos foram mantidos em isoladores de PVC flexível, com pressão positiva. A mortalidade de cada grupo experimental foi registrada durante sete semanas da infecção. O sistema porta-hepático foi perfundido para coleta dos vermes adultos que foram fixados para determinação de comprimento. Foi observada a histopatologia pancreática e hepática. As medidas de áreas de granulomas hepáticos foram registradas mediante o uso de um sistema informatizado acoplado à câmara clara no microscópio óptico, considerando dois diâmetros perpendiculares que cruzam o centro de um ovo isolado. Os resultados de comprimento de vermes foram analisados estatisticamente pelo teste de Tukey e a área dos granulomas pela análise de variância. A esquistossomose desempenhou papel protetor no diabetes, principalmente em machos NOD/Uni diabéticos, evidenciado pelo aumento da sobrevivência (70%) quando comparados com grupo não infectado de fêmeas diabéticas (25%) e machos diabéticos (41,6%). A associação do diabetes, esquistossomose e prenhez diminuiu a patologia das duas doenças. A esquistossomose induziu pancreatite severa precoce, aos 42 dias de infecção em fêmeas diabéticas submetidas a 10 cercárias. Em machos diabéticos infectados com 50 cercárias, o quadro de pancreatite foi brando, aos 56 dias de infecção. A área de granulomas hepáticos sofreu redução no decorrer do agravamento do diabetes. Animais no início do diabetes e normoglicêmicos tiveram o mesmo padrão de formação de granulomas. As fêmeas prenhes mostraram formação de granulomas comparadas ao controle não diabético.

Não houve hepatomegalia em animais com diabetes grave. O diabetes prejudicou o desenvolvimento de vermes machos e fêmeos em camundongas diabéticas. Vermes fêmeos sofreram redução de comprimento desde o início do diabetes, fato que não ocorreu nos vermes machos. Na vigência do diabetes severo, os vermes fêmeos apresentaram maior redução do comprimento (30,5%) do que os vermes machos (24%). Em microambiente do diabetes concomitante à prenhez, não houve redução do comprimento de vermes. A resposta Th1 durante o diabetes e o perfil resultante de resposta de fenótipo Th2 pela esquistossomose podem promover a regulação que inibe ou elimina a formação de granuloma no animal diabético, aumenta o tempo de sobrevida dos animais infectados, porém induz precocemente a pancreatite grave em fêmeas diabéticas.

ABSTRACT

In this study we have demonstrated the effect of diabetes under the development of *Schistosoma mansoni* in diabetes-prone non-obese diabetic (NOD) mice, model of human diabetes type 1. *S. mansoni* infection induces Th2 type cytokines at the liver of humans and mice. Recent reports have shown the evidence that Th1 responses are detrimental and Th2 responses are protective against diabetes type 1. In this study we took advantage of NOD mice, which has a Th1 profile and has a limited survival after the expression of the diabetes. Female and male of NOD strain were infected with 10, 25 and 50 cercariae from *S. mansoni*, BH strain, kept on *Biomphalaria glabrata* snails. SPF NOD mice were maintained in flexible PVC isolators with positive pressure. The test of diabetes Self-Stik® resulting color changes using urine samples was performed and the last lecture (mg glucose/dL urine) was determinant for the establishment of the groups: no diabetic, diabetic male and female, diabetic pregnant. We monitored the survival until 7 weeks after infection or after the first detection of glycosuria and we compared these results with those obtained in a diabetic non-infected control group. In specific-pathogen free conditions, the NOD/Uni diabetic mice survive for 3-4 weeks after the first detection of glycosuria. Infected diabetic males presented longer survival (70%) when compared with the control no infected diabetic males (41,6%). The survival result in the infected diabetic females was 25% compared with 21% in the no infected group. No mortality was registered in infected diabetic pregnant group. Seven weeks after infection, the animals were perfused and adult worms prepared to the measurements. The length of worms was determined. The results were analysed according to the glucose level at the end of infection. Tukey's test was used to compare diabetic and no diabetic groups, with 5% significance level. Paraffin sections of liver and pancreas were cut at 5 µm and stained with hematoxylin-eosin. Hepatic granuloma measurements were determined using a computer system to take into account two perpendicular diameters crossing the center of isolated egg. Statistical analysis were performed to granuloma ellipse area using variance analysis and Tukey test was used to compare the length of the worms. Animals at the beginning of diabetes and normoglycaemic showed the same pattern to granuloma formation. Pregnant diabetic showed granuloma formation compared to the control no diabetic. The statistical analysis showed the influence of the diabetic status of the host and the level of glucose on the development of adult worm. When the diabetic female infected was pregnant, there were no differences in the length of the worms compared to the control no diabetic. Severe pancreatitis was involved mainly in diabetic females which presented extensive destruction of the pancreatic parenchyma 42 days after infection with 10 cercariae. The autoimmune process involved in diabetes concerning the helminth development is shown mainly when glucose level in urine is high. The response Th1 during accelerated and destructive diabetes and the shift to Th2 profile in schistosomiasis result on Th1/Th2 dichotomy which promotes a mechanism of regulation that inhibits or eliminates the granuloma formation in diabetic animals.

ESQUISTOSSOMOSE MANSÔNICA EM CAMUNDONGO NOD/Uni (NON- OBESE DIABETIC), MODELO DO DIABETES MELLITUS TIPO 1

1. INTRODUÇÃO

A prevalência da esquistossomose mansônica no Brasil está estimada em 2,5 milhões e aproximadamente uma população de 25 milhões exposta ao risco de contraí-la (Passos & Amaral, 1998).

A existência do comprometimento pancreático na esquistossomose humana tem sido relatada desde 1952, porém é escassa a literatura referente ao estudo do diabetes associado à esquistossomose (Pereira & Barreto Netto, 1952).

A esquistossomose tem sido descrita como uma doença imunológica porque em cada estágio do ciclo do *Schistosoma mansoni*, vários antígenos são apresentados. A patologia principal da doença é a reação inflamatória que ocorre ao redor dos ovos do parasita, aprisionados no fígado. A formação do granuloma é dependente de mecanismos efetores da imunidade mediada por células (Boros & Warren, 1970).

Na pesquisa experimental da esquistossomose há alguns relatos de indução do diabetes em camundongos para avaliar o efeito do diabetes sobre o hospedeiro e o *S. mansoni*. Em trabalho preliminar no laboratório do Departamento de Parasitologia da UNICAMP, adotando camundongos diabéticos induzidos artificialmente pelo aloxano, houve constatação da redução do número de granulomas hepáticos e alteração no desenvolvimento somático de vermes adultos (Magalhães *et al.*, 1978). Entretanto, nesta estratégia de indução do diabetes, fica excluído o processo auto-imune característico do desenvolvimento do diabetes mellitus insulino dependente (diabetes tipo 1). Na evolução natural do diabetes, as células beta do pâncreas são irreversivelmente destruídas depois de um processo autoimune inflamatório crônico.

Modelos murinos portadores de imunodeficiência tais como camundongo nude, diabético e knockout são bons instrumentos de pesquisa para avaliar a patogênese da esquistossomose. O avanço tecnológico na área da Ciência em Animais de Laboratório vem contribuindo para o desenvolvimento de novos modelos para a pesquisa biomédica. Em se tratando do diabetes tipo 1, o diabetes mellitus expresso espontaneamente em camundongos da linhagem NOD é um modelo natural para o estudo do diabetes auto-imune. A associação da esquistossomose ao diabetes no modelo NOD viabiliza o estudo da evolução gradativa e concomitante das duas doenças.

Não há estimativa oficial do número de portadores da esquistossomose associado ao diabetes. Acredita-se que em zonas endêmicas esta associação não deve ser negligenciada.

Tanto na esquistossomose quanto no diabetes tipo 1 é importante a participação de citocinas relacionadas com a resposta celular. No diabetes, evidências indicam que as células T de fenótipo Th1, têm uma função primordial no desenvolvimento do diabetes autoimune (Rabinovitch, 1998).

Na esquistossomose a produção de citocinas Th2 está associada à formação do granuloma induzida pelos antígenos solúveis do ovo (Wynn & Cheever, 1995).

A evolução da esquistossomose induzindo a resposta de células T para um fenótipo Th2 em hospedeiro onde existe predomínio da resposta Th1, vigente no diabetes, pode resultar em alteração da expressão da doença autoimune.

2. OBJETIVOS

A proposta do presente trabalho foi associar experimentalmente o desenvolvimento do diabetes mellitus com a esquistossomose pelo *Schistosoma mansoni* em camundongo NOD (non-obese diabetic), modelo que desenvolve espontaneamente a doença autoimune, diabetes mellitus insulino-dependente (diabetes tipo 1). A evolução concomitante da patologia das duas doenças pode resultar em efeito sinérgico ou antagônico para o hospedeiro e para o trematódeo.

2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar a patologia da esquistossomose mediante a mortalidade dos animais infectados, histopatologia do fígado e pâncreas, área dos granulomas hepáticos, hepatomegalia e alterações de comprimento no trematódeo adulto, ao final da infecção pelo *S. mansoni*.

Avaliar a patologia do diabetes mediante histopatologia do pâncreas de camundongos NOD/Uni machos e fêmeas diabéticos em vários estágios da doença com ou sem infecção concomitante pelo *S. mansoni*.

Associar ao diabetes, a esquistossomose e prenhez para observar os efeitos sobre o hospedeiro e o parasita.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Diabetes mellitus

A prevalência mundial do diabetes mellitus foi estimada em 135 milhões pessoas em 1995 e acredita-se que este número chegue a 300 milhões até o ano de 2025, devido ao envelhecimento e dietas pouco saudáveis, ressaltando a natureza epidêmica do diabetes no primeiro quarto do século XXI (King et al., 1998).

O diabetes tipo 1 é uma doença autoimune órgão-específica e resulta da falha do pâncreas em produzir insulina, como consequência da destruição autoimune das células β produtoras de insulina, nas ilhotas de Langerhans (Eisenbarth, 1986). Estas células são irreversivelmente destruídas depois de um processo autoimune inflamatório crônico. Calcula-se que ao aparecimento da doença, somente 10% das células beta do pâncreas estejam presentes no pâncreas (Colle, 1990). A sobrevivência dos pacientes torna-se, portanto, dependente de insulina exógena. Sem a insulina, o corpo está impossibilitado de controlar os níveis de açúcar no sangue. O que caracteriza o diabetes é o aparecimento abrupto de hipoinsulinemia, com altos níveis de açúcar no sangue acompanhada de excessiva quantidade de corpos cetônicos. A incidência, no homem, é acentuadamente idade-dependente, aumentando até um pico, coincidente com o desenvolvimento da puberdade (Amiel *et al.*, 1991).

Desde que as células beta constituem aproximadamente 70% das células dentro da ilhota de Langerhans, em paciente com diabetes de longa duração as ilhotas se tornam atipicamente pequenas (Gepts, 1965). Além da insulite, aspecto histológico característico do diabetes decorrente do acúmulo progressivo de linfócitos nas ilhotas de Langerhans no pâncreas, no diabetes tipo 1 ocorre fibrose intersticial média e atrofia exócrina, sem outras anormalidades histológicas relevantes. Processos destrutivos que envolvem o pâncreas, capazes de dano às ilhotas incluem o câncer e a pancreatite aguda e crônica, podendo estar ou não associados ao diabetes (Gepts & Lecompte, 1981).

A síndrome do diabetes pode ocorrer devido a causas secundárias que incluem pancreatectomia, sobrecarga de ferro resultando em hemocromatose, excesso na produção de cortisol na síndrome de Cushing, excesso na secreção do hormônio de crescimento na acromegalia e em síndromes de resistência à insulina incluindo defeitos no receptor de insulina (Gepts & Lecompte, 1981).

O novo critério para o diagnóstico de diabetes mellitus, com uma nova classificação, foi instituído por um Comitê Internacional sustentado pela Associação Americana de Diabetes (ADA), que recomenda o uso da designação diabetes tipo 1, substituindo IDDM (diabetes mellitus insulino-dependente), para o diabetes juvenil, com absoluta deficiência de insulina, ou inadequada resposta secretória de insulina. Nesta nova classificação, o critério anterior de diagnóstico para o diabetes tipo 1, de 140 mg/dL (7,7 mmol/L) foi diminuído para ≥ 126 mg/dL de glicose no plasma (7,0 mmol/L), em jejum de pelo menos 8 horas (Report Committee, 1997).

O estudo populacional do diabetes mellitus insulino dependente (diabetes tipo 1) tem sido especialmente realizado na população Caucasiana, em pessoas com descendência do norte da Europa, particularmente Finlândia, Suécia, Escócia e Noruega (Rewers *et al.*, 1988). A incidência do diabetes tipo 1 na população caucasiana é aproximadamente 0,4%, tendendo a atingir 6% nas famílias onde já existe uma pessoa atingida (Vyse & Todd, 1996). Em gêmeos homozigóticos 30-40% dos portadores de diabetes têm igualmente um irmão ou uma irmã atingidos pela doença (Redondo *et al.*, 1999).

Dados da incidência do diabetes tipo 1 na América do Sul, são limitados. Estudos isolados conduzidos em São Paulo, (Ferreira *et al.*, 1993), Chile (Carrasco *et al.*, 1992) e Peru (Seclen *et al.*, 1997) tem mostrado respectivamente uma incidência anual de 7,6, 2,5 e 0,4 casos por 100.000 habitantes. A incidência encontrada na região subtropical, no sul do Brasil, como Passo Fundo, foi similar a dos países desenvolvidos, sendo 12/100.000 habitantes (Lisbôa *et al.*, 1998). Nos Estados Unidos da América, a incidência anual é de 15-16/100.000 habitantes. No Japão, os valores de incidência anual são de 1,4/100.000 habitantes. A mais alta incidência foi constatada na Finlândia, 36,5/100.000 habitantes. Populações da China e América do Sul (Venezuela e Peru) são os países com menor incidência segundo estudo do projeto DiaMond (Karvonen *et al.*, 2000; LaPorte *et al.*, 1990).

3.2. Diabetes experimental

Modelos animais têm sido adotados para a compreensão do diabetes. O aspecto mais vantajoso é que a síndrome no modelo animal aproxima-se ao fenótipo da doença humana. Para o estudo experimental do diabetes mellitus insulino-dependente experimental são usados o rato BB espontaneamente diabético (Chappel & Chappel, 1983), o camundongo NOD (Non-obese Diabetic) (Makino *et al.*, 1980), o modelo de baixas doses de streptozotocina em camundongos (Like & Rossini, 1976), modelos diabéticos induzidos por vírus (Craighead & McLance, 1968) e drogas químicas, tais

como o aloxano (Weisbren, 1948; Rerup & Tarding, 1969), que destrói seletivamente as células beta.

3.3.O Diabetes em camundongo NOD

O desenvolvimento do diabetes tipo 1 no camundongo NOD é precedido pela insulite que pode ser considerada como estado de pré-diabetes. A insulite é primeiramente notada em camundongos com 3-4 semanas de idade e potencialmente todas as fêmeas e machos NOD com três meses de idade apresentam insulite (Fujita *et al.*, 1982). As mudanças que ocorrem no modelo NOD também acontecem no homem, como a peri-insulite e progride para a infiltração das ilhotas e destruição das células beta (Gepts, 1987).

3.3.1.Descrição da linhagem

O diabetes é determinado geneticamente no camundongo NOD. A seleção do NOD teve o seu início em 1966, no Laboratório de Pesquisa Shionogi Aburahi, Japão, em camundongo com tendência à catarata e microftalmia, descendente da linhagem de camundongos heterogênicos Jcl-ICR, dando origem à linhagem CTS. A suspeita do diabetes tem sua explicação no fato de pacientes diabéticos frequentemente desenvolverem catarata. Duas linhagens irmãs foram obtidas por acasalamentos programados, sendo uma euglicêmica ou normal e outra levemente hiperglicêmica, após 13 gerações de acasalamento. O animal NOD foi obtido na 20ª geração na linhagem irmã euglicêmica, por ironia. Uma fêmea, apresentou poliúria, severa glicosúria e perda de peso. Esta linhagem foi estabelecida no Japão em 1974. Os acasalamentos continuaram com ninhadas selecionadas tanto para o diabetes espontâneo quanto pela capacidade reprodutiva, permitindo a obtenção, após a sexta geração, do camundongo NOD, que não é propenso à catarata. Também foi preservada a sub-linhagem não diabética, que serviu de controle, denominada NON (non-obese normal) (Makino *et al.*, 1980).

A linhagem NOD original, (NOD/Shi) em 1980, desenvolvia o diabetes em torno de 30 semanas de idade, acometendo 80% das fêmeas e 20% dos machos. O diabetes se manifestava entre 80 a 200 dias. Uma evidente diferença relacionada ao sexo foi observada porque as fêmeas expressavam a doença em torno de 10 semanas de idade, enquanto que em machos, a expressão era tardia, com aproximadamente 20 semanas de idade. Após 5 semanas de idade é alta a incidência da insulite, em ambos os sexos, atingindo 100% em torno de 30 semanas, mesmo sem o desenvolvimento do diabetes expresso (Kikutani & Makino, 1992), sendo portanto uma característica da linhagem NOD. Segundo Leiter *et al.* (1987), fêmeas NOD

expressam hiperglicemia mais cedo que os machos com pico entre a semana 16ª e 20ª semana e os machos entre 21ª e 28ª semana de idade .

Na patogênese da doença, esteróides sexuais das gônadas são importantes moduladores, pois machos castrados mostram incidência maior do diabetes, enquanto que fêmeas ooforectomizadas apresentam menor incidência, sugerindo que andrógenos tem efeito supressivo na expressão do diabetes (Makino *et al.*, 1981). A diferença na frequência do aparecimento do diabetes, em função do sexo, é uma característica própria do camundongo NOD , que não ocorre na espécie humana.

Encontram-se registradas 22 colônias de camundongos NOD no mundo, cada uma com prevalência e idade distintas na expressão do diabetes, segundo a manutenção dos animais e condições do ambiente . Em uma colônia típica com alta incidência de diabetes, 80-90% das fêmeas e 40-50% dos machos se tornam diabéticos entre 3 a 7 meses de idade, de acordo com o ambiente (Pozzilli *et al.*, 1993). Em uma colônia com incidência considerada média, entre as colônias existentes, a expressão do diabetes é de aproximadamente 80% para as fêmeas e 20% para os machos, ao redor de 30 semanas de idade (Leiter, 1993). A implantação da colônia NOD no CEMIB foi descrita por Pavin & Zollner (1994).

Conforme comunicação pessoal (dados do CEMIB), a colônia NOD/Uni em 2001 apresentou prevalência de 82% para as fêmeas e 20% para machos até 36 semanas de idade.

Além da infecção viral e temperatura (Todd, 1991; Bowman *et al.*, 1994) , a dieta também influencia na incidência do diabetes (Coleman *et al.*, 1990 ;Elliot *et al.*, 1988).

A ocorrência de outras patologias auto-imunes na linhagem NOD incluem a tireoidite e infiltração linfocitária na glândula sub-maxilar, esta última não ocorrendo no homem. O desenvolvimento de anemia hemolítica auto-imune, também é descrito em NOD (Baxter & Mandel, 1991).

3.3.2.Destruição da células beta das ilhotas de Langerhans

A indicação de que a síndrome diabética espontânea no NOD, é uma desordem auto-imune, vem de constatações de caráter imunológico humoral, celular e genético.

Quanto a imunidade humoral, observa-se em NOD a ocorrência de auto-anticorpos, denominados anticorpos anti-célula da ilhota (ICA) descritos em cerca de 50% dos NOD acima de 21 semanas de idade. Anticorpo anti - superfície da célula da ilhota (ICSA) aparece de 3 a 6 semanas com pico em 12 a 18 semanas de idade. Tanto ICA quanto ICSA, tendem a desaparecer ou diminuir com o tempo (Reddy *et al.*, 1988 e Pontesilli *et al.*, 1987). Outro tipo

de anticorpo relatado é o IAA, anticorpo anti-insulina, que aparece antes do desenvolvimento da doença (Maruyama *et al.*, 1988). Anticorpos anti-linfócitos, também aparecem precocemente, com 3 semanas de idade, decrescendo em seguida (Kanazawa *et al.*, 1984).

As células mais proeminentes na lesão insulítica do camundongo NOD são linfócitos T CD4+ e CD8+, linfócitos B, macrófagos e células dendríticas (Miller *et al.*, 1988 e Lo *et al.*, 1993). Macrófagos têm função primordial no início da progressão do diabetes, pois sua inativação quase completamente previne a insulite e o diabetes em camundongos NOD e em ratos BB (Yoon *et al.*, 1998).

As evidências de que a doença autoimune é mediada por células T vem do fato de que neonatos NOD timectomizados e NOD nude não desenvolvem o diabetes (Ogawa *et al.*, 1985; Makino *et al.*, 1986), significando que linfócitos T são recrutados para a patogênese do diabetes.

A sugestão de que o diabetes tipo 1 é uma doença mediada por células Th1 foi feita por Haskins & McDuffie (1990) e Healey *et al.* (1995) em experimentos de transferência usando recipientes neonatos, mostrando que a destruição das células beta é um resultado de reação de hipersensibilidade do tipo retardado mediada por Th1. Nestes experimentos, linfócitos Th1 induziram infiltrados destrutivos intra-ilhota, enquanto que linfócitos Th2 resultaram em infiltrado não patogênico peri-ilhota.

A eliminação de linfócitos TCD4+ pela administração *in vivo* de anticorpos monoclonais anti CD4+ pode suprimir tanto o diabetes quanto a insulite no camundongo NOD (Koike *et al.*, 1987 e Shizuru *et al.*, 1988).

Em 1997, Norchashm *et al.*, demonstraram que a depleção crônica de linfócitos B no camundongo NOD anula a infiltração destrutiva de células mononucleares nas ilhotas pancreáticas, também exercendo um efeito protetor na glândula salivar, confirmando a importância destas células no desencadeamento da insulite/diabetes.

A resposta autoimune contra as células beta é considerada uma desordem de imunoregulação, permitindo a destruição das células produtoras de insulina, levando ao diabetes tipo 1. Neste contexto, subpopulações de linfócitos T helper (Th1) e suas citocinas, isto é, interleucina 2 (IL-2), interferon gama (IFN-gamma) e fator beta de necrose tumoral (TNF beta), dominam regulando a subpopulação de células Th2 e suas citocinas: IL-4 e IL-10. Segundo Rabinovitch & Suarez-Pinzon, (1998) é consenso de que células T autoreativas e suas citocinas não são suficientemente reguladas pelas subpopulações de células Th2. Assim, citocinas do tipo 1 iniciam o processo cascata imune/inflamatório na ilhota resultando na insulite e destruição das células beta. As células T citotóxicas são ativadas, interagindo

especificamente com as células beta e os macrófagos produzem citocinas pró-inflamatórias (IL-1 e TNF alfa) e radicais de oxigênio e nitrogênio livres que são altamente citotóxicos para as células beta, contribuindo para a destruição celular via formação de peroxinitritos e óxido nítrico (Suarez-Pinzon *et al.*, 1997). Segundo esta teoria, a prevenção da destruição da ilhota seria via estimulação da produção e /ou ação de citocinas Th2, inibindo a produção e/ou ação de citocinas Th1 e inibindo a produção e/ou ação dos radicais livres de oxigênio e nitrogênio.

Estudos em ratos mostraram que as células consideradas Th2 podem ativamente proteger da doença (Fowell & Mason, 1993). Estas observações indicariam que linfócitos CD4⁺ podem controlar o balanço entre auto-imunidade e tolerância, onde células Th1 CD4⁺ são patogênicas e linfócitos Th2 CD4⁺ de fenótipo oposto, são protetoras. Esta hipótese ainda é aceita atualmente. Entretanto, alguns autores sugerem a participação de mediadores das células Th2 na destruição pancreática das células beta, em particular pela IL-10 (Lee *et al.*, 1996; Almawi *et al.*, 1999; Pakala *et al.*, 1997).

Estudos clínicos evidenciam que há um desequilíbrio persistente e independente nos padrões de secreção de citocinas, ambos de Th1 e Th2 (Rapoport *et al.*, 1998).

A destruição das células beta ocorre, ao menos parcialmente, via apoptose (Iwahashi *et al.*, 1998). A morte celular programada, é caracterizada por contração das organelas e da célula, condensação nuclear, mudanças na membrana, eventualmente permitindo a fagocitose, fragmentação da cromatina, perda das junções celulares e perda da capacidade da membrana de manter gradientes osmóticos, entre outras alterações (Maurício & Mandrup-Poulsen, 1998).

Modelos animais criados a partir do NOD têm sido adotados, para obter uma destruição acelerada das células beta para facilitar a detecção da apoptose da célula beta *in situ* (Augstein *et al.*, 1998; O'Brien *et al.*, 1997). A correlação entre o grau de insulite e apoptose da célula beta foi demonstrada por Kurrer *et al.*, 1997, estudando a cinética da apoptose em camundongos transgênicos, estando a apoptose limitada às ilhotas com insulite. O tempo de "clearance" das células beta variou de menos de 6 minutos a 1,7 minutos, indicando que a frequência da apoptose é levemente superior ao grau de extinção, o que determina a dificuldade de surpreender a célula apoptótica no estudo histológico. A própria formação de NO parece ser um importante sinal para a apoptose das células beta (Messmer *et al.*, 1994).

O desenvolvimento do diabetes autoimune humano e no camundongo NOD está sob controle de múltiplos genes Idd (insulin-

dependent diabetes). Sendo uma doença poligênica, os múltiplos loci influenciando a susceptibilidade da doença têm sido mapeados no genoma do camundongo, determinando o diabetes do tipo 1 ou insulite (Wicker *et al.*, 1995). Atualmente, pelo menos 20 genes estão envolvidos no diabetes tipo 1 (Adorini *et al.*, 2002).

3.4. Esquistossomose mansônica

3.4.1. A Doença

O parasita *Schistosoma mansoni*, SAMBON, 1907, produz a esquistossomose mansônica, uma doença parasitária crônica e debilitante.

Os vermes adultos habitam principalmente as veias mesentéricas inferiores. A maturação dos vermes ocorre no ramo intra-hepáticos do sistema porta. Machos e fêmeas acasalados produzem centenas de ovos por dia, de 300 a 400, dependendo da idade da fêmea (Gönnert, 1955.)

O evento principal que caracteriza a esquistossomose como doença é a presença dos ovos que são depositados no sistema porta-hepático e retidos principalmente no fígado e intestino do hospedeiro. É ampla a distribuição das lesões na esquistossomose mansônica e múltiplos órgãos podem ser acometidos, tais como intestino, pulmão, pâncreas e, mais raramente, testículo, ovário e rim. No homem predomina a esquistossomose intestinal, com um quadro sintomatológico de dores abdominais, diarreia, melena, constipação e sintomas dispépticos gerais como plenitude gástrica, anorexia e azia. Na forma hepato-esplênica, a esquistossomose se desenvolve insidiosamente devido a injúria fibrótica acumulativa, levando à fibrose hepática, com ocorrência de esplenomegalia e hepatomegalia, acompanhadas de dores abdominais, astenia, sensação de "tumor" intra-abdominal e em menor proporção, acidentes hemorrágicos digestivos. Sintomas adicionais são palidez, febre baixa e varizes peri-umbilicais colaterais (Raia *et al.*, 1985). A falência do fígado está ausente até acontecer uma associação viral ou hepatite alcoólica (Conceição *et al.*, 1998). A causa da morbidade e mortalidade é a fibrose hepática e a formação de varizes hemorrágicas. Na esquistossomose hepato-esplênica pode ocorrer descompensação hepática, com hipertensão portal e a ascite abdominal é importante seqüela devido ao engrossamento das veias do fígado e fibrose periportal (Boros, 1989).

3.4.2. Granulomas e resposta imune

O *S. mansoni* requer aproximadamente seis semanas para desenvolvimento dos vermes adultos e início da produção dos ovos.

O antígeno é secretado através dos poros ultramicroscópicos da casca dos ovos (Race *et al.*, 1969; Stenger *et al.*, 1967). Depois da indução pelo SEA (antígeno solúvel do ovo) da imunidade mediada por células, (Boros & Warren, 1970) a fase aguda da doença ocorre de 8 a 10 semanas e é caracterizada pela formação do granuloma (Boros, 1989; Phillips & Lammie, 1986). Nesta fase ocorre o pico da resposta celular. Em torno de 8 semanas há o desenvolvimento da hepato-esplenomegalia, acompanhada de aumento no número de ovos em até cinco vezes. Paralelamente, em oito semanas, a pressão portal aumenta em cerca de 50% do nível pré-infecção. Em 1972, Bloch *et al.*, evidenciaram, em estudos de microcirculação com animais vivos, a ocorrência de uma dramática alteração no fluxo de sangue quando os granulomas se formam. De 16 a 20 semanas começa a fase crônica da doença e a intensidade da resposta inflamatória aos ovos é modulada pelas subpopulações de células T supressoras e seus fatores solúveis (Boros *et al.*, 1975; Colley, 1975; Colley *et al.*, 1979; Chensue *et al.*, 1981; Doughty & Phillips, 1982; Abe & Colley, 1984; Perrin & Phillips, 1988; Ragheb & Boros, 1989; Fidel & Boros, 1991).

No camundongo imunocompetente, a lesão granulomatosa é circunscrita ao ovo, consistindo predominantemente de eosinófilos, além de macrófagos, linfócitos, células epitelióides e raras células gigantes (Hsu *et al.*, 1976; Stenger *et al.*, 1967).

Os mecanismos que controlam este processo inflamatório crônico, têm sido largamente estudados. A formação do granuloma é uma resposta imune mediada principalmente por células e foi descrita como uma reação de hipersensibilidade do tipo retardado (DTH). O conceito da resposta imunológica mediada por células é baseado na demonstração de que na exposição secundária aos ovos do *S. mansoni* há uma resposta inflamatória anamnésica, com ausência de anticorpos detectáveis, que é específica e passível de ser transferida por células de linfonodos ou de baço, mas não pelo soro (Warren *et al.*, 1967; Boros & Warren *et al.*, 1970).

A formação do granuloma é um processo dinâmico, cuja regulação está diretamente relacionada com a reatividade de células T ao antígeno solúvel do ovo (SEA). Assim, o pico da formação do granuloma e a resposta das células T ocorrem durante a fase inicial e aguda da infecção. Ambas as respostas declinam quando a infecção evolui para a fase crônica, por ocasião da supressão da formação do granuloma (James & Sher, 1990).

Evidências de que o granuloma é uma resposta imunológica mediada por células foi estudada através da timectomia neonatal (Domingo & Warren, 1967), Soro anti-linfócito (Domingo & Warren, 1968), Doença de Hodgkins (Warren, 1969), toxina do cólera (Warren *et al.*, 1974), com o uso

de Niridazole (Mahmoud *et al.*, 1975b), Diabetes (Mahmoud *et al.*, 1976) e camundongos nude (Phillips *et al.*, 1977).

Atualmente, a hipótese de que a formação do granuloma é mediada por linfócitos T responsáveis pela hipersensibilidade do tipo retardado deve ser re-examinada à luz das evidências da heterogeneidade funcional entre os linfócitos T que controlam a resistência à infecção. Mosmann *et al.* (1986) e Mosmann & Coffman (1989) estabeleceram que os linfócitos T podem ser divididos em sub-populações funcionais, caracterizadas pelo perfil de citocinas produzidas. Assim, a população de linfócitos Th1, responsável pela resposta imune celular, apresentam secreção de citocinas como Interleucina 2 (IL-2), INF- γ e TNF α e β . As células Th2 envolvidas na resposta imune humoral com estimulação de anticorpos, incluem a hipersensibilidade imediata e a eosinofilia, característica da infecção por helmintos, secretam citocinas como a Interleucina 4 (IL-4), Interleucina 5 (IL-5), Interleucina 6 (IL-6) e Interleucina 10 (IL-10). A intensidade da resposta granulomatosa é dependente de citocinas produzidas pelos linfócitos T em resposta ao antígeno solúvel do ovo (SEA). Inúmeros estudos sobre a imunoregulação da resposta à infecção têm mostrado que a produção de citocinas Th2 está associada à formação do granuloma (Luckacs & Boros, 1993).

Grzych *et al.* (1991) caracterizaram as populações de linfócitos envolvidas na esquistossomose murina em infecções unisexuais. A resposta Th1 ocorreu apenas durante as primeiras seis semanas de infecção. A oviposição é o maior estímulo para a resposta Th2 na esquistossomose.

Pearce *et al.* (1991) avaliaram a produção de citocinas Th1 e resposta Th2 pelo *S. mansoni*. A resposta Th2 em animais infectados foi induzida por antígenos de ovos, enquanto que a reatividade Th1 foi desencadeada principalmente por antígenos de larvas (esquistossômulos).

Amiri *et al.* (1992) demonstraram a importância da produção de citocinas na formação do granuloma, em estudos com camundongo SCID, sem linfócitos T ou B funcionais, porém com macrófagos funcionais e falharam em montar qualquer resposta inflamatória. Injeções de cultura de sobrenadantes de clones de células Th2 ativadas, resultaram na formação de granuloma. O componente ativo da cultura de sobrenadante foi o fator alfa de necrose tumoral (TNF- α), produzido por todas as células Th. Esta única citocina foi suficiente para orquestrar a formação do granuloma. Assim, o granuloma formado ao redor do ovo é uma resposta celular genérica das células Th, como provam os estudos com clones Th1 (Chikunguwo *et al.*, 1991) e por clones Th2.

Falcão *et al.* (1998) sugere que a IL-10 pode ser uma importante citocina no controle da morbidade severa causada pela infecção do *S. mansoni*

e que regula *in vitro* a formação do granuloma.

Chikunguwo *et al.* (1991) mostraram que células Th1 clonadas do SEA são capazes de mediar reações do tipo DTH tanto quanto a formação do granuloma *in vivo*, assim como foi demonstrado em 1992 por Amiri *et al.*, a mesma propriedade das células Th2.

3.4.3. Doenças concomitantes à esquistossomose

A resposta do tipo Th2 pode ser direcionada tanto ao antígeno ovo-específico quanto aos antígenos não-*Schistosoma*, com possíveis interações em caso de infecções múltiplas (Kullberg *et al.*, 1992).

A habilidade de uma infecção concomitante à esquistossomose em alterar a evolução de uma doença foi documentada por Curry *et al.* (1995) em modelo murino coinfestado com *Trichuris muris*, protegendo-o contra uma segunda infecção, o que foi atribuído a uma resposta associada à indução de Th2.

O resultado da produção de citocinas Th2 associadas à esquistossomose influencia o resultado de uma infecção concorrente, como sugerido pelo atraso na eliminação do vírus vaccínia dos órgãos afetados, no modelo murino (Actor *et al.*, 1993) com a localização dos epitopos virais localizados principalmente no interior dos granulomas (Actor *et al.*, 1994).

Ghaffar *et al.* (1990), obtiveram respostas alteradas de anticorpo, com títulos significativamente menores em crianças com esquistossomose, depois da vacinação contra o vírus da hepatite B.

3.4.4. O Pâncreas na Esquistossomose

O comprometimento pancreático na esquistossomose humana ocorre em 11,2% (Lima, 1966) até 47,8% (Ladosky, 1958), com ou sem reação fibrótica. Os granulomas presentes no pâncreas, segundo Bogliolo (1964), raramente atingem as ilhotas de Langerhans. Saleh *et al.* (1967) verificaram que em casos de envolvimento do pâncreas pela esquistossomose, o tecido peri-ductal é primordialmente afetado, seguido pelo parênquima. Raramente o tecido da ilhota fica comprometido.

Resultados de autópsias, por Cheever & Andrade (1967) mostraram a ocorrência de ovos no pâncreas em 4% dos casos assintomáticos e 6% nos casos de fibrose de Symmers. O pâncreas mostrou fibrose e atrofia glandular e ocasionalmente cicatrização, com atrofia das ilhotas. O peso do pâncreas chegava a triplicar, comprometendo a cabeça do pâncreas, em todos os casos estudados, enquanto que 65% dos casos afetava o corpo do pâncreas e a cauda do pâncreas em 17%, (Arafa & Hashem, 1952; Saleh *et al.*, 1967)

A patogenia dos granulomas peri-ovulares no pâncreas é

especulativa. Sendo o fluxo venoso pancreático drenado para o sistema porta, existe a possibilidade de migração do verme adulto para os ramos venosos pancreáticos e postura dos ovos neste órgão. Distúrbios funcionais endócrinos do pâncreas na esquistossomose humana são citados por Pereira & Barreto Netto (1952).

Bibawi (1970) no Egito, em estudos de tolerância ao carboidrato, considerou que infecções por *S. mansoni* podem afetar o pâncreas endócrino e aumentar ligeiramente o estado pré-diabético. O autor relatou que vermes acasalados podem passar de vasos mesentéricos e veias esplênicas para os finos capilares das veias pancreáticas e os ovos depositados nestas vênulas induzem a lesão pancreática.

Mott *et al.* (1971) demonstraram alterações funcionais provocadas pelo comprometimento da porção exócrina. Em 1972, Mott *et al.*, relataram as mudanças histopatológicas no pâncreas exócrino em 20 pacientes com a forma hepatoesplênica da esquistossomose mansônica com hipertensão portal: granulomas, fibrose intersticial, desarranjo do tecido acinar, atrofia acinar, distorção e dilatação dos dutos excretórios, edema intersticial, infiltrado inflamatório e infiltração de gordura em pacientes idosos e obesos, sendo que os testes da função pancreática também se mostraram alterados na esquistossomose.

O acometimento do pâncreas em camundongos infectados pelo *S. mansoni* foi evidenciado observando comprometimento de ilhotas e ácinos associado a carcinoma pancreático de ducto na fase crônica da infecção (Zanotti *et al.*, 1982a ; Zanotti & Magalhães, 1983).

Lenzi *et al.* (1989) reportaram freqüente envolvimento do pâncreas na esquistossomose murina, a partir de 50 dias da infecção, variando desde o pâncreas aparentemente normal, até a pancreatite severa entre 90 e 100 dias após a infecção. Trata-se, portanto, de um modelo para o estudo da pancreatite induzida pela infecção esquistossomótica. O infiltrado inflamatório no decorrer da infecção no pâncreas mostrou ser rico em eosinófilos, neutrófilos, macrófagos, linfócitos, células plasmáticas e mastócitos. A produção de granulomas exsudativos-produtivos, predominou em todas as fases da infecção com 70 cercárias, sendo que a pancreatite foi observada somente de 90 a 100 dias após a infecção. A patogênese no pâncreas parece depender principalmente da obstrução das vênulas lobulares pancreáticas pelos ovos, e consequente reação granulomatosa.

O aparecimento de ovos no pâncreas coincide com o aumento progressivo no diâmetro dos vasos intra e extra-hepáticos, facilitando assim a migração dos ovos (McHugh *et al.*, 1987).

3.4.5. Esquistossomose e diabetes

Camundongos induzidos quimicamente ao diabetes pelo aloxano e infectados pelo *S. mansoni* foram estudados por Robinson (1959). O autor mostrou uma recuperação menor de vermes, de ambos os sexos, em camundongos aloxanizados, causando severa hiperglicemia em relação aos controles.

Estudos realizados por Mahmoud *et al.* (1975a) em camundongos Swiss, induzidos quimicamente ao diabetes mellitus por injeções intravenosas de streptozotocina, evidenciaram penetração similar de cercária, nos diabéticos e controles, bem como na maturação e oviposição dos vermes adultos. Foi observado, durante a fase aguda da infecção, após 8 semanas, acentuada supressão da resposta granulomatosa mediada por células aos ovos do parasita retidos no fígado do animal infectado com *S. mansoni*. Entretanto nesta ocasião, não houve diferenças em relação aos controles quanto ao comprimento dos vermes machos e fêmeos. O volume do granuloma de camundongos diabéticos foi um quarto em relação aos controles normais, sendo a fibrose também menos acentuada nos animais diabéticos.

Estudos posteriores de Mahmoud *et al.* (1976) verificaram a redução nas áreas de inflamação ao redor dos ovos de *S. mansoni*, nos pulmões, tanto em camundongos tratados pelo aloxano, quanto pela streptozotocina, induzindo o diabetes mellitus, quanto camundongos geneticamente predispostos ao diabetes como os db/db. O tratamento com insulina, nos animais severamente diabéticos e infectados promoveu o retorno ao normal da resposta granulomatosa revertendo a supressão ou inibição da formação do granuloma em ambos animais diabéticos induzidos por aloxano e streptozocina. Este achado sugere que a deficiência na resposta mediada por células pode ter uma base metabólica reversível. Este autor associou o grau de diabetes ou hiperglicemia, com maior ou menor redução no tamanho do granuloma do pulmão. Moderada hiperglicemia, medida em concentração de glicose no sangue (ao redor de 160 mg/dL) foi associada com 20% de redução no tamanho do granuloma e um valor de glicose no sangue de 225 mg/dL ou superior, severamente hiperglicêmicos, resultou na significativa diminuição da inflamação em 68% dos animais tratados com streptozotocina, em relação aos controles heterozigotos Swiss. Nos animais tratados com aloxano, a supressão do granuloma foi altamente significativa. Nos animais geneticamente diabéticos (db/db), a área do granuloma foi 77% menor que nos controles (db/+). Os resultados destes dois experimentos de Mahmoud estão de acordo com o tamanho das lesões acentuadamente suprimidas nos animais tratados com drogas imunossupressoras, observadas por Domingo *et al.* (1967).

Magalhães *et al.* (1978), estudando o efeito do diabetes induzido pelo aloxano em camundongos Swiss infectados com *S. mansoni* demonstraram a diminuição no número de granulomas hepáticos, observando um elevado número de esquistossomos não desenvolvidos ou atrofiados.

Mahmoud (1979), constatou um desequilíbrio na imunidade mediada por células, demonstrado pelo decréscimo nas consequências patológicas em camundongos diabéticos db/db, provocado pela supressão granulomatosa, e que pode ser comparada a resposta modulada em animais com esquistossomose crônica. O autor verificou menor diâmetro do granuloma em diabéticos homozigóticos db/db, em relação aos heterozigotos(db/+), não havendo estatisticamente, diferença significativa nos pesos dos fígados dos animais diabéticos após 8 semanas da infecção. Os camundongos geneticamente predispostos ao diabetes tiveram o granuloma no fígado significativamente reduzido ($P < 0,001$), mostrando, ao exame histológico, menor infiltração eosinofílica. O estudo da esquistossomose em hospedeiro imunossuprimido foi associado com a menor patologia, quase um terço do tamanho dos granulomas em relação aos seus controles, e efeito obstrutivo do fluxo portal muito menor, não desenvolvendo hipertensão portal ou varizes esofagianas. A composição celular qualitativamente, foi similar à composição dos controles, no entanto, eosinófilos apareceram menos freqüentemente. A incapacidade do camundongo db/db em produzir a estimulação de eosinófilos, pode explicar o decréscimo de eosinófilos nos granulomas. A diminuição do tamanho dos granulomas provocada por depleção de eosinófilos pelo uso de soro anti-eosinófilos foi demonstrada por Mahmoud *et al.* (1975c).

A esquistossomose mansônica como doença crônica do fígado no homem, tem associação com vários distúrbios de metabolismo de carboidratos, investigado por vários autores. Sukkar *et al.* (1974), testando a função do fígado em pacientes esquistossomóticos, sem diabetes, revelou vários graus de diminuição da função hepática, dependendo da severidade e do envolvimento do mesmo. O teste intravenoso de tolerância a glicose mostrou graus baixos de "clearance" da glicose em todos os pacientes, confirmando resultados de Ghanem *et al.* (1971) que acharam intolerância a glicose intravenosa especialmente em pacientes com esquistossomose hepática com casos avançados de ascite e resposta diabética, demonstrando um desequilíbrio na utilização da glicose na esquistossomose hepática. Estes achados foram interpretados como quantidade diminuída de insulina disponível no pâncreas, decréscimo na sua liberação, a presença de resistência endógena à insulina e a possibilidade de um desequilíbrio na retenção da

glicose pelo fígado. Apesar das alterações no metabolismo de carboidratos serem demonstradas, o diabetes, como doença manifesta é extremamente raro.

A associação entre diabetes e esquistossomose tem poucos relatos clínicos, mesmo em regiões onde é endêmica. Alguns achados de autópsias (Saleh *et al.*, 1967) não mostraram lesões pancreáticas em 04 pacientes sofrendo de diabetes e esquistossomose hepatoesplênica. A tolerância intravenosa à glicose, testes de sensibilidade à insulina, tolerância intravenosa à glicodiazina para o diagnóstico do diabetes e testes de glucagon intravenosos realizados em pacientes com esquistossomose e cirrose hepática, evidenciaram que o grau de “clearance” foi significativamente menor nos casos de esquistossomose hepática, especialmente nos casos avançados, com ascite. Os achados demonstram o desequilíbrio na utilização de glicose na esquistossomose hepática.

Soliman *et al.* (1996) investigou a prevalência de anticorpos anti-célula da ilhota (ICA), direcionados contra antígenos citoplasmáticos, como indicador da destruição da célula da ilhota, em crianças com esquistossomose, em crianças diabéticas e em crianças não diabéticas mas gêmeas de diabéticas. Os testes indicaram que a liberação inicial de insulina após injeção intravenosa de excesso de glicose, ou teste de tolerância à glicose, foi significativamente menor em crianças com esquistossomose quando comparadas aos diabéticos e não diabéticos. A prevalência de ICA foi de 50% em crianças com IDDM (diabetes tipo 1), 25% em crianças com esquistossomose e 13% no grupo de gêmeos de diabéticos. A alta prevalência de ICA nas crianças esquistossomóticas, contribuiu na patogênese da doença pancreática destes pacientes, e poderia significar um risco, a longo prazo, para o desenvolvimento da intolerância à glicose e diabetes.

O avanço tecnológico na área da Ciência em Animais de laboratório disponibiliza modelos animais interessantes para a pesquisa biomédica. Neste estudo há interesse na associação da esquistossomose mansônica ao diabetes mellitus adotando o camundongo da linhagem NOD (non-obese diabetic) para o estudo da evolução gradativa e concomitante das duas doenças.

4.MATERIAL E MÉTODOS

4.1.Moluscos

Foram utilizados exemplares de *Biomphalaria glabrata*, albina, descendentes de uma população coletada em Belo Horizonte (MG), mantida há mais de 30 anos no Departamento de Parasitologia do Instituto de Biologia da Unicamp.

Os moluscos foram alimentados com alface fresca e mantidos em aquários de vidro, com água decolorada em ambiente sob temperatura controlada de 25°C.

4.2.*Schistosoma mansoni*

Foi adotada a linhagem BH de *S. mansoni*, proveniente de Belo Horizonte, mantida em camundongos heterogenéticos da linhagem Swiss/Uni, categoria SPF (Specific Pathogen Free), no Departamento de Parasitologia da Unicamp.

Para a manutenção da linhagem de *S. mansoni* em camundongos fêmeos com 30 dias de idade, foi realizada a infecção individual pela cauda dos animais, com uma suspensão contendo 100 cercárias, mediante exposição dos camundongos à luz e calor por duas horas, conforme a técnica de Magalhães (1969).

4.3.Infecção do molusco *Biomphalaria glabrata*

Moluscos selecionados com diâmetro de 5 a 8 mm foram expostos individualmente a 10 miracídios, obtidos de fezes recém eliminadas de camundongos infectados com cercárias da linhagem BH. As fezes, diluídas em água decolorada, foram filtradas em gaze e deixadas em repouso em cálice de sedimentação na geladeira por 2 horas. Após a retirada do sobrenadante e lavagem do sedimento, o mesmo foi depositado em uma placa de petri e exposto à luz e calor. A infecção dos moluscos obedeceu a técnica preconizada por Standen (1951).

Decorridos 30 dias da exposição aos miracídios, os planorbídeos foram avaliados semanalmente para verificação da eliminação de cercárias, mediante exposição dos moluscos à luz de lâmpada incandescente durante duas horas.

4.4.Camundongos NOD/Uni

Para os grupos experimentais foi adotada a linhagem NOD/Uni, de camundongos diabéticos, proveniente da colônia de fundação mantida no CEMIB em isoladores em PVC flexível com pressão positiva. Esta colônia

foi importada do Hospital Necker de Paris (França) em 1994. A manifestação do diabetes é acompanhada até 36 semanas de idade. O aparecimento do diabetes nas fêmeas ocorre entre a 11^a e 29^a semana, enquanto que nos machos manifesta-se entre 13^a e 30^a semana de idade.

A idade dos animais foi variável, em função da expressão do diabetes e da disponibilidade de fornecimento pelo Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica (CEMIB).

4.5.Determinação da glicosúria

Os camundongos NOD foram monitorados nas câmaras de criação semanalmente após a 11^a semana de idade, e no momento do sacrifício, para a determinação da glicosúria. O método colorimétrico e semi-quantitativo utilizado foi baseado na leitura visual de fitas Self-Stik (Chungdo Pharm. Co., Ltd. - Korea). A escolha da presente metodologia para a monitoração da glicosúria é a mesma adotada na colônia, não gerando stress nos animais por não ser invasiva.

O resultado do teste, específico para a glicose, é obtido após 30 a 60 segundos do contato da fita com a urina recém-coletada. A glicosúria é expressa em concentrações, de 100, 250, 500, 1000 e 2000 mg glicose/dL urina. A coloração azul da fita, após o contato com a urina recém colhida, indica resultado negativo, ou seja, abaixo de 100 mg glicose/dL urina. As colorações sucessivas, com o aumento da quantidade de glicose na urina, variam do azul ao verde claro e verde amarronzado e do marrom ao marrom escuro e são comparadas com a escala cromática que representa diferentes variações de concentrações, impressas no rótulo.

Foi determinada também na colônia de fundação, a glicosúria de fêmeas diabéticas durante a prenhez.

Os resultados da glicosúria determinaram as seguintes categorias do diabetes:

diabetes inicial	±	100 mg glicose/dL urina
diabetes leve	+	250 mg glicose/dL urina
diabetes moderada	++	500 mg glicose/dL urina
diabetes severa	+++	≥ 1000 mg glicose/dL urina
diabetes grave	++++	2000 mg glicose/dL urina

4.6. Grupos Experimentais

Composição: Foram constituídos 10 grupos de camundongos NOD, totalizando 274 animais, conforme as categorias abaixo:

GRUPO	COMPOSIÇÃO	Nº animais	Idade média (semanas)*
MNDNI	Machos Não Diabéticos Não Infectados	05	16,0
MNDI	Machos Não Diabéticos Infectados	66	17,0
FNDNI	Fêmeas Não Diabéticas Não Infectadas	05	15,0
FNDI	Fêmeas Não Diabéticas Infectadas	41	15,0
MDNI	Machos Diabéticos Não Infectados	24	23,2
MDI	Machos Diabéticos Infectados	10	26,0
FDNI	Fêmeas Diabéticas Não Infectadas	57	17,7
FDI	Fêmeas Diabéticas Infectadas	52	21,0
FDPNI	Fêmeas Diabéticas Prenhes Não Infectadas	10	19,0
FDPI	Fêmeas Diabéticas Prenhes Infectadas	04	22,6

* ao final do experimento

Abreviaturas : M - Macho; F – Fêmea; D- Diabético; N - Não; P- Prenhe; I - Infectado

4.7. Manutenção dos animais em isoladores

Os camundongos NOD/Uni, pertencentes aos grupos de infectados, foram mantidos em unidades isoladoras de plástico flexível (LNF- Ind. & Com. Ltda.), com pressão positiva e com 16 a 18 trocas de ar por hora. A unidade isoladora foi dotada de filtro absoluto com eficiência de 99,99% na retenção de partículas de 0,3 micron. A manutenção dos animais sob experimentação em unidades isoladoras teve o intuito de manter um ambiente livre de contaminação e assegurar o padrão sanitário SPF dos animais sob experimentação..

O material necessário para a manutenção dos animais como gaiolas, tampas, ração, água, maravalha, bebedouros, pinças, foi devidamente submetido a processos de esterilização em autoclave, conforme normas de

procedimentos adotados pelo CEMIB. A troca das gaiolas, reposição hídrica e de ração foi realizada em média, 2 vezes por semana nos animais não diabéticos, e com maior frequência, em animais diabéticos.

A entrada de materiais no isolador foi sempre precedida pela nebulização, sob pressão, com ácido peracético diluído 1:3, no porto de passagem, submetendo o material à esta atmosfera durante 30 a 40 minutos. Da mesma forma, após a retirada de qualquer insumo ou animal do interior do isolador, era feita a desinfecção do porto de passagem. O isolador foi preparado para o recebimento dos animais, sincronizando o final da desinfecção com a chegada dos animais na sala de isoladores.

O transporte dos animais retirados do CEMIB foi realizado embalando-se cada gaiola com saco plástico autoclavável. O tempo máximo de permanência dos animais durante o transporte foi de 1 hora.

Os animais recém-chegados eram alojados no porto de passagem dentro das respectivas gaiolas embaladas em saco plástico autoclavável, previamente borrifadas com uma mistura de Amônio Quaternário, 0,5% e álcool 70%. Os animais ingressaram com as respectivas gaiolas, ração e bebedouros no interior do isolador. Após aproximadamente 10 minutos da exposição ao vapor de ácido peracético, as gaiolas foram alojadas no corpo do isolador. Para a remoção rápida do vapor de ácido peracético do interior do isolador, era necessário aumentar a velocidade do ar mediante o controle manual das válvulas de entrada e saída do ar do isolador. Os sacos plásticos eram então removidos pelo porto de passagem.

Animais destinados à infecção pelo *S. mansoni*, foram retirados do isolador durante o tempo de infecção, por aproximadamente 2 horas.

Animais não infectados não foram mantidos em isolador pois foram sacrificados logo após a sua chegada ou no dia seguinte. Estes animais foram alojados na sala do isolador.

4.8. Infecção de camundongos NOD/Uni

Os camundongos machos ou fêmeos, diabéticos ou não, foram infectados individualmente com 10, 25 ou 50 cercárias, pela cauda, segundo o método de Magalhães (1969). A mortalidade foi monitorada e os animais submetidos à necrópsia, ao final da sétima semana de infecção.

4.9. Sobrevida dos camundongos

Foi avaliada a sobrevida dos animais de todos os grupos. Este parâmetro compreende o tempo decorrido entre a data da constatação da glicosúria positiva, até a morte natural, para os camundongos não infectados.

Em se tratando de camundongos infectados, a sobrevida compreende o período entre a data da infecção até o sacrifício ao final de 7 semanas ou a morte natural antes deste tempo, independente do estado diabético na data da infecção.

O percentual de sobrevida refere-se ao índice de animais sobreviventes até o final da sétima semana da infecção pelo *S. mansoni* ou após a constatação da glicosúria positiva para os camundongos não infectados. Considerou-se o número total de fêmeas e machos diabéticos infectados e não infectados para o cálculo de sobrevida em períodos críticos de ocorrência de morte.

4.10.Perfusão dos camundongos infectados

No momento do sacrifício, determinou-se a glicosúria, assim como o peso corporal de cada animal. Os animais foram anestesiados com éter imediatamente antes da eutanásia por deslocamento cervical, para a extração e coleta de órgãos. O éter foi necessário porque no momento do sacrifício, propicia a migração dos vermes das veias mesentéricas para a veia porta, permitindo 100% da recuperação dos vermes.

Na sétima semana de infecção, a perfusão do sistema porta-hepático com solução de NaCl 0,15 M foi feita segundo a técnica de Yolles *et al.* (1947). Os vermes adultos de *S. mansoni* foram coletados no sistema porta e vasos mesentéricos, e observada a presença ou não de granulomas. Foram extraídos o fígado e o pâncreas para pesagem. Fragmentos destes órgãos foram imediatamente fixados em solução de Bouin aquoso ou formol 10% para processamento histopatológico.

Os vermes foram fixados em Railliet-Henry para montagem em lâminas de microscopia, com glicerina-Jelly.

4.11.Preparações histológicas

O material fixado em Bouin aquoso foi submetido à lavagem exaustiva com água corrente e devidamente desidratado para inclusão em parafina. Os cortes histológicos com 5 micra de espessura foram obtidos, em micrótomo rotativo Histocut da Reichert-Jung.

Para cortes histológicos do fígado e pâncreas de animais infectados, foram aproveitados cortes com intervalo mínimo de 250 micra. As preparações foram coradas pela Hematoxilina-eosina, montadas em Bálsamo do Canadá e observadas em microscópio óptico comum. O processo de coloração e montagem das lâminas foi executado em capela de exaustão.

4.12.Determinação do comprimento dos vermes

A determinação do comprimento dos vermes foi realizada com

auxílio de um curvímeter, sob projeção em Visopan da Reichert, tomando-se lâmina micrométrica como padrão. Foram tomadas 3 medidas de cada verme, considerando a média aritmética como medida final de cada verme. O resultado foi expresso em milímetros.

4.13.Fotografias

As lâminas coradas foram examinadas sob microscopia comum e fotografadas em Microscópio Zeiss AXIOPLAN, acoplado ao microcomputador com software AXIOPHOTO 2. Os filmes usados foram KODAK Gold 100 e Ektachrome.

4.14.Monitoramento Sanitário dos animais

A colônia de animais NOD/Uni foi monitorada sob o ponto de vista parasitológico, virológico e bacteriológico durante todo o tempo do experimento, por intermédio do exame de amostras randômicas dos animais da criação, a cada 2 meses, junto a Seção de Controle de Qualidade Sanitária do CEMIB/UNICAMP. (Gilioli *et al.*, 1996; Gilioli *et al.*, 2000)

A lista de patógenos investigada para camundongos foi a mesma adotada pelo CEMIB, com os respectivos métodos de diagnóstico, para assegurar a manutenção da condição sanitária livre de patógenos específicos, na categoria de camundongos livres de anticorpos para vírus (VAF).

4.15.Medidas de granulomas hepáticos

A histometria dos granulomas foi realizada adotando uma lâmina micrométrica como padrão de medida em mm. Foram determinadas as medidas de dois diâmetros em ângulo reto, perpendiculares ao centro do granuloma contendo um único ovo (Boros & Warren, 1970) em animais com 7 semanas de infecção.

As medidas foram realizadas em câmara clara, utilizando-se microscópio Zeiss acoplado à câmara clara e microcomputador, com programa concebido para este fim pelo Instituto de Matemática, Estatística e Ciências da Computação da Unicamp.

O resultado expresso em mm foi convertido em micras, utilizando-se o fator obtido da lâmina micrométrica padrão da Zeiss. Os dados foram tabulados em planilhas Excel 97 para análise estatística da área de granulomas no programa Stat 5,0.

Para a determinação da área de granuloma tomou-se a área da elipse como padrão ($A = \pi \times \text{largura} \times \text{comprimento}$), sendo os resultados expressos em $1 \times 10^5 \mu\text{m}^2$.

4.16. Análise estatística

Os resultados experimentais obtidos das medidas de comprimento dos vermes e tamanho dos granulomas foram submetidos à análise de variância para avaliar os efeitos do nível de glicosúria e comparar os diversos grupos experimentais. As análises complementares com teste de Tukey foram aplicadas para comparações pareadas das médias, entre os grupos, a fim de se verificar quais grupos diferiram entre si. O teste de Tukey, sendo um teste de comparações múltiplas, associado à análise de variância, permitiu a determinação do valor da diferença mínima entre as variáveis, que era estatisticamente significativo. O nível de significância utilizado nos testes foi de 5%. O programa adotado foi STATISTICA, versão 5.0 (Montgomery, 1984).

5.RESULTADOS

5.1.Prevalência do diabetes em camundongos NOD/Uni

A prevalência do diabetes nas três famílias da colônia de fundação de camundongos NOD/Uni oscilou de acordo com o ano do experimento apresentando os seguintes valores até 36 semanas de idade: 52,6 a 81% nas fêmeas e 24 a 26,7 % nos machos.

5.2.Idade média da expressão do diabetes nos camundongos NOD/Uni

A evolução do diabetes em função do sexo e idade dos camundongos NOD/Uni encontra-se expressa nas **Figuras 1 e 2**. Os resultados foram considerados em dois anos de experimento tomando-se uma amostra anual.

O aparecimento do diabetes em camundongos fêmeos ocorreu em média com 17,7 semanas de idade, enquanto que este parâmetro nos machos foi de 23,2 semanas. As fêmeas foram capazes de expressar o diabetes precocemente, a partir da 10ª semana de idade (**Figura 1**). A idade mínima de expressão do diabetes em machos foi de 13 semanas. É possível observar que os machos apresentaram um atraso na expressão do diabetes, quando comparados com as fêmeas e justificou o uso de camundongos machos mais velhos no grupo experimental.

5.3.Qualidade sanitária de camundongos SPF

Amostras randômicas de camundongos NOD/Uni foram coletadas a cada dois meses da colônia SPF para análise na Seção de Controle de Qualidade Sanitária do CEMIB que certifica a qualidade sanitária dos animais. Não foi detectada qualquer infecção nos camundongos, na pesquisa de parasitas, vírus, bactérias ou fungos. É importante destacar que todos os animais se mostraram livres do vírus da hepatite murina, MHV-3 (Mouse Hepatitis Virus, tipo 3), vírus freqüente nas colônias de camundongos em Biotérios nacionais (Gilioli *et al.*, 1996; Gilioli *et al.*, 2000).

5.4. Constatação da infecção pelo *S. mansoni*

Os animais foram infectados com sucesso como indicado pela presença de vermes adultos, por ocasião da perfusão e pela presença de ovos e granulomas no fígado. Animais nos quais não foi possível verificar infecção por estes parâmetros, foram excluídos dos resultados.

5.5. Avaliação da sobrevida de camundongos NOD/Uni

Para a determinação da sobrevida dos animais diabéticos, foram infectados machos e fêmeas com 10, 25 ou 50 cercárias de *S. mansoni*. O melhor resultado obtido com os animais diabéticos mostrou que o grupo infectado com 10 cercárias apresentou animais vivos 49 dias após a infecção. Os resultados indicaram que animais não diabéticos suportaram a fase aguda da esquistossomose e sobreviveram mais do que 8 semanas com qualquer número de cercárias.

Para o estudo da influência do *S. mansoni* nos grupos diabéticos infectados, foi estabelecido o tempo mínimo de 49 dias de sobrevida esperada, resultando em uma infecção bem sucedida com o *S. mansoni*.

Os resultados da sobrevida obtidos em cada grupo experimental encontram-se dispostos na **Tabela 10**, considerando a infecção com 10, 25 e 50 cercárias. No grupo de fêmeas diabéticas prenhes houve infecção apenas com 10 cercárias.

Para melhor compreensão da sobrevida de animais diabéticos sem infecção foi preciso o acompanhamento e observação do tempo da sobrevida de fêmeas (**Figura 3**) e machos (**Figura 4**) após a constatação do diabetes.

Não houve morte de animais dos grupos de camundongos machos ou fêmeas não diabéticos, infectados com 10 cercárias de *S. mansoni* (FNDI, MNDI), até o final do experimento, com duração de 7 semanas.

As **Figuras 5 e 6** ilustram a sobrevida de acordo com o curso da infecção em intervalos críticos de picos de ocorrências de morte natural, para animais infectados, ou no caso dos não infectados, a sobrevida baseia-se no tempo após a constatação da glicosúria.

5.6. Grupo FDNI

A sobrevivência de fêmeas diabéticas após a primeira glicosúria positiva é de no máximo 4 semanas. Portanto, considerando o tempo desejado de infecção pelo *S. mansoni*, este grupo não alcançaria o final da infecção.

Somente 21% dos animais sobreviveram até 49 dias após a expressão do diabetes, isto é, 78,9% dos animais morreriam antes do final da infecção, (Figura 3).

5.7.Grupo FDI

Todas as fêmeas com diabetes grave apresentaram caquexia, atingindo peso de aproximadamente 12 g, por ocasião da morte.

A influência da infecção na sobrevida durante a fase inicial da esquistossomose está ilustrada na Figura 5.

A sobrevida 49 dias após a infecção é similar à observada no grupo FDNI. É possível constatar que a sobrevida do grupo FDI aumenta à medida que a infecção se desenvolve para a formação do granuloma, a partir de 42 dias.

TABELA 1
SOBREVIDA DE CAMUNDONGOS NOD/Uni DIABÉTICOS E NÃO DIABÉTICOS, INFECTADOS OU NÃO PELO *S. mansoni*, com 10, 25 ou 50 cercárias

Grupos experimentais	Número de animais Testados	*Número de animais sobreviventes	Sobreviventes (%)	Sobrevida média (dias)
FDNI	57	12	21,0	30,6
FDI	52	13	25,0	30,3
MDNI	24	10	41,6	37,1
MDI	10	07	70,0	47,3
FDPI	04	04	100	>49
FDPNI	10	10	100	>49
MNDI	66	66	100	>49
FNDI	41	41	100	>49

*até 49 dias de infecção ou da constatação da glicosúria positiva para os animais não infectados

Abreviaturas: M - Macho; F- Fêmea; D - Diabético; N - Não; P- Prenhe; I - Infectado

5.8.Grupo MDNI

Este grupo mostra que somente 41,6% dos animais (Figura 6) suportariam 49 dias de infecção pelo *S. mansoni*, isto é, aproximadamente

metade desta população morreria se estivesse infectada. É alta a estimativa de morte (58%), antes de 49 dias (**Figura 4**).

5.9.Grupo MDI

A infecção nos machos diabéticos (**Figura 6**) resultou maior sobrevivência (70%) quando comparada com o mesmo grupo de fêmeas - FDI (25%) e machos não infectados MDNI (41,6%).

5.10. ASSOCIAÇÃO DO DIABETES COM PRENHEZ E ESQUISTOSSOMOSE

5.10.1.Grupo de diabéticas prenhes não infectadas - FDPNI

Semanalmente foi avaliada a evolução do diabetes nas fêmeas diabéticas prenhes determinando-se os níveis de glicosúria. As fêmeas NOD/Uni diabéticas prenhes exibiram decréscimo no nível de glicose na urina durante a prenhez. Após o parto, durante o aleitamento, houve persistência na oscilação da glicosúria por alguns dias (6-10 dias) quando então o diabetes progrediu até a morte da fêmea, antes do desmame.

Após a prenhez, o nível de glicosúria variou entre 1000 e 2000 mg glicose/dL urina. Quando a expressão do diabetes ocorreu ao final da prenhez, o tempo de sobrevivência foi o mesmo observado nas fêmeas diabéticas não prenhes, ao redor de 3-4 semanas. Quando a expressão do diabetes ocorreu no início da prenhez ou alguns dias antes, o tempo de sobrevivência foi ampliado pelo mesmo período de 4 semanas do grupo diabético não prenhe, acrescido do tempo da prenhez. O aumento da sobrevivência em fêmeas diabéticas no início da prenhez foi observado em 100% dos casos (10 animais).

5.10.2.Grupo de diabéticas prenhes infectadas - FDPI

A detecção da prenhez não programada, em quatro animais, viabilizou o estudo da associação da prenhez com diabetes e esquistossomose. Este grupo foi infectado com 10 cercárias. Todas as fêmeas alcançaram o final da infecção e apresentavam ótimo aspecto de saúde por ocasião do parto, sem sinais típicos de doença manifesta, comparando-se ao grupo de fêmeas não diabéticas. Ao final da infecção as fêmeas exibiram altos níveis de glicose na urina: ≥ 1000 mg glicose/dL urina. A sobrevivência alcançada por este grupo foi de 100%.

Para a melhor compreensão de como este grupo possuía melhor prognóstico na evolução do diabetes e da esquistossomose, infectado ou não

pelo *S. mansoni*, foi avaliado o tamanho dos granulomas e peso do pâncreas ao final da infecção e comparado ao grupo diabético infectado sem prenhez (FDI).

5.11. PÂNCREAS

A evolução do peso do pâncreas no decorrer da infecção pelo *S. mansoni* foi avaliada em fêmeas e machos dos grupos diabéticos e não diabéticos. A redução do peso do pâncreas foi observada em fêmeas diabéticas a partir de 100 mg glicose/dL urina e em machos diabéticos a partir de 250 mg glicose/dL urina. O animal macho com diabetes grave tem maior perda de massa do pâncreas (3,25x) comparado com as fêmeas (2,23x). No caso das fêmeas prenhes foi possível constatar a boa preservação do pâncreas, apesar da alta glicosúria, mantendo valores compatíveis ao peso do pâncreas de fêmeas diabéticas infectadas com glicosúria 500 mg glicose/dL urina (**Tabela 2**).

A **Figura 7** ilustra a redução do peso do pâncreas em machos e fêmeas diabéticos infectados, em função da glicosúria.

A análise histopatológica do pâncreas de animal controle não diabético encontra-se descrita na **Fotomicrografia M1**, onde está ilustrada uma ilhota de Langerhans de uma fêmea normoglicêmica NOD/Uni, com 8 semanas de idade.

A **Fotomicrografia M2** ilustra a insulite presente no pâncreas de uma fêmea diabética com 18 semanas de idade, apresentando diabetes inicial, com glicosúria de 100 mg glicose /dL urina. Podemos observar nas seqüências das **Fotomicrografias M3 a M6** a evolução da pancreatite em fêmeas infectadas comparadas ao controle não infectado.

Houve a constatação de pancreatite somente em fêmeas NOD/Uni diabéticas infectadas com 10 cercárias, estando bem caracterizadas nas **Fotomicrografias M5 e M6**. Em relação aos machos, mesmo animais infectados com 25 ou 50 cercárias, não ocorreu o desenvolvimento da pancreatite na totalidade dos animais examinados.

Foi constatada a ausência das ilhotas de Langerhans no pâncreas de muitas fêmeas ao final do diabetes, após 7 semanas da infecção pelo *S. mansoni*. Nestes animais, também não foram formados granulomas ao redor dos ovos do trematódeo, quando presentes no parênquima hepático.

A presença de vermes adultos no pâncreas foi detectada no grupo de machos não diabéticos infectados com 50 cercárias (**Fotomicrografia M7**).

Reações granulomatosas no pâncreas foram detectadas no grupo de camundongos fêmeos não diabéticos infectados com 50 cercárias (**Fotomicrografia M8**).

Na **Fotomicrografia M9** é possível observar a reação celular em torno do ovo do trematódeo no pâncreas de um camundongo macho no início do diabetes.

TABELA 2
PESO MÉDIO DE PÂNCREAS (g) NOS ANIMAIS INFECTADOS POR *S. mansoni*, DE ACORDO COM A GLICOSÚRIA AOS 49 DIAS DE INFEÇÃO

GRUPOS	GLICOSÚRIAS					
	0	100	250	500	1000	2000
	peso médio do pâncreas (g)					
FNDI	0,266	-	-	-	-	-
FDI	-	0,212	0,283	0,181	0,154	0,119
FDPI	-	ND	ND	ND	0,200	0,181
MNDI	0,325	-	-	-	-	-
MDI	-	0,351	0,178	0,147	0,154	0,100

ND – Não Determinado

5.12. HEPATOMEGALIA

Para avaliar a hepatomegalia decorrente da infecção pelo trematódeo, foi determinada a percentagem da relação entre o peso do fígado (Pf) e peso corporal (Pc). Os resultados das médias dos valores percentuais da relação Pf/Pc para machos e fêmeas, diabéticos ou não, sem infecção ou com infecção por 10, 25 e 50 cercárias foram categorizados de acordo com a categoria do diabetes: inicial, leve, moderada a severa e grave. Na **Tabela 3** e **Figuras 8 e 9** constam os resultados de cada grupo, exceto o de fêmea prenhe.

É possível observar que todos os grupos infectados apresentaram hepatomegalia porque os valores correspondentes da relação % Pf/Pc dos grupos controles (FNDNI e MNDNI) foram, respectivamente, 5,53 e 5,98. Os maiores índices referem-se ao grupo infectado com 50 cercárias. Aparentemente não há diferença na hepatomegalia decorrente da infecção com 10 e 25 cercárias. No grupo infectado por 50 cercárias, houve hepatomegalia máxima para FDI, no estágio inicial de diabetes, em valor superior ao apresentado pelo grupo de fêmea não diabética (FND) (**Figura 9**).

Fêmeas diabéticas infectadas com 50 cercárias, em glicosúria inicial, não apresentaram diferença de hepatomegalia quando comparadas ao grupo de fêmeas não diabéticas (**Tabela 3**).

As menores hepatomegalias ocorreram em machos e fêmeas diabéticos com diabetes grave. O grupo MDI, com diabetes grave foi o que apresentou a relação % Pf/Pc de 5,36, abaixo do grupo macho controle não diabético (**Tabela 3**).

TABELA 3

Hepatomegalia média nos grupos experimentais de camundongos Nod/Uni em função do número de cercárias de *S. mansoni* e da categoria do diabetes.

GRUPO	MÉDIA DA % Pf/Pc	NÚMERO DE CERCÁRIAS	CATEGORIA DO DIABETES
FNDI	9,52	50	ND
FNDI	8,17	10	ND
MNDI	9,90	50	ND
MNDI	7,86	10	ND
MNDI	7,08	25	ND
MDI	5,36	50	GRAVE
MDI	7,51	10	INICIAL
MDI	9,04	50	INICIAL
MDI	7,17	25	INICIAL
MDI	6,64	10	MODERADA
FDI	8,01	10	INICIAL
FDI	10,87	50	INICIAL
FDI	8,15	25	LEVE
FDI	7,64	10	SEVERA
FDI	5,86	50	GRAVE
FDI	6,43	10	GRAVE
CONTROLES			
FNDNI	5,53	0	ND
MNDNI	5,98	0	ND

Abreviaturas : N- não; F- fêmea; M- macho; D- diabético, I- infectado
Pf = Peso do fígado; Pc = Peso corporal

5.13. Histopatologia dos granulomas hepáticos

Foi avaliado o padrão principal da reação aos ovos de *S. mansoni* no fígado de camundongos fêmeos e machos, não diabéticos e diabéticos, em diferentes graus do diabetes, na 7ª semana de infecção pelo *S. mansoni*.

Nas **Fotomicrografias M10 a M18** encontram-se descritos os principais padrões de granuloma hepático encontrados em não diabéticos, e diabéticos com diabetes inicial, leve, moderada, severa e grave.

Granulomas típicos foram observados no grupo de camundongos machos e fêmeos controle (não diabéticos). Houve tendência dos granulomas se tornarem difusos quando o grau de glicosúria ultrapassou 250 mg glicose/dL urina em fêmeas diabéticas (**Fotomicrografia M12**) e 500 mg glicose/dL urina em machos diabéticos (**Fotomicrografia M15**). A forma irregular da reação granulomatosa também propiciou maior dispersão dos resultados obtidos da medida da área dos granulomas principalmente nos grupos com diabetes leve e moderada.

De acordo com o aumento do nível de glicosúria, existiu a tendência dos granulomas hepáticos tornarem-se menores. No diabetes grave, a formação da reação granulomatosa ficou prejudicada, caracterizada pelo infiltrado linfocitário pouco denso ao redor dos ovos.

5.14. ÁREA DE GRANULOMAS HEPÁTICOS

A determinação da área da elipse foi considerada como parâmetro para expressar o tamanho dos granulomas hepáticos após sete semanas da infecção pelo *S. mansoni*. Desta forma, foram tomadas as medidas de uma amostra de granulomas no fígado de camundongos NOD/Uni fêmeos e machos diabéticos com vários graus de glicosúria, além dos animais não diabéticos e das fêmeas diabéticas prenhes ou não. Os resultados da análise estatística encontram-se dispostos nas **Figuras 10 a Figura 13** e detalhados no apêndice A.

5.14.1. EM CAMUNDONGOS FÊMEOS

A análise da área de granulomas hepáticos em camundongos fêmeos evidencia o mesmo fenômeno observado em camundongos machos. Na **Figura 11** observa-se a dinâmica da área dos granulomas em animais do grupo controle e com glicosúria 100, <250 e 250 mg glicose/dL urina. As observações histopatológicas de fígado de fêmeas NOD/Uni infectadas encontram-se nas **Fotomicrografias M10 a M13**.

5.14.2.EM CAMUNDONGOS MACHOS

Em se tratando de camundongos machos, os granulomas hepáticos medidos foram provenientes de animais com os seguintes graus de glicosúria ao final da infecção: 100, 500, 1000 e 2000 mg glicose/dL urina. A **Figura 10** expressa a área do granuloma de camundongos NOD machos diabéticos e não diabéticos, em função da glicosúria. Observa-se que a área dos granulomas tende a diminuir em função da glicosúria nos machos diabéticos, ocasionando a redução em até 70% na área do granuloma no caso de diabetes grave, com glicosúria de 2000 mg glicose/dL urina.

As observações histopatológicas de fígados de camundongos NOD/Uni machos infectados encontram-se nas **Fotomicrografias M14 a M18**.

Observa-se maior área do granuloma hepático na vigência da glicosúria de 500 mg glicose/dL urina, porque a reação granulomatosa mostrou-se por vezes difusa e irregular, conforme ilustrado na **Fotomicrofotografia M15**. Por outro lado, em animais com diabetes moderada, a evolução do *S. mansoni* ocorreu em microambiente de diabetes inicial, ou na fase pré-diabética.

A organização concêntrica da resposta granulomatosa, típica de animais do grupo controle está evidenciada na **Figura 10**, onde pode ser constatada menor variabilidade da área do granuloma. É importante destacar que a forma do granuloma passa a ser atípica em camundongos com glicosúria acima de 100 mg glicose/dL urina, com tendência a perder o limite concêntrico entre o ovo e o parênquima hepático, observado no granuloma do grupo controle (**Fotomicrografia M 14**).

5.14.3.Efeito da Prenhez em camundongo NOD/Uni diabético

O grupo que apresentou a maior área da reação granulomatosa foi o grupo das fêmeas não diabéticas (**Figura 11**). Não houve diferença nas medidas de granulomas em animais com diabetes inicial e moderada (entre 100 e 250 mg glicose/dL urina).

A **Figura 12** ilustra a medida da área de granulomas em função da glicosúria (100 e 1000 mg glicose/dL urina) para fêmea diabética prenhe em relação à área de granulomas observada em fêmeas não diabéticas.

Na **Figura 12** é possível verificar que o grau de glicosúria também interferiu na área dos granulomas, sugerindo que no caso de diabetes severa (≥ 1000 mg glicose/dL urina) os granulomas apresentaram maior variabilidade e tornaram-se menores.

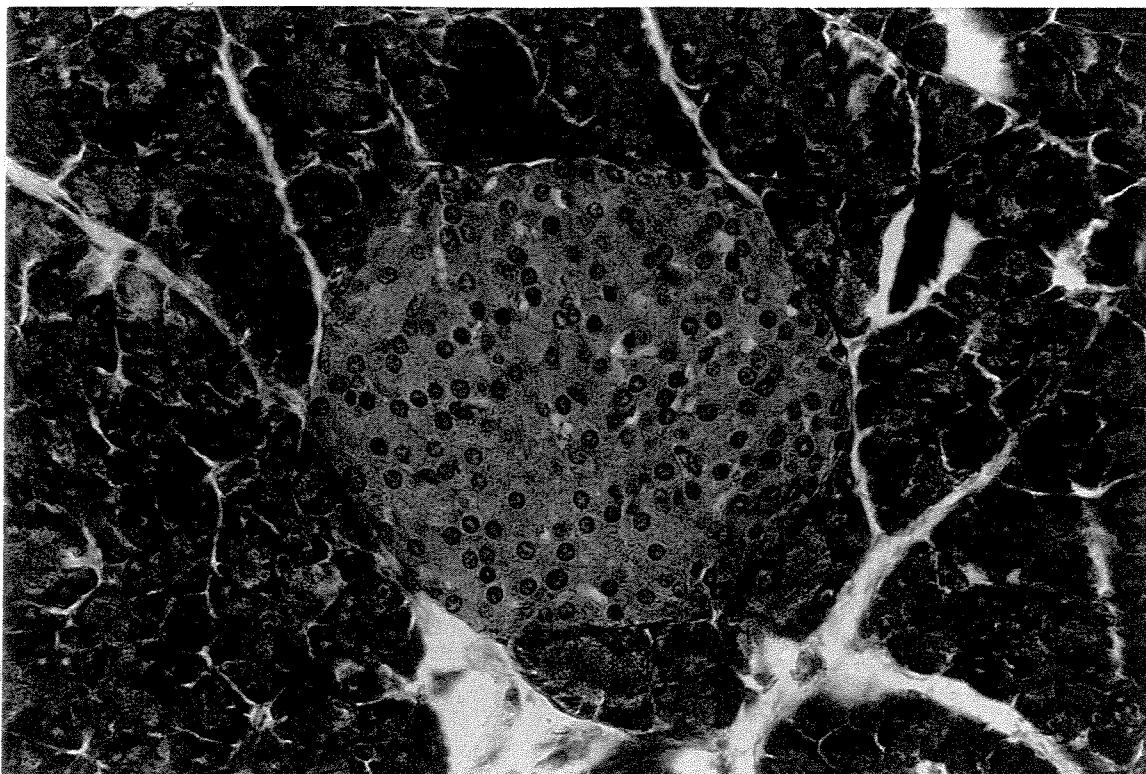
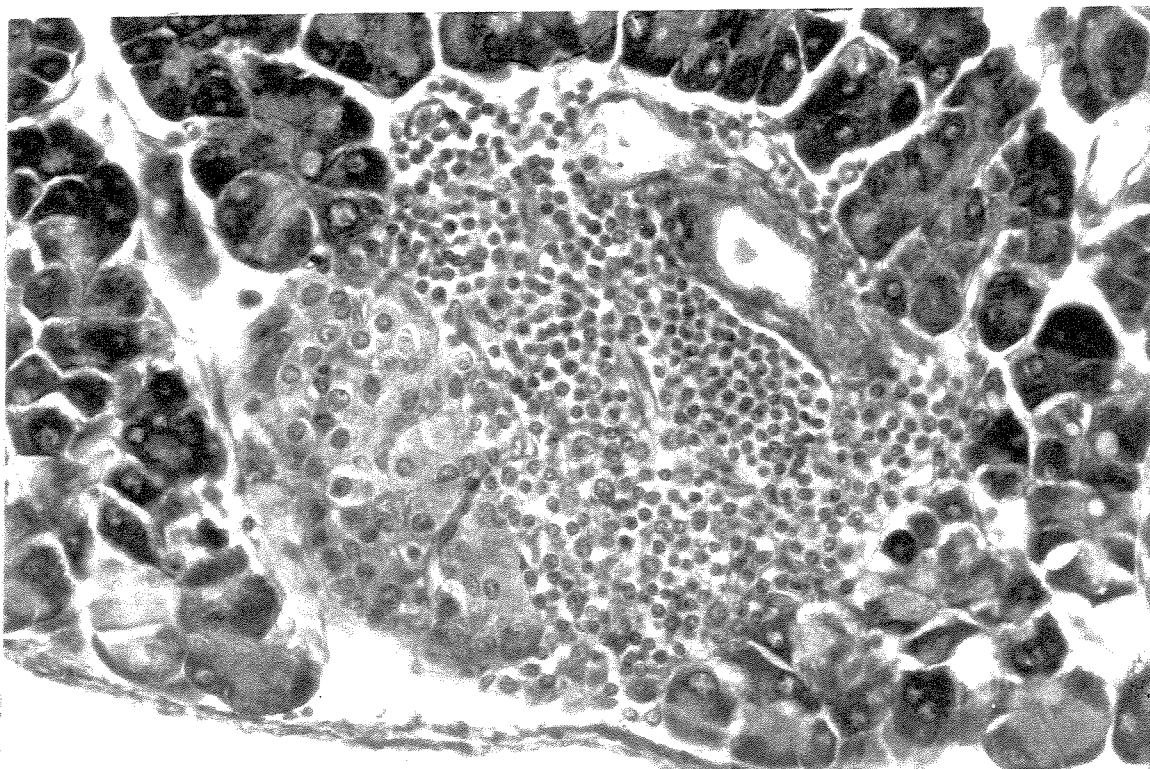
A **Figura 13** ilustra a comparação da área do granuloma hepático entre fêmeas diabéticas prenhes e fêmeas diabéticas sem prenhez. Nesta análise, convém ressaltar que foi determinada a diferença da área granulomatosa incluindo apenas fêmeas com glicosúrias similares. Observa-se que apesar do grau de diabetes ser equivalente, houve maior variabilidade em granulomas nas fêmeas diabéticas prenhes. A área do granuloma no grupo diabética prenhe apresentou valores superiores quando comparado ao grupo sem prenhez.

Em fêmea prenhe infectada pelo *S. mansoni* após a expressão do diabetes, foi observada formação de granulomas equivalente à fêmea não diabética não prenhe (**Figuras 12 e 13**).

LEGENDAS das Fotomicrografias

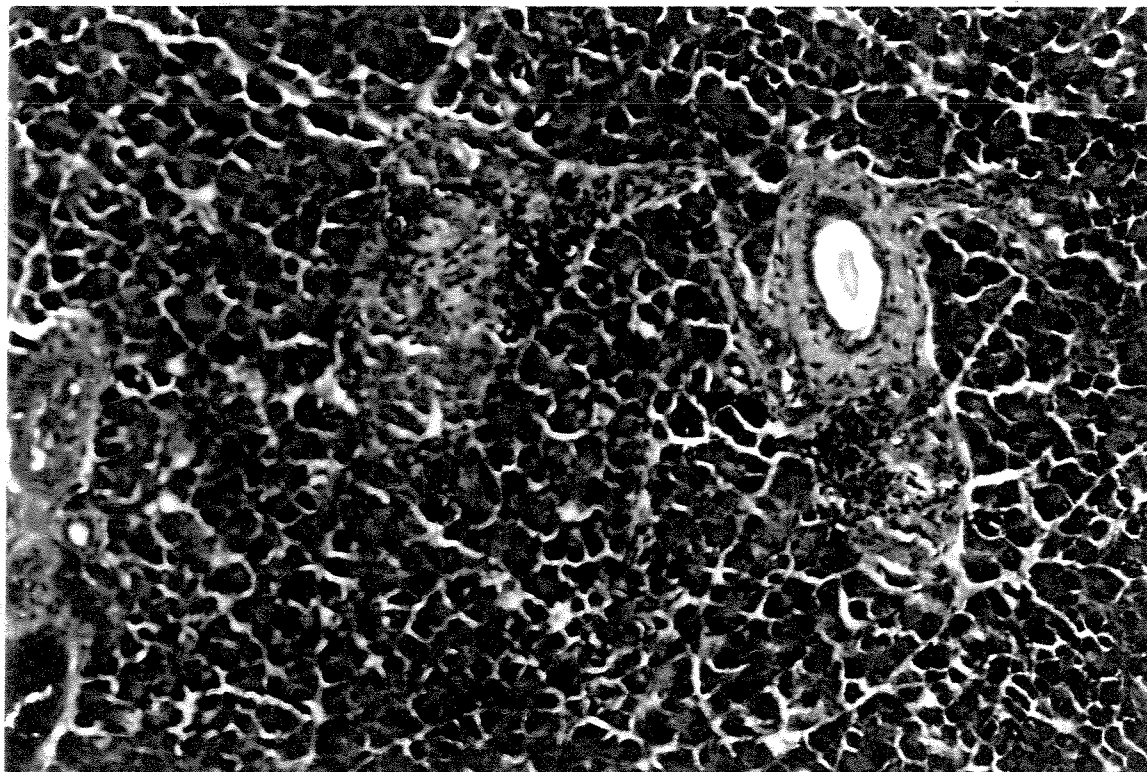
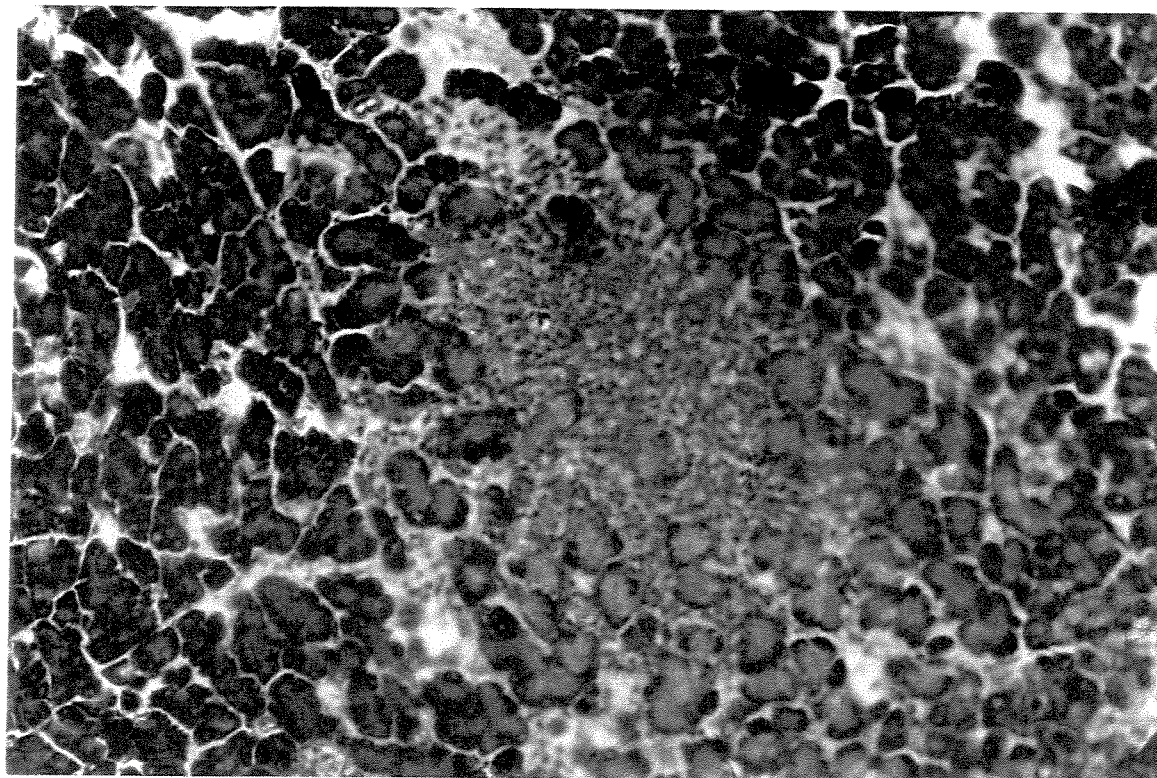
M1- Fotomicrografia de corte de pâncreas de camundongo NOD/Uni fêmea não infectada e não diabética, normoglicêmica, com 8 semanas de idade. Observar uma ilhota de Langerhans normal e típica, sem infiltração linfocitária. Coloração Hematoxilina-eosina (40x)

M2- Fotomicrografia de corte de pâncreas com insulite invasiva em camundongo NOD/Uni fêmea diabética, não infectada, com 18 semanas de idade e glicosúria 100 mg glicose/dL urina. Observar infiltração linfocitária na ilhota de Langerhans. Coloração Hematoxilina-eosina (40x)

M 1**M 2**

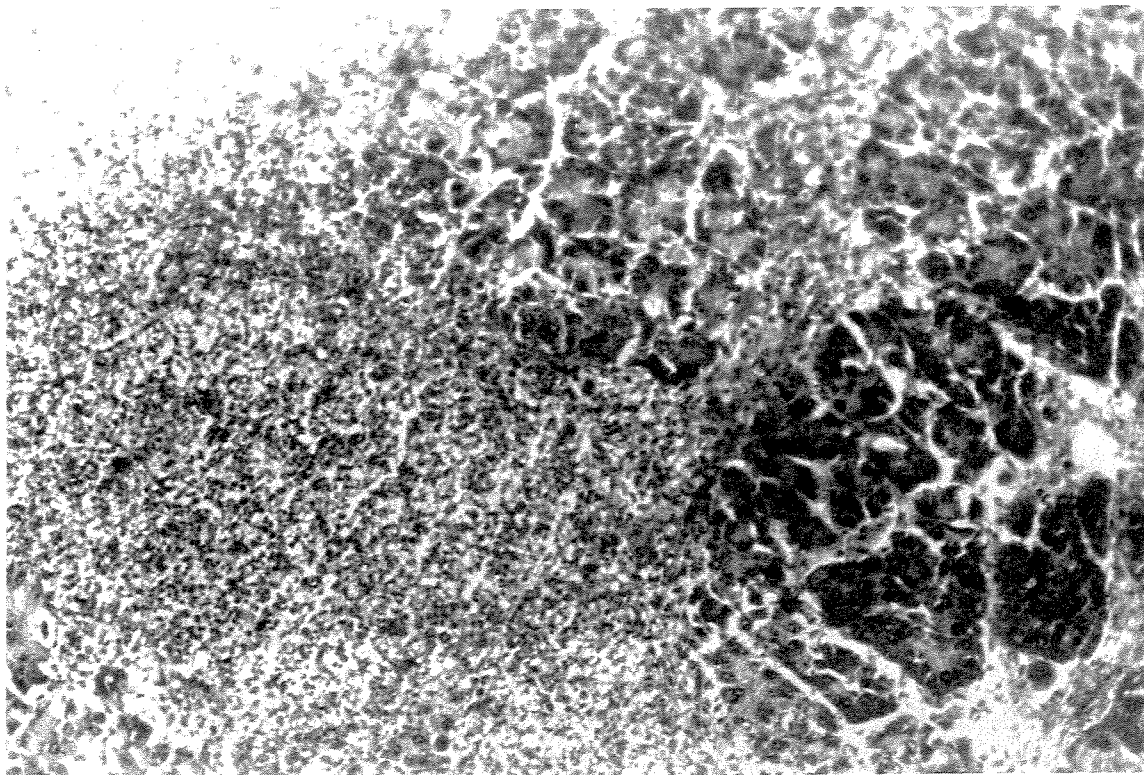
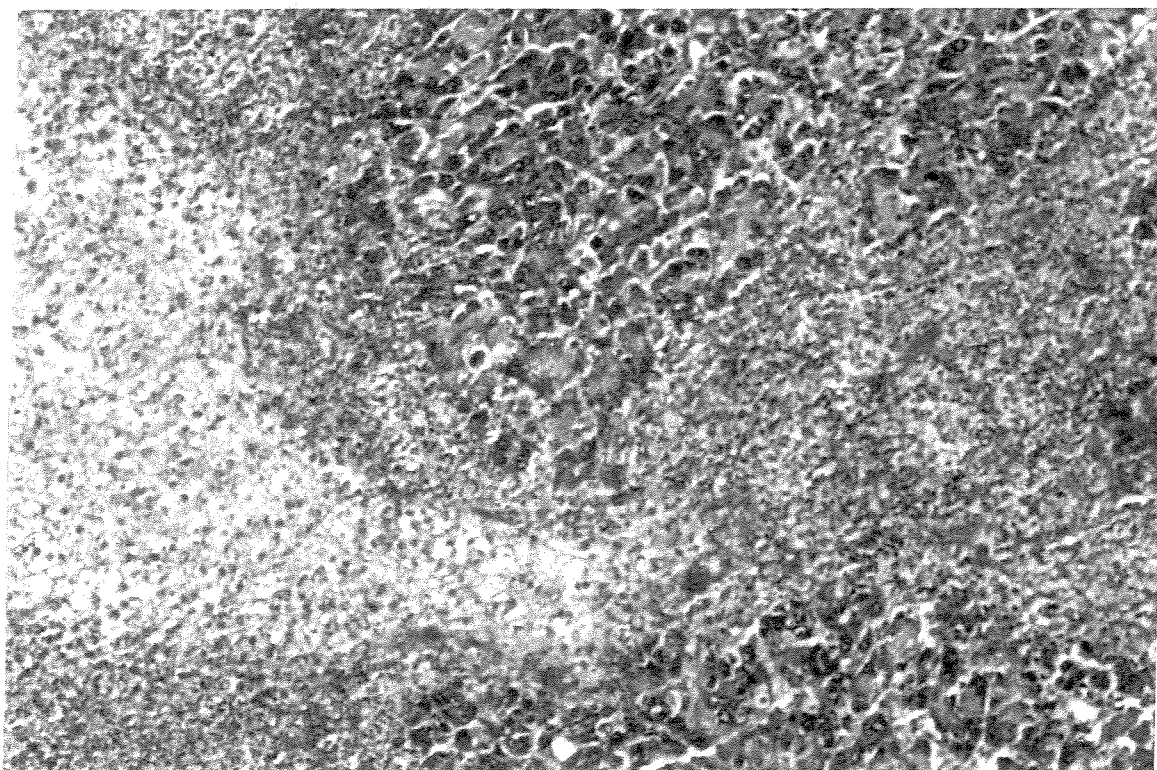
M3- Fotomicrografia de corte de pâncreas de camundongo NOD/Uni fêmea diabética, glicosúria 2000 mg glicose/dL urina, não infectada. Não há infiltrado inflamatório no tecido exócrino, ocorrendo a infiltração típica da insulite, junto à ilhota e arteríola. Coloração Hematoxilina-eosina (20x)

M4- Fotomicrografia de corte de pâncreas de camundongo NOD/Uni fêmea diabética, glicosúria 250 mg glicose/dL urina, infectada com 10 cercárias de *S. mansoni*, na sétima semana de infecção. Observar início de infiltração linfocitária no tecido exócrino. Coloração Hematoxilina-eosina (20x)

M 3**M 4**

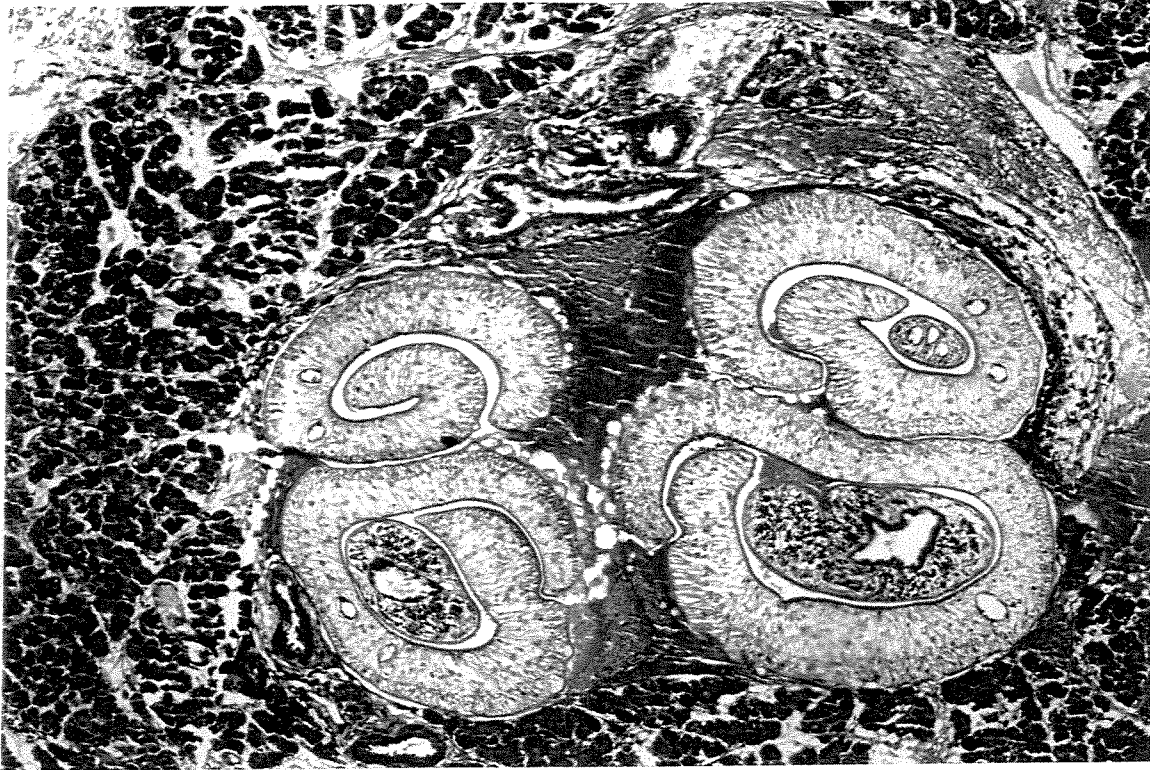
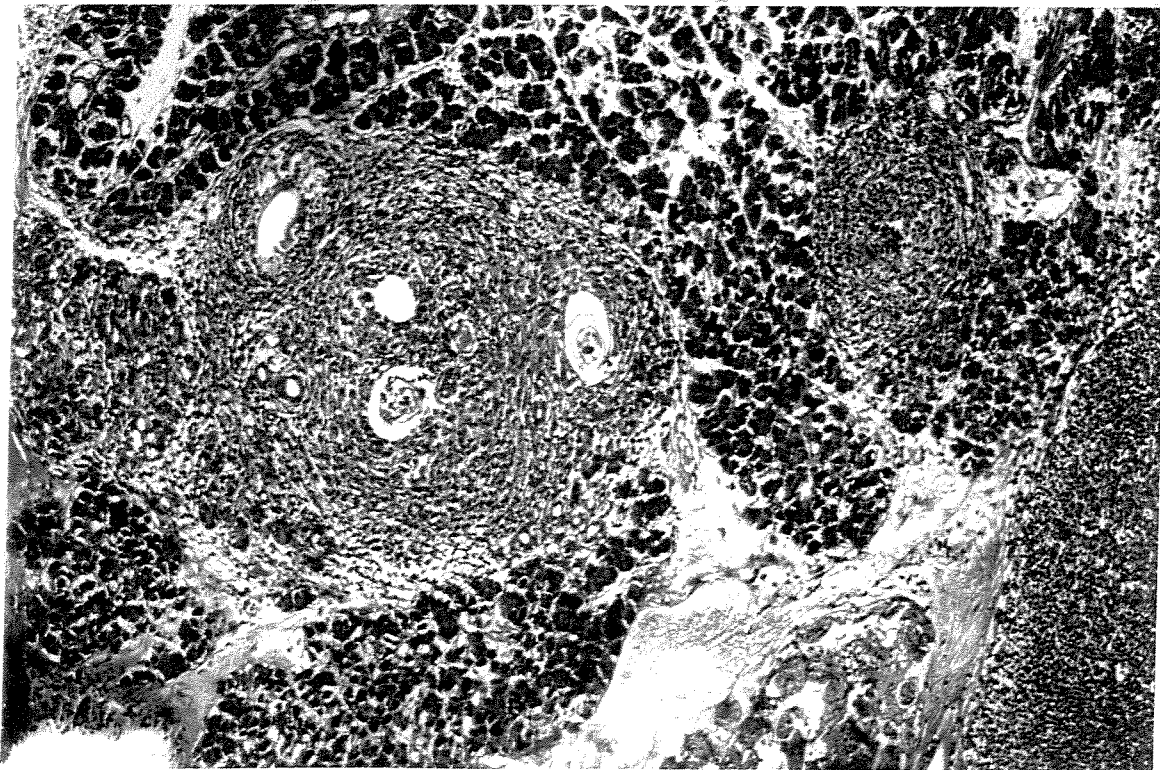
M5- Fotomicrografia de corte de pâncreas de camundongo NOD/Uni fêmea diabética, glicosúria 2000 mg glicose/dL urina, infectada com 10 cercárias de *S.mansoni*, à morte, com 42 dias de infecção. Observar severa pancreatite. Coloração Hematoxilina-eosina (20x)

M6- Fotomicrografia de corte de pâncreas de camundongo NOD/Uni fêmea diabética, glicosúria 2000 mg glicose/dL urina, infectada com 10 cercárias de *S.mansoni*, à morte, aos 42 dias de infecção. Observar ampla destruição do parênquima pancreático. Coloração Hematoxilina-eosina (20x)

M 5**M 6**

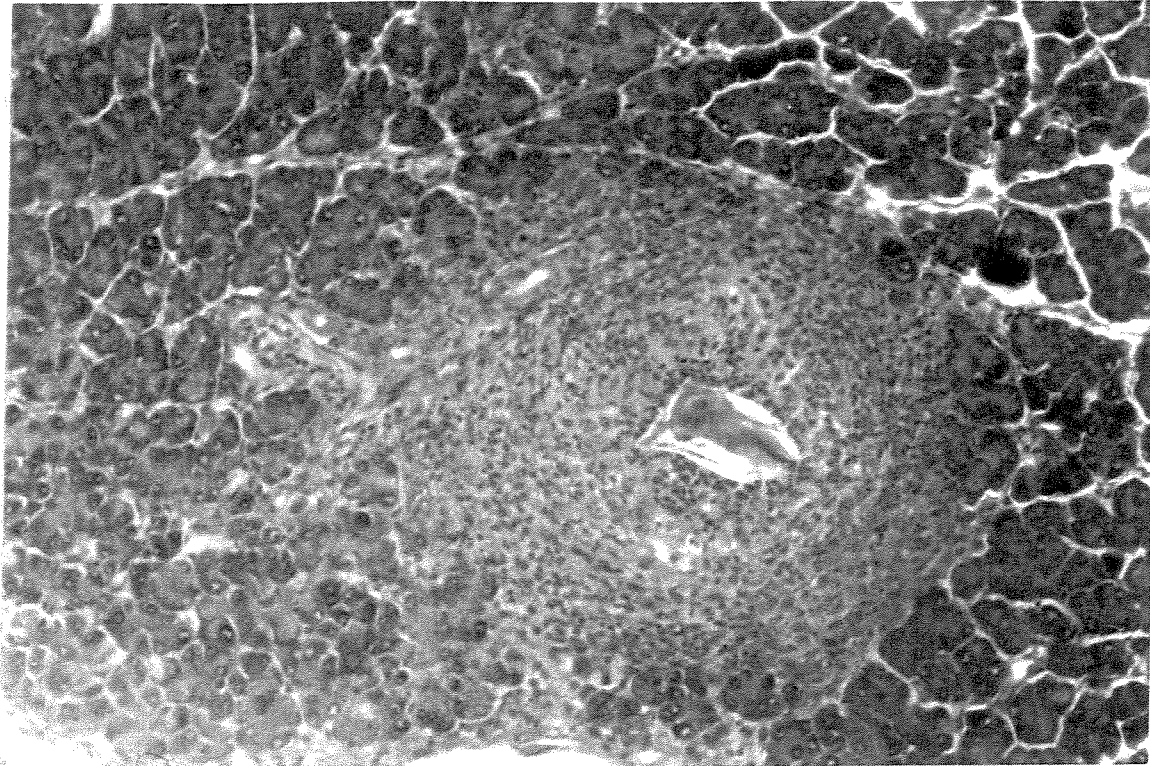
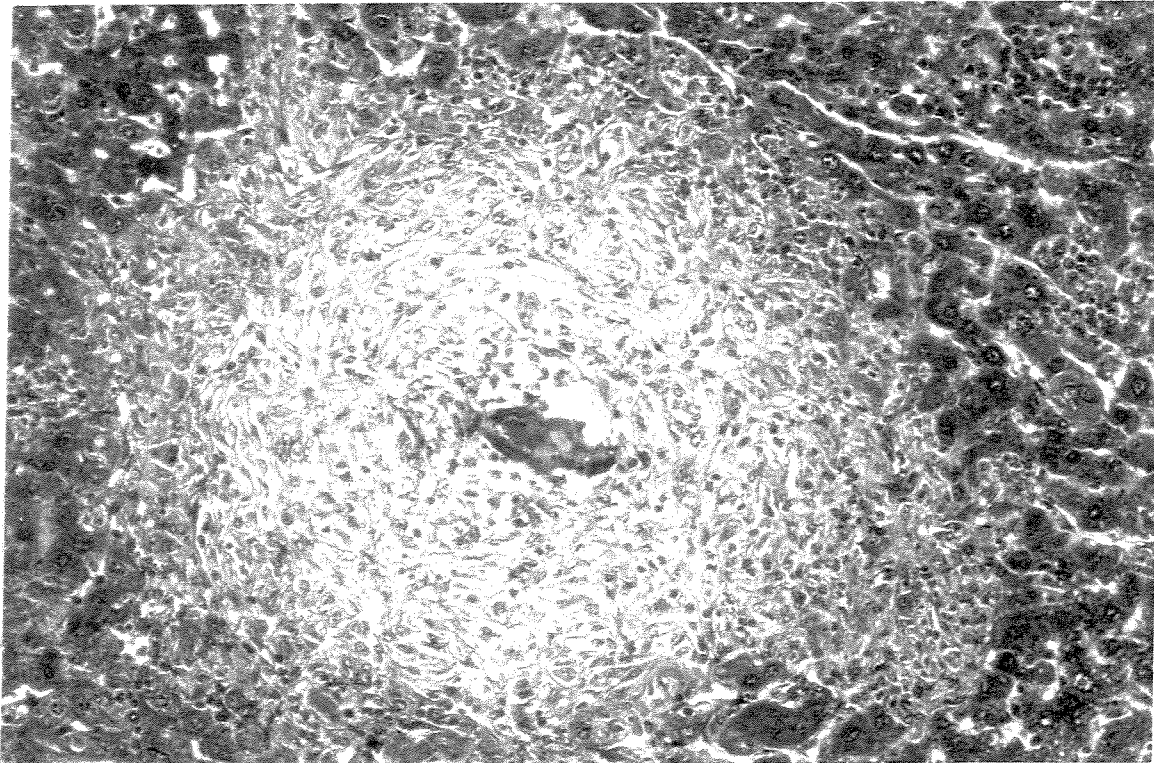
M7- Fotomicrografia de corte de pâncreas de camundongo macho NOD/Uni não diabético infectado com 50 cercárias de *S. mansoni*. Observar a presença de vermes (3 casais e um macho) adultos, sem reação inflamatória, na sétima semana de infecção. Coloração Hematoxilina-eosina (10x)

M8 -Fotomicrografia de corte de pâncreas de camundongo NOD/Uni fêmea não diabética infectada com 50 cercárias de *S. mansoni*, na sétima semana de infecção. Observar intensa reação granulomatosa concêntrica, ao redor de vários ovos. Coloração Hematoxilina-eosina (10x)

M 7**M 8**

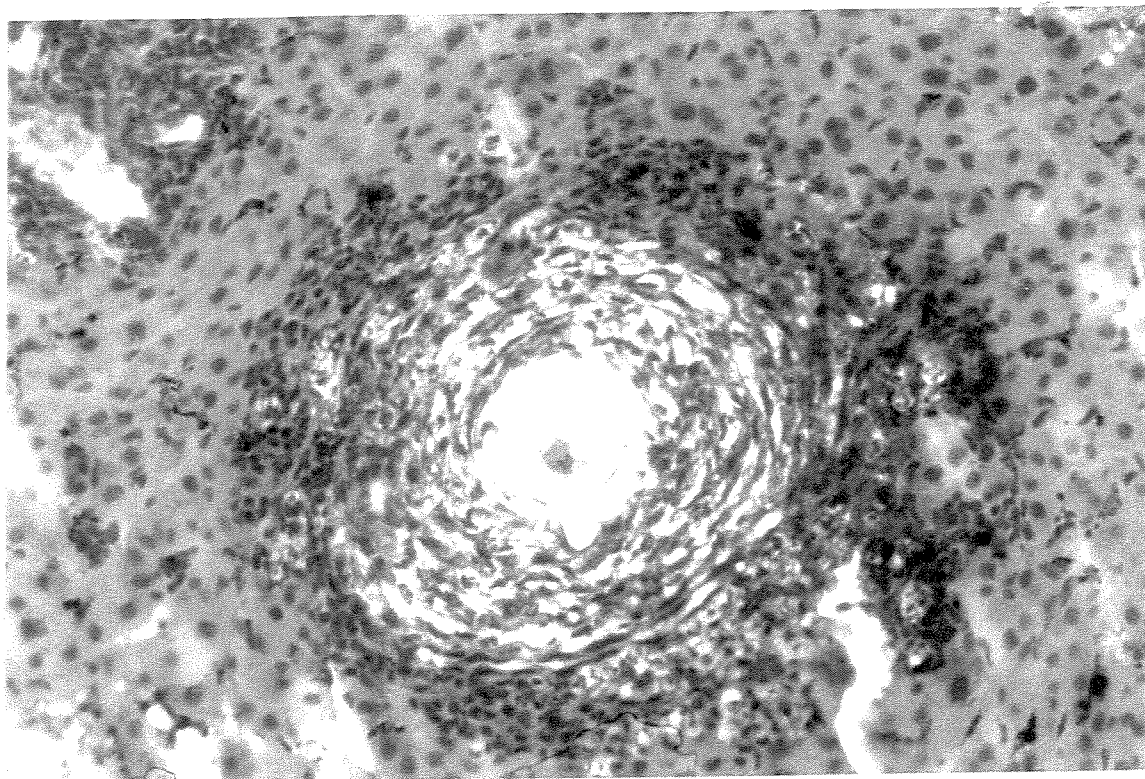
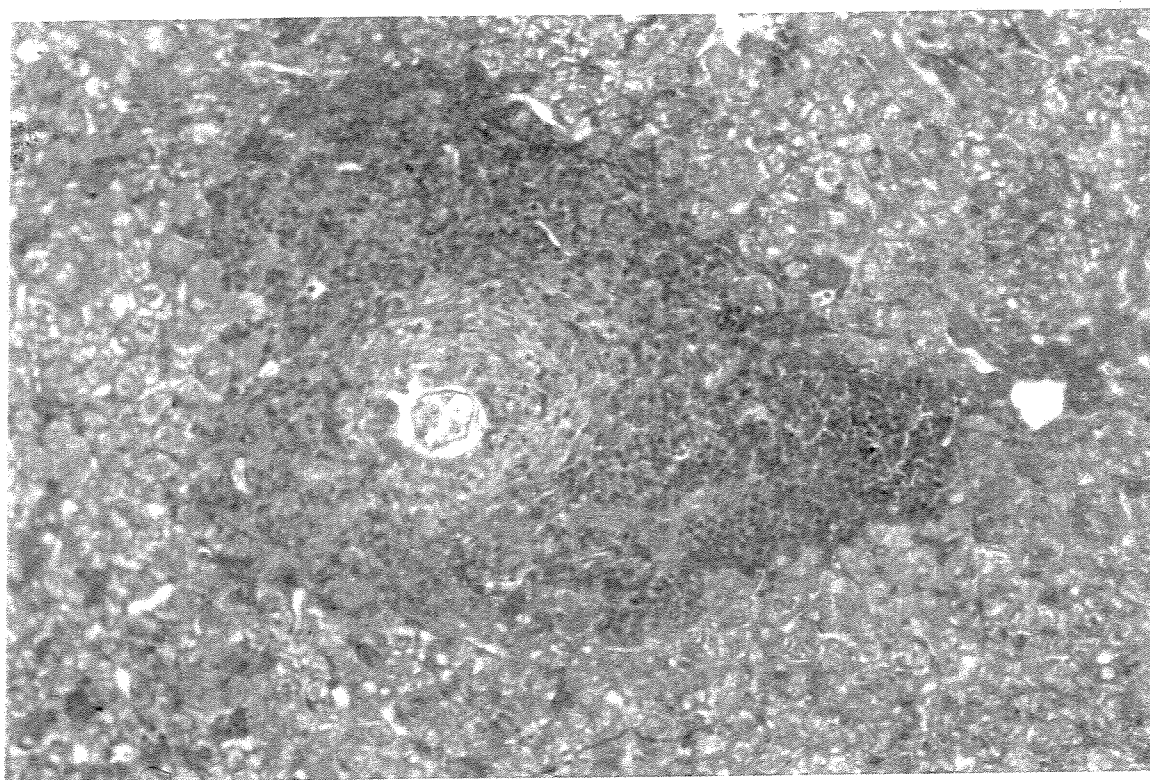
M9- Fotomicrografia de corte de pâncreas de camundongo NOD/Uni macho diabético, glicosúria 100 mg glicose/dL urina, infectado com 50 cercárias de *S. mansoni*, com 7 semanas de infecção. Observar extensiva reação celular ao ovo, invadindo os ácinos à esquerda. Coloração Hematoxilina-eosina (20x)

M10- Fotomicrografia de corte de fígado de camundongo NOD/Uni fêmea não diabética, infectada com 50 cercárias de *S. mansoni*, na sétima semana de infecção. Observar o granuloma e a presença de hepatócitos íntegros adjacentes à reação granulomatosa. Coloração Hematoxilina-eosina (40x)

M 9**M 10**

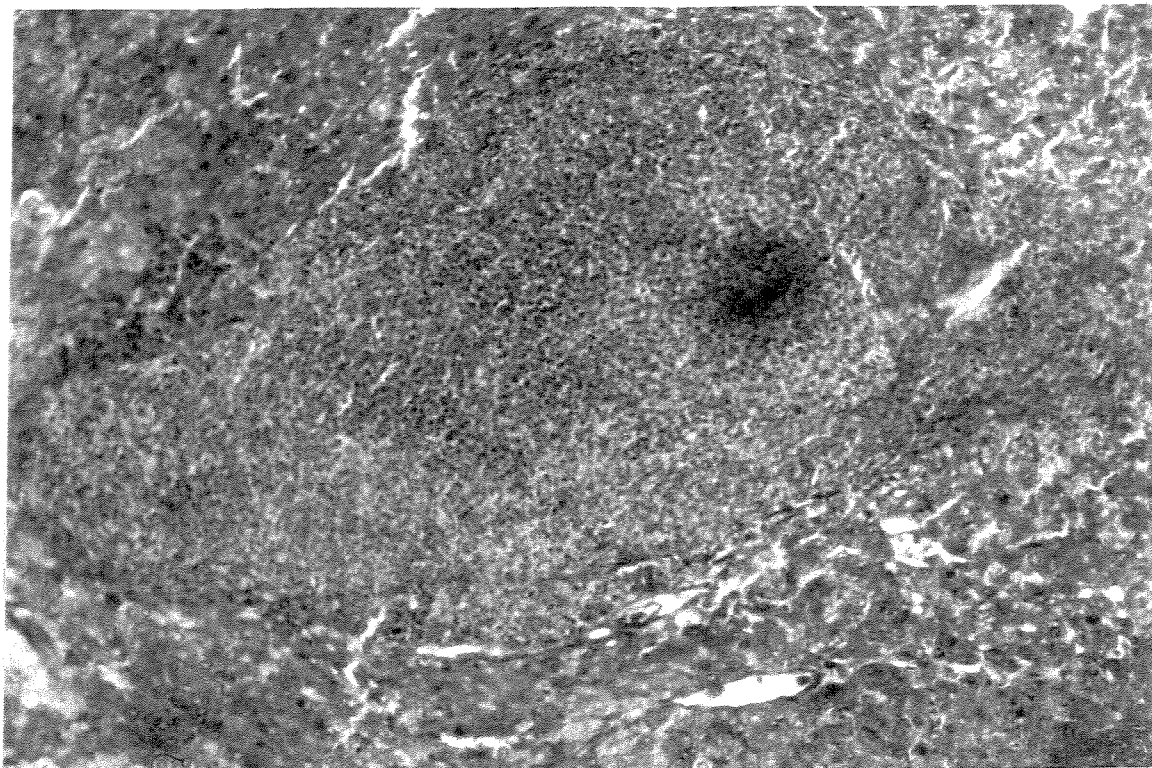
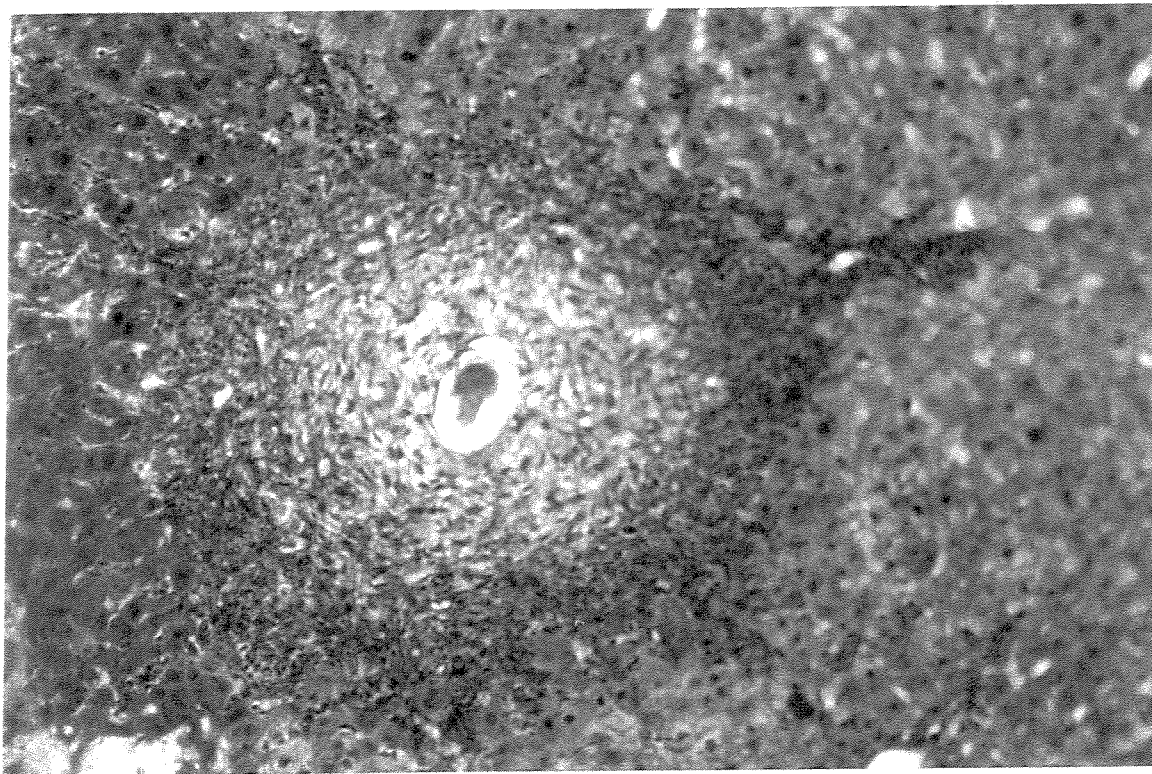
M11- Fotomicrografia de corte de fígado de camundongo NOD/Uni fêmea com glicosúria 100 mg glicose/dL urina, infectada com 50 cercárias de *S. mansoni*, na sétima semana de infecção. Observar disposição concêntrica da reação granulomatosa e a camada externa do granuloma constituída por hepatócitos degenerados, adjacente aos hepatócitos íntegros. Coloração Hematoxilina-eosina (40x)

M12- Fotomicrografia de corte de fígado de camundongo NOD/Uni fêmea com glicosúria 250 mg glicose/dL urina, infectada com 10 cercárias de *S. mansoni*, com sete semanas de infecção. Observar reação granulomatosa difusa envolvida por infiltrado eosinofílico. Coloração Hematoxilina-eosina (20x)

M 11**M 12**

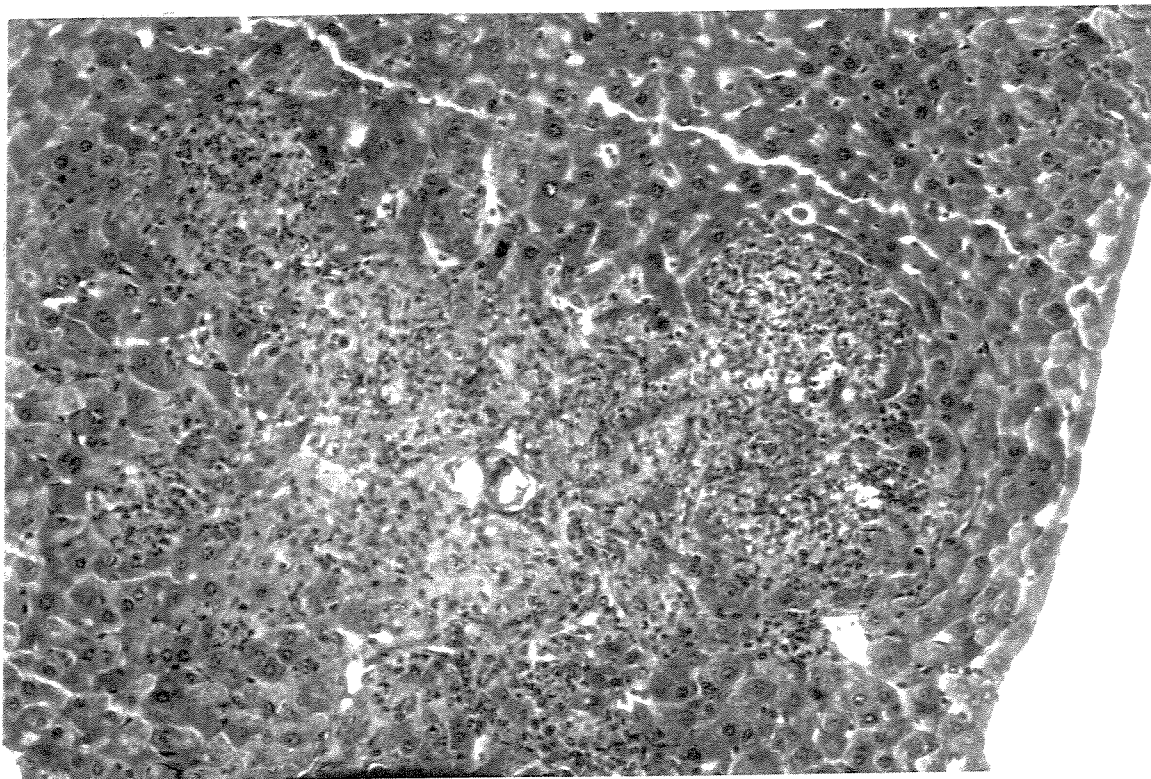
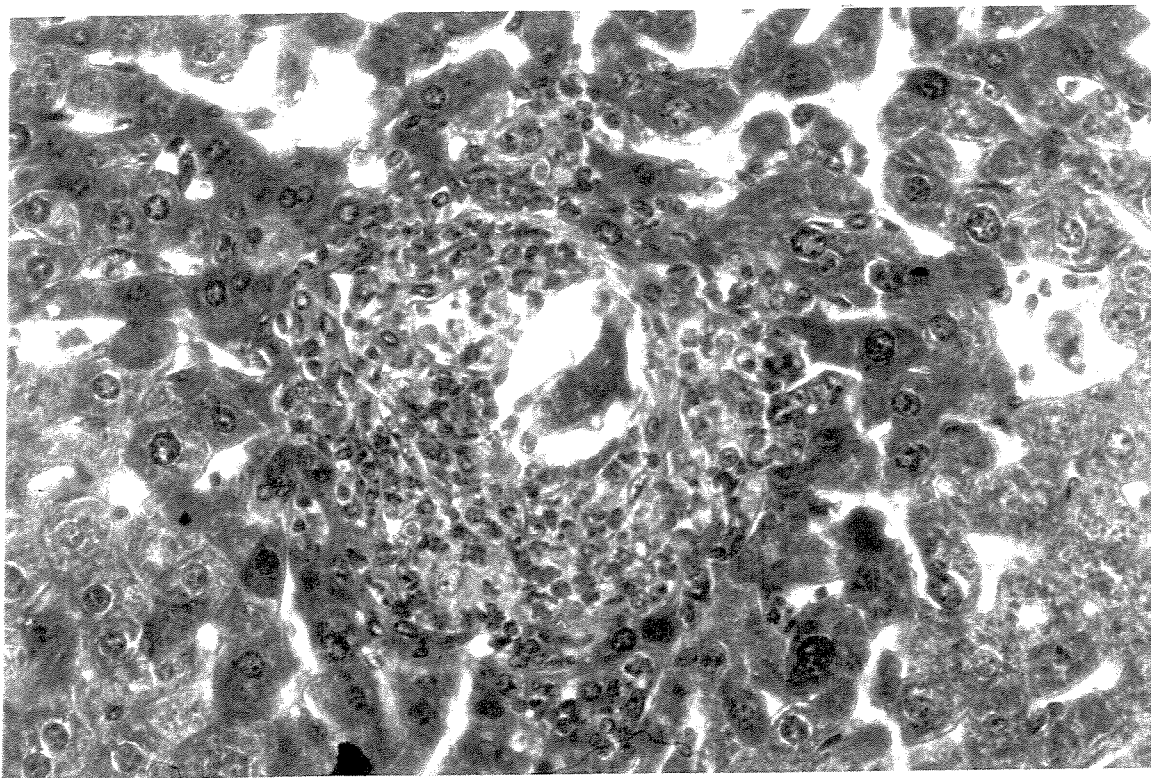
M13- Fotomicrografia de corte de fígado de camundongo NOD/Uni fêmea diabética, glicosúria 2000 mg glicose/dL urina, infectada com 10 cercárias de *S. mansoni*, com 43 dias de infecção, à morte. Observar a presença de intenso infiltrado inflamatório. Coloração Hematoxilina-eosina (20x)

M14- Fotomicrografia de corte de fígado de camundongo NOD/Uni macho não diabético, infectado com 10 cercárias de *S. mansoni*, na sétima semana de infecção. Observar típica formação concêntrica de granuloma. Coloração Hematoxilina-eosina (20x)

M 13**M 14**

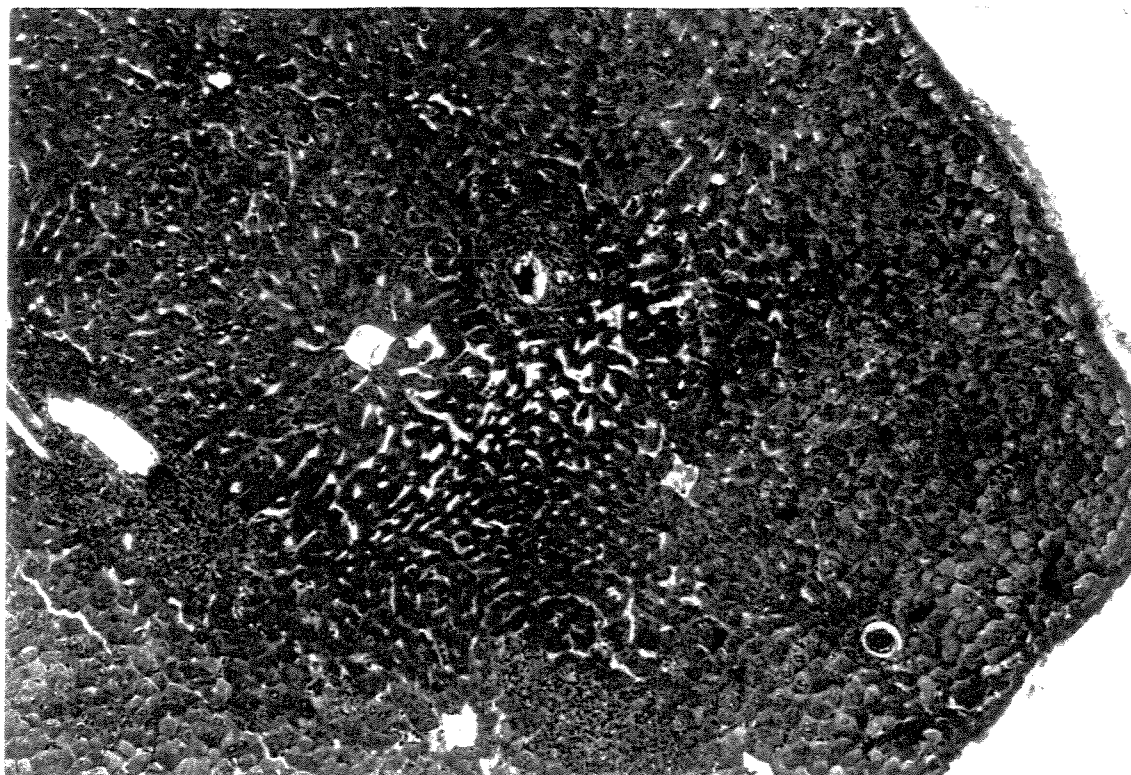
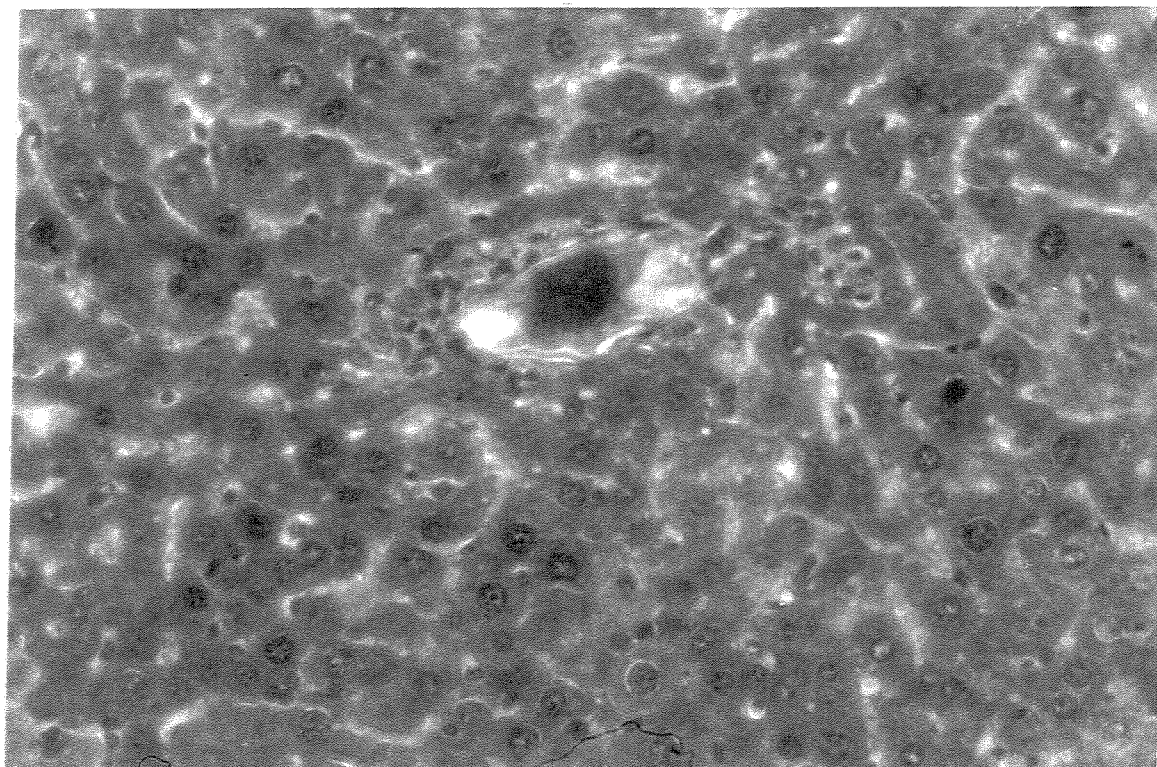
M15- Fotomicrografia de corte de fígado de camundongo NOD/Uni macho diabético, glicosúria 500 mg glicose/dL urina, infectado com 10 cercárias de *S. mansoni*, com 7 semanas de infecção. Notar o padrão difuso do infiltrado linfocitário ao redor do ovo. Coloração Hematoxilina-eosina (20x)

M16- Fotomicrografia de corte de fígado de camundongo NOD/Uni macho diabético, glicosúria 1000 mg glicose/dL urina, à morte, infectado com 50 cercárias de *S. mansoni*, com 7 semanas de infecção. Observar baixa infiltração linfocitária ao redor do ovo. Coloração Hematoxilina-eosina (40x)

M 15**M 16**

M17- Fotomicrografia de corte de fígado de camundongo NOD/Uni macho diabético, glicosúria 1000 mg glicose/dL urina, infectado com 50 cercárias de *S. mansoni*, com 7 semanas de infecção. Observar baixa infiltração linfocitária ao redor do ovo e a presença de um ovo sem infiltração linfocitária. Coloração Hematoxilina-eosina (10x)

M18- Fotomicrografia de corte de fígado de camundongo NOD/Uni macho diabético, glicosúria 2000mg glicose/dL urina, infectado com 10 cercárias de *S. mansoni*, com 7 semanas de infecção. Observar reduzida resposta celular com poucas células inflamatórias ao redor do ovo. H-E (40x)

M 17**M 18**

5.15.COMPRIMENTO DE VERMES ADULTOS DE *S. mansoni*

5.15.1.AVALIAÇÃO NO GRUPO CONTROLE FND E MND

Observando os comprimento de vermes machos e fêmeas distribuídos na **Tabela 4** para os grupos de animais não diabéticos, podemos inferir que o desenvolvimento de vermes fêmeos (6,45 mm) atinge maior tamanho em camundongo fêmeo do que em macho (5,18mm). Este fato não ocorreu para vermes machos.

5.15.2.VERMES FÊMEOS

Foi realizada a análise estatística pelo teste de Tukey dos comprimentos dos vermes fêmeos adultos do *S. mansoni* considerando grupos de camundongos machos e fêmeas diabéticos e não diabéticos e fêmeas diabéticas prenhas. Todos os resultados de comprimento dos vermes fêmeas estão ilustrados na **Figura 14** para cada grupo de camundongo. A aplicação do teste de Tukey mostrou a diferença entre os grupos. Os resultados ilustrados no apêndice B indicam que houve influência do diabetes sobre o comprimento dos vermes fêmeos, assim como o sexo do hospedeiro.

Os grupos de camundongos FND X FD diferiram, estatisticamente, o que evidencia a importância do diabetes. Da mesma forma, mostraram-se significativamente diferentes os comprimentos dos vermes desenvolvidos em camundongos fêmeos não diabéticos e machos não diabéticos, evidenciando a importância do sexo do hospedeiro.

Os vermes fêmeos coletados de camundongos fêmeos não diabéticos e de machos diabéticos não são comparáveis, fisiologicamente, portanto, o resultado da análise estatística foi excluído.

Os grupos de animais diabéticos MD e FD apresentaram redução no comprimento de vermes fêmeos.

Os vermes fêmeos coletados em camundongos machos diabéticos e fêmeas diabéticos não diferiram significativamente em comprimento em função do baixo número de vermes fêmeos em hospedeiro com glicosúria moderada a alta. Desta forma, ficou prejudicada a análise estatística para análise do efeito da glicosúria sobre o comprimento dos vermes fêmeos em camundongos machos diabéticos. No entanto, foi possível verificar que os hospedeiros machos com diabetes severa e grave, apresentaram expressiva redução no comprimento dos vermes fêmeos (30,5%) e reciprocamente, menor redução de tamanho foi encontrada em animais com glicosúria baixa (5,58%) (**Figura 18**).

No caso das fêmeas diabéticas prenhas, foi possível observar que não houve redução significativa no desenvolvimento somático dos vermes fêmeos (**Figura 18**).

Em relação ao efeito da prenhez em fêmeas diabéticas sobre os helmintos fêmeos, observou-se maior variabilidade nas medidas dos vermes fêmeos em relação aos outros grupos, situando-se aproximadamente 50% das medidas, acima da mediana, equivalendo ao tamanho dos vermes fêmeos no grupo FND (**Figura 14**). O teste de Tukey não demonstrou diferença significativa entre as medidas dos vermes fêmeos entre os grupos de FND e FDP, apesar da maior variabilidade das medidas, devido ao estado diabético e à prenhez.

Na **Tabela 4** estão detalhados os resultados relativos aos comprimentos dos vermes fêmeos e machos nos diversos grupos experimentais segundo a glicosúria encontrada ao final da infecção (49 dias) e em função do número de cercárias.

Não foi possível avaliar estatisticamente o efeito da glicosúria sobre os vermes fêmeos em função do baixo número de vermes fêmeos obtidos em cada grupo experimental. De maneira geral, ficou constatado nítida tendência de redução de tamanho dos vermes fêmeos em função do aumento da glicosúria (**Tabela 5**).

Vermes fêmeos sofreram redução do comprimento desde o início do diabetes, fato que não ocorreu em vermes machos (% redução igual a zero) (**Figura 18**).

5.15.3. VERMES MACHOS

Da mesma forma, foi realizada a análise estatística pelo teste de Tukey dos comprimentos dos vermes machos adultos do *S. mansoni* considerando grupos de camundongos machos e fêmeos diabéticos e não diabéticos, conforme ilustra a **Figura 15** e detalhados no apêndice B.

O estado diabético revelou-se importante porque foi significativa a diferença entre os resultados dos grupos FND x FD e MND x MD. O sexo do hospedeiro foi relevante nos resultados significativos entre os grupos pareados FND x MD e FD x MND.

Não foi considerado comparável o resultado dos grupos FND x MD porque os hospedeiros são fisiologicamente distintos e o resultado significativo deste grupo foi excluído. O mesmo ocorreu com os resultados significativos entre MND x FD.

O resultado indica que, em relação ao diabetes, vermes machos diferiram no seu desenvolvimento, em ambos os sexos de hospedeiros:

FND x FD e MND x MD. Houve influência do diabetes sobre o comprimento dos vermes machos, não importando o sexo do hospedeiro, com redução do respectivo tamanho nos grupos MD e FD.

O efeito da Prenhez em fêmeas diabéticas sobre o desenvolvimento dos vermes machos: os resultados sugerem que neste grupo foram mantidas as medidas dos vermes machos em patamares similares aos da FND, sugerindo que durante a prenhez, o diabetes não afetou o desenvolvimento dos vermes machos, assim como o de vermes fêmeos, ao contrário do que ocorreu nos grupos diabéticos, onde houve redução dos comprimentos dos helmintos. Entretanto, houve grande dispersão nas medidas de vermes machos e fêmeos encontrados em hospedeiro FDP (**Figuras 14 e 15**).

5.15.4.EFEITO DA GLICOSÚRIA SOBRE O COMPRIMENTO DE VERMES MACHOS

Outra análise que foi possível estabelecer estatisticamente foi o efeito do grau de glicosúria do hospedeiro sobre o tamanho de vermes machos. Os resultados mostrados na **Figura 16** ilustram o comprimento dos vermes machos em fêmeas diabéticas, segundo as glicosúrias de 100, 250 e 1000 mg glicose/dL urina. Houve redução no comprimento dos vermes segundo a glicosúria, sendo que a variabilidade das medidas decresceu em glicosúria mais alta. Os valores de comprimento de VM em FD para glicosúria 100 mg glicose/dL urina mostraram que nesta faixa de diabetes inicial, os vermes machos se comportaram como se estivessem num ambiente não diabético, sendo portanto medidas comparáveis à fêmea não diabética. A redução no comprimento já se acentuou a partir de glicosúria de 250 mg glicose/dL urina.

Podemos observar que houve redução de tamanho dos vermes, diretamente proporcional ao aumento da glicosúria. Desta forma, com glicosúria 1000 mg glicose/dL urina, a redução no comprimento de vermes machos em fêmeas diabéticas chegou a 24% (**Figura 16**) enquanto que não existiu redução de tamanho quando o diabetes estava no início (**Figura 18**).

Em relação ao hospedeiro macho diabético com 2000 mg glicose/dL urina, a redução no tamanho dos vermes chegou a 10,5% (**Figura 17 e 18**), sendo portanto inferior à redução na fêmea diabética com glicosúria de 1000 mg glicose/dL urina (**Figura 16**).

A **Figura 17** ilustra os comprimentos dos vermes machos em machos diabéticos, segundo a glicosúria 100 e 2000 mg glicose/dL urina, ou seja, glicosúrias mínima e máxima. Os resultados mostraram que o comprimento dos VM em MD foram superiores aos comprimentos dos VM

em FD, em diabetes inicial e diabetes grave. As **Figuras 16 e 17** também nos mostram que, comparativamente aos VM em FD, os comprimentos dos vermes em MD à glicosúria 2000 mg glicose/dL urina, foram superiores aos comprimentos em fêmeas diabéticas, à glicosúria menor, como mostrado em 1000 mg glicose/dL urina.

É importante ressaltar que vermes machos apresentaram maior redução de tamanho quando se desenvolveram em hospedeiro fêmeo diabético (**Figura 18 e Tabela 5**).

TABELA 4

Média de comprimento de vermes machos (VM) e fêmeos (VF) na sétima semana de infecção pelo *Schistosoma mansoni* em camundongos NOD Fêmeos e Machos, Diabéticos, Não Diabéticos e Fêmea Diabética Prenhe, em função da glicosúria e número de cercárias.

Grupos *	FNDI	FNDI	MNDI	FDI (± 100)	FDI (250)	FDI (1000)	FDPI (1000)	MDI (± 100)	MDI (2000)
<i>S. mansoni</i>									
Número de cercárias	50	10	50	50	10	50	10	10	50
VM Comprimento médio (mm) $\pm$ SD	5,18 $\pm$ 1,18	-	5,31 $\pm$ 1,37	5,21 $\pm$ 1,5	4,00 $\pm$ 1,3	3,94 $\pm$ 0,7	5,24 $\pm$ 1,7	5,63 $\pm$ 0,9	4,75 $\pm$ 0,4
Número de VM	127	-	274	19	5	34	9	30	10
VF Comprimento médio (mm) $\pm$ SD	6,45 $\pm$ 1,6	6,45 $\pm$ 1,2	5,18 $\pm$ 1,4	6,09 $\pm$ 0,9	5,0 $\pm$ 1,1	-	5,93 $\pm$ 1,3	4,97 $\pm$ 1,2	3,6 $\pm$ 0,6
Número de VF	38	13	88	12	5	-	11	40	5

alores são a média $\pm$ SD

* Glicosúria : (mg glicose/dL urina)

Abreviaturas : V= verme ; F= Fêmea ; M = Machos ; D- Diabético ; N- não ; P- prenhe ;

Tabela 5 - Porcentagem de Redução de comprimento de vermes machos e vermes fêmeos em relação aos grupos controles não diabéticos (MNDI, FNDI), segundo a glicosúria.

Grupos	VM % redução	VF % redução
FD ±100	zero	5,58
FD 250	22,77	22,48
FD 1000	23,93	ND
FDP 1000	zero	8,05
MD ± 100	zero	4,05
MD 2000	10,55	30,50

ND – não determinado

Figura 1 - Idade (semanas) de camundongos NOD/Uni machos e fêmeas no início da expressão do diabetes (≥ 100 mg glicose/dL urina) no primeiro ano do experimento

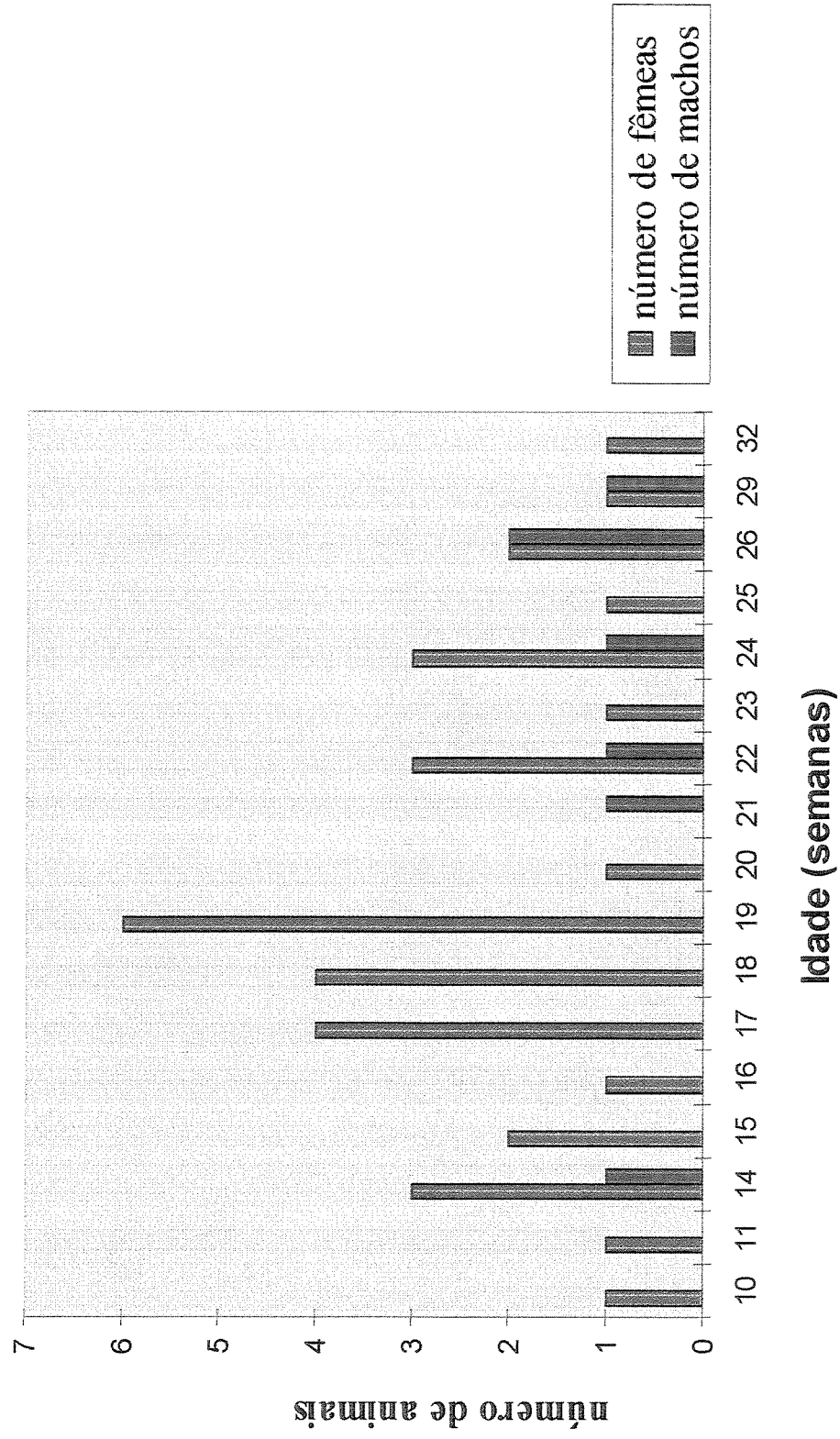


Figura 2 - Idade (semanas) de camundongos NOD/Uni machos e fêmeas no início da expressão do diabetes (≥ 100 mg glicose/dL urina) no segundo ano do experimento

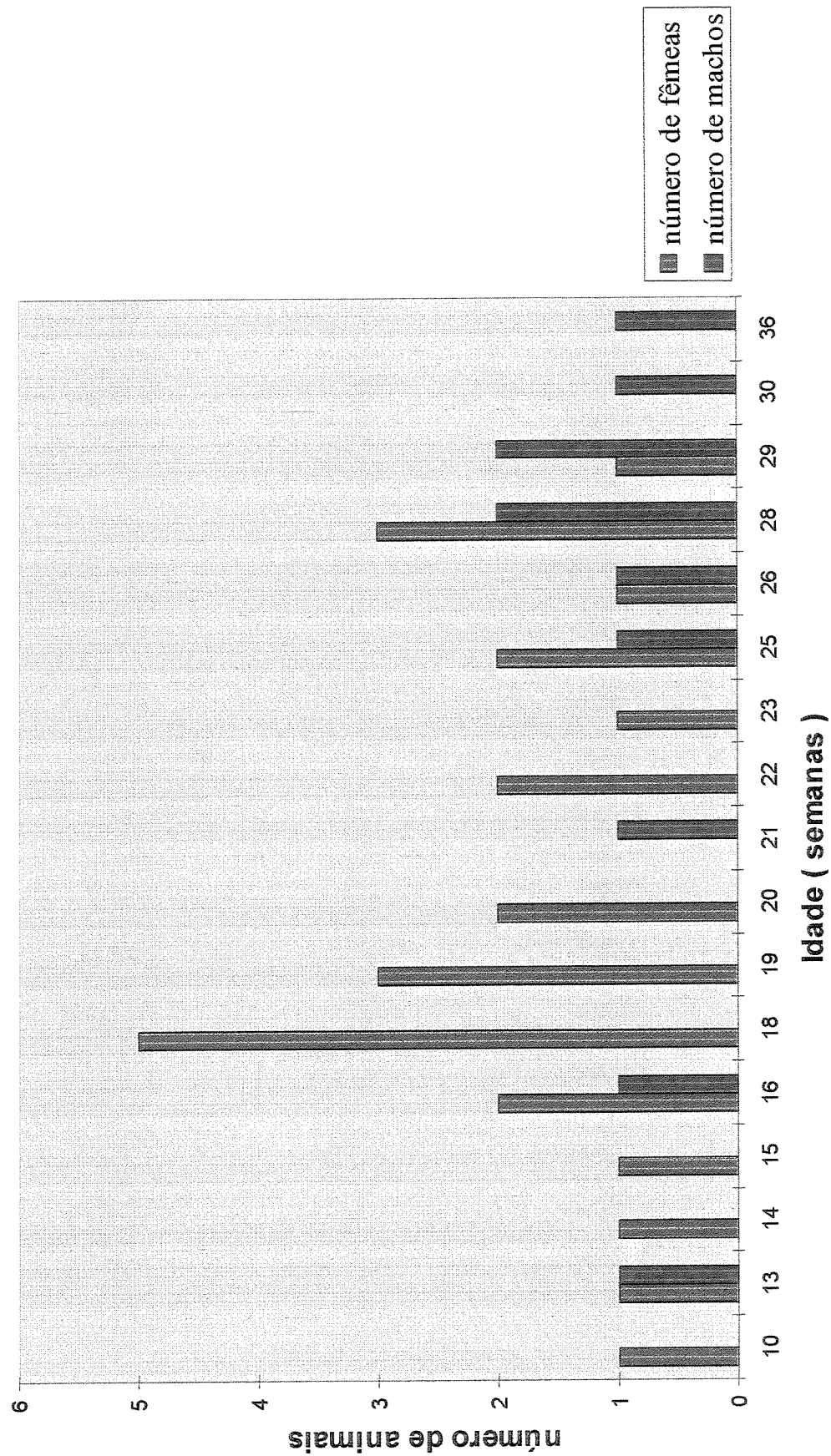


Figura 3 - Sobrevida de fêmeas diabéticas não infectadas (FDNI) após a expressão do diabetes

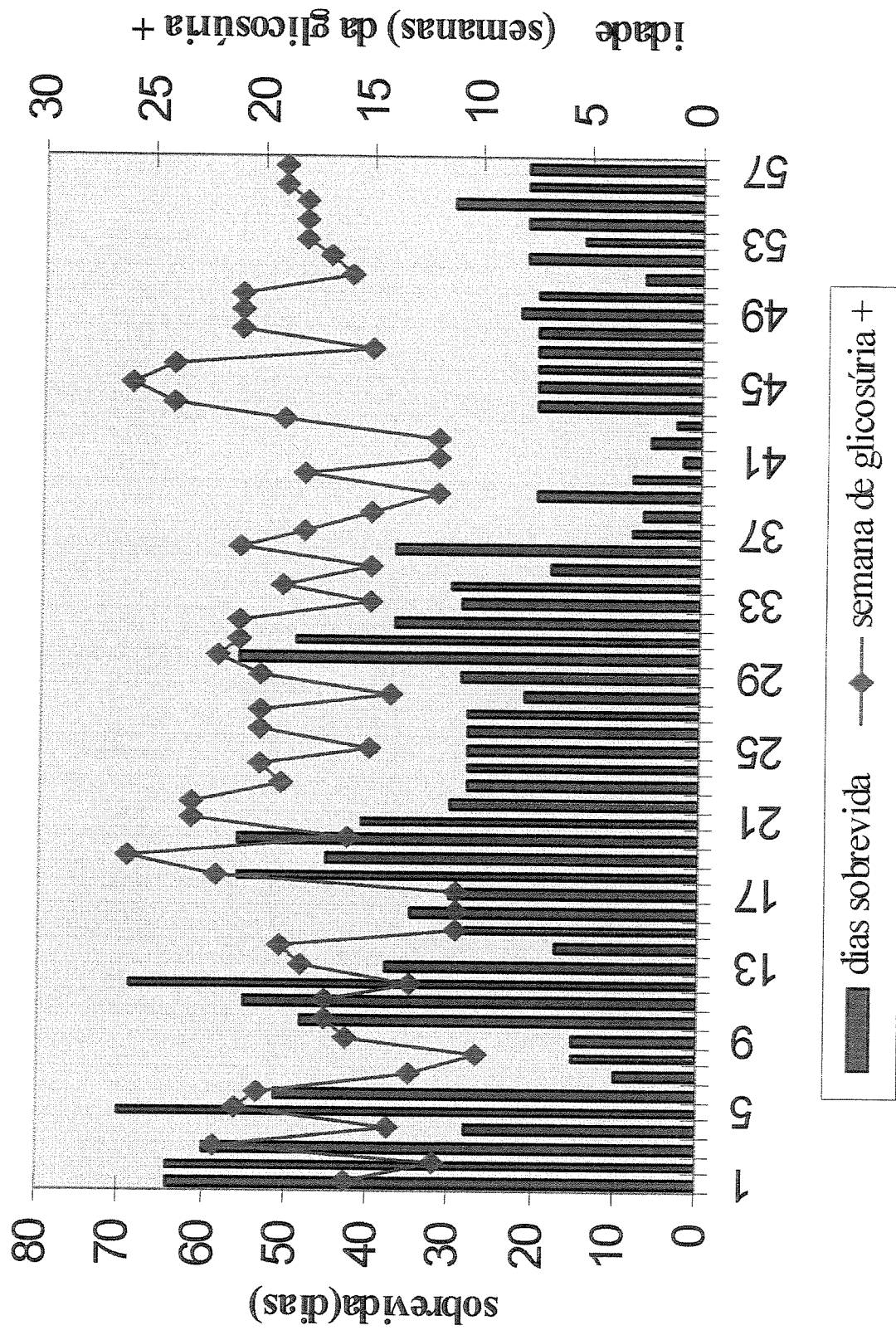


Figura 4 – Sobrevida de machos diabéticos não infectados após a expressão do diabetes

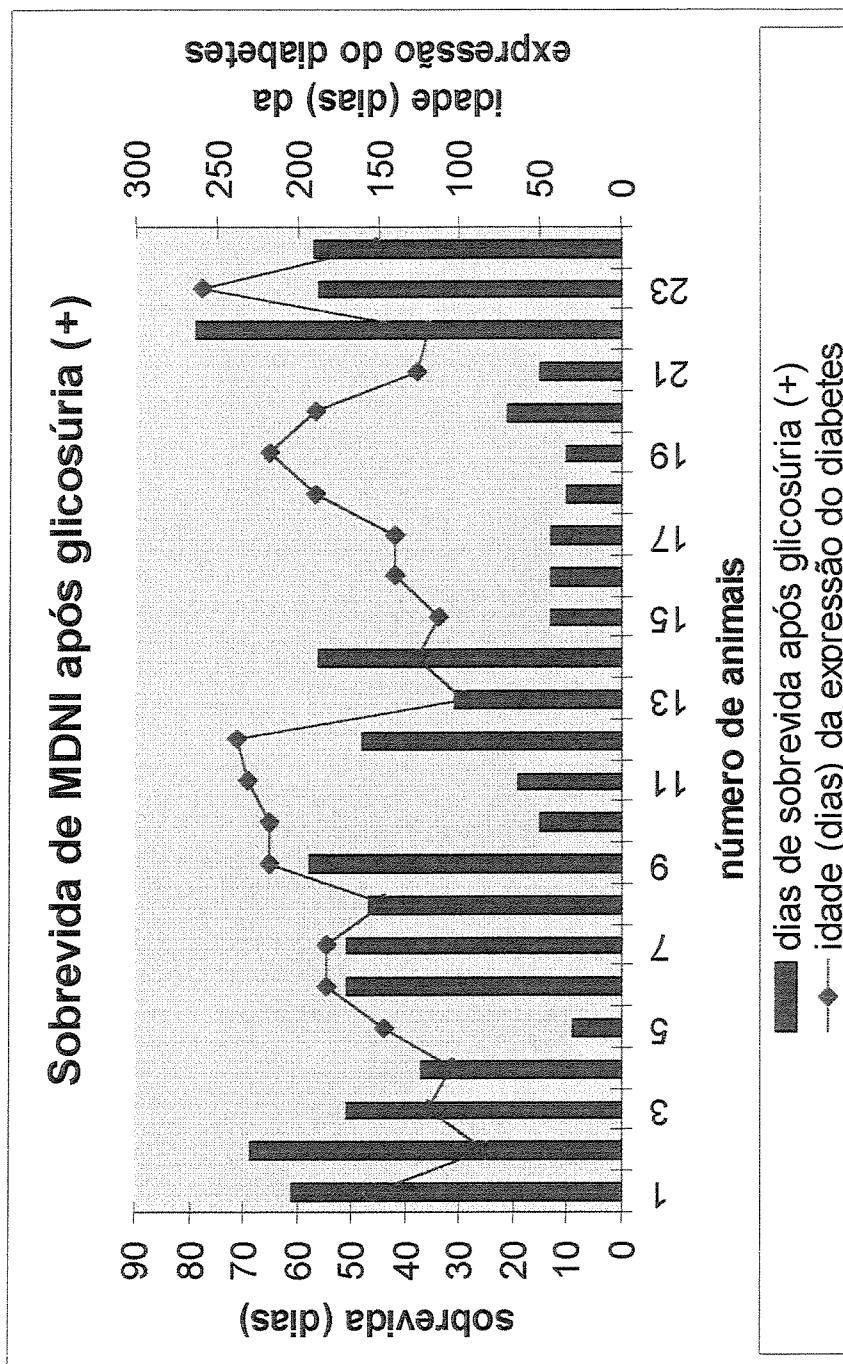


Figura 5 - Média de sobrevivência (%) de fêmeas NOD/Uni infectadas com 10 cercárias de *S. mansoni* comparado com o grupo controle não infectado após a expressão do diabetes.

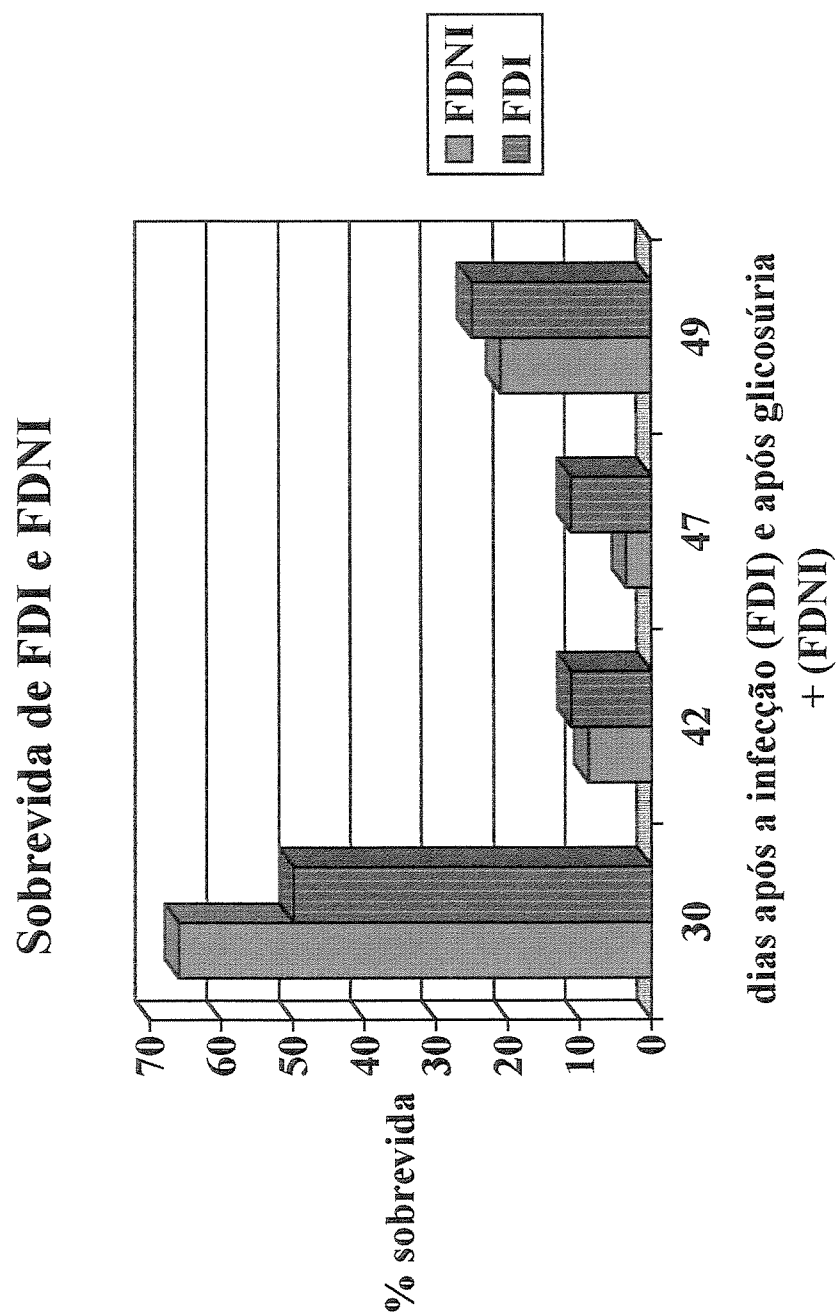


Figura 6 - Média de sobrevida (%) de machos NOD/Uni infectados com 10, 25 ou 50 cercárias de *S. mansoni* comparado com o grupo controle não infectado após a expressão do diabetes.

Sobrevida de MDI e MDNI

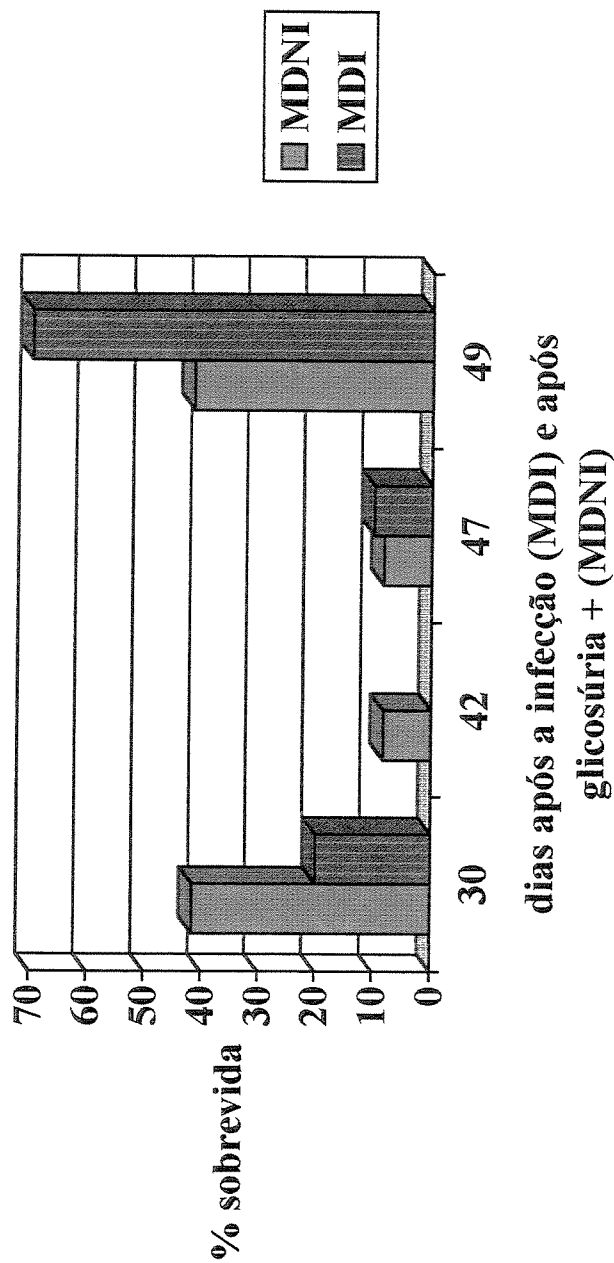


Figura 7 – Pesos médios de pâncreas (g) em MNDI/FNDI (glicosúria 0) e MNDI/FDI de acordo com as glicosúrias ao final da infecção, com 10, 25 ou 50 cercárias

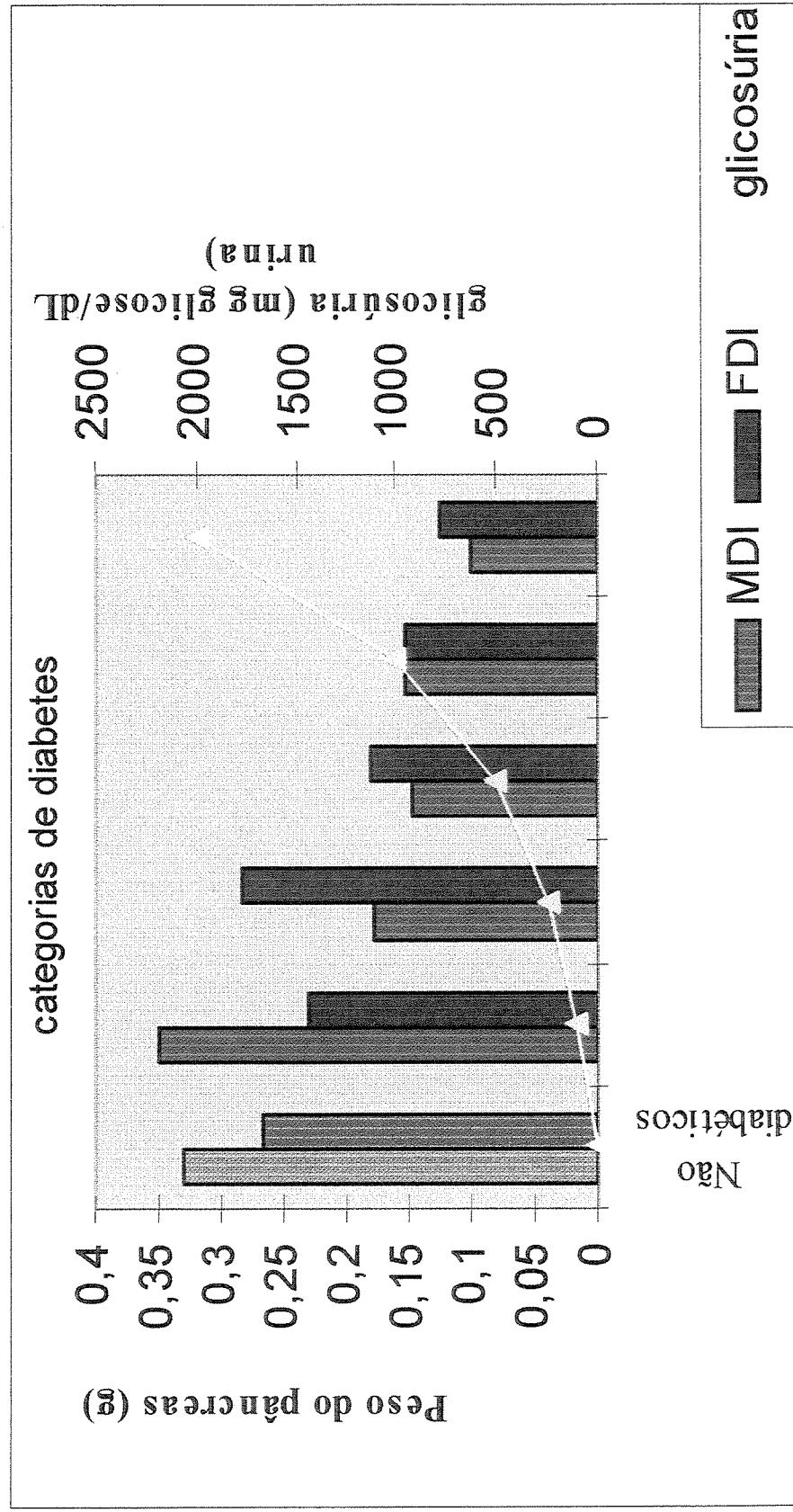


Figura 8
HEPATOMEGALIA MÉDIA EM CAMUNDONGOS NOD MACHOS DIABÉTICOS E NÃO DIABÉTICOS , CONTROLE E INFECTADOS PELO *Schistosoma mansoni* EM FUNÇÃO DO NÚMERO DE CERCÁRIAS E DAS CATEGORIAS DO DIABETES.

M- Macho; N- Não; D- Diabético; I- Infectado ; Pf- peso fígado; Pc- peso corporal

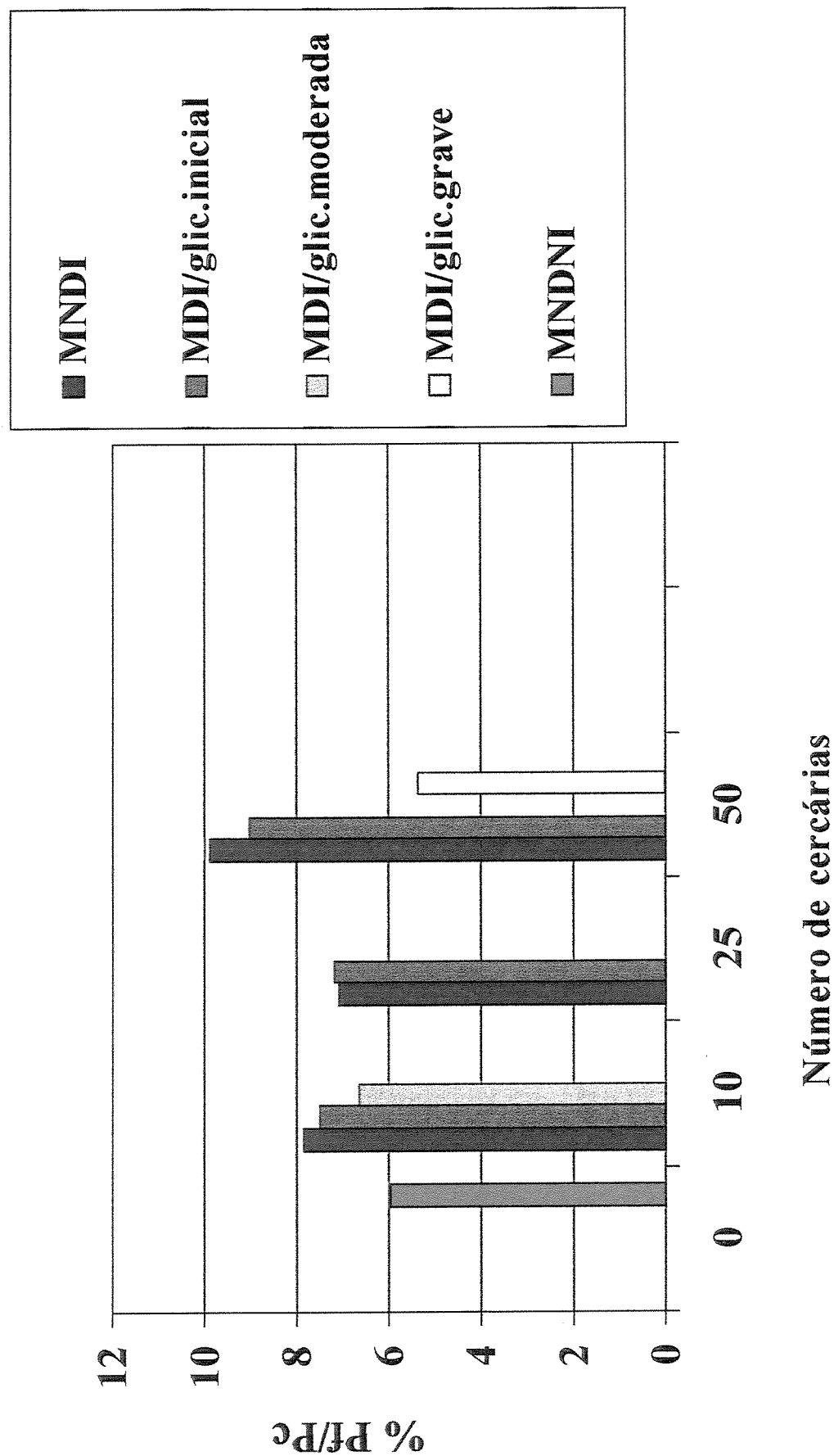
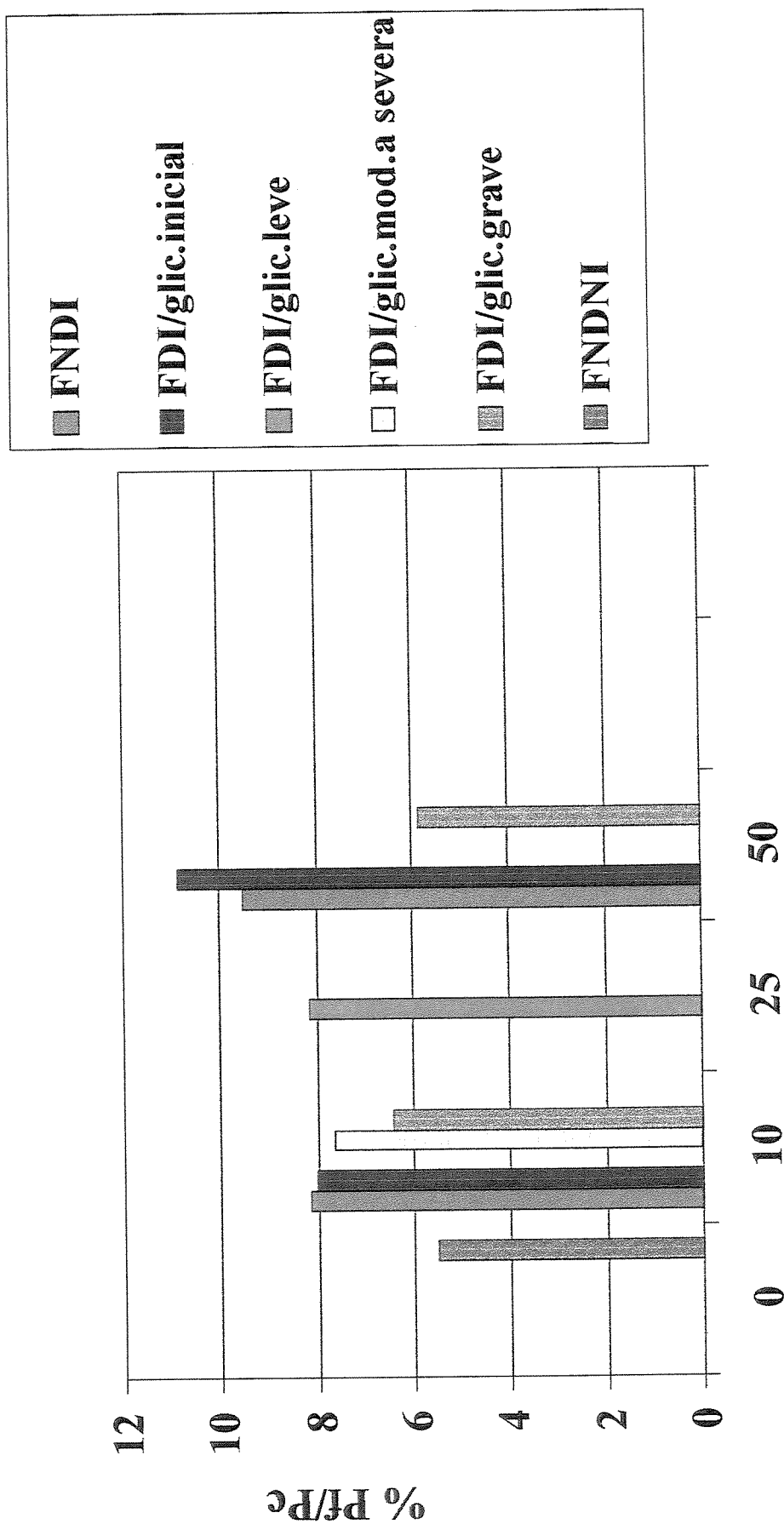


Figura 9
HEPATOMEGALIA MÉDIA EM CAMUNDONGOS NOD FÊMEOS DIABÉTICOS E NÃO DIABÉTICOS , CONTROLE E INFECTADOS PELO *Schistosoma mansoni* EM FUNÇÃO DO NÚMERO DE CERCÁRIAS E DAS CATEGORIAS DO DIABETES.

F- Fêmea; N- Não; D- Diabética; I- Infectada ; Pf- peso fígado; Pc- peso corporal



Número de cercárias

Figura 10
Diagrama de caixa (Box-Plot) da área dos granulomas hepáticos em camundongos NOD/Uni machos diabéticos e não diabéticos, em função da glicosúria .

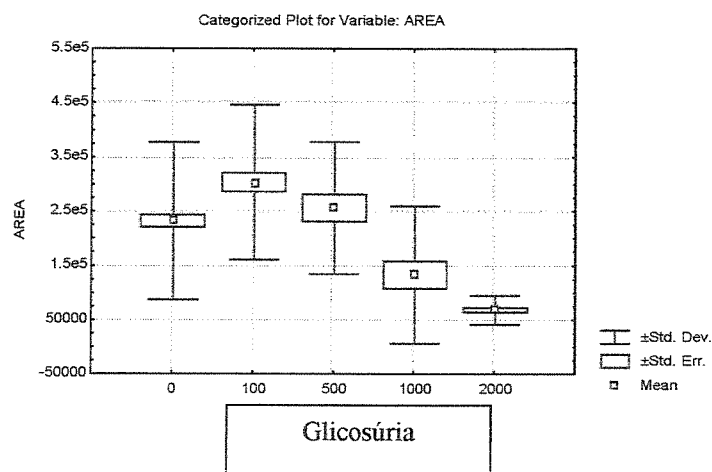


Figura 11
Diagrama de caixa (Box-Plot) da área dos granulomas hepáticos em camundongos NOD/Uni fêmeas diabéticas e não diabéticas, em função da glicosúria .

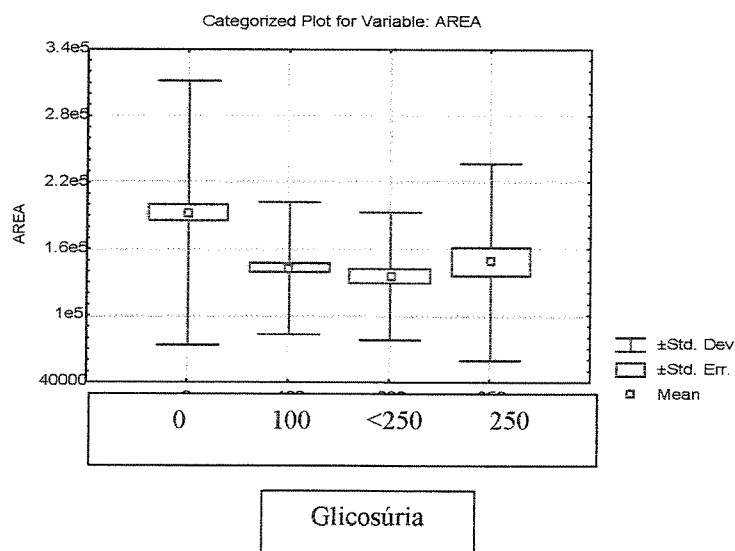


Figura 12
Diagrama de caixa (Box-Plot) da área dos granulomas hepáticos em camundongos NOD/Uni fêmeas não diabéticas e fêmeas diabéticas prenhes em função da glicosúria .

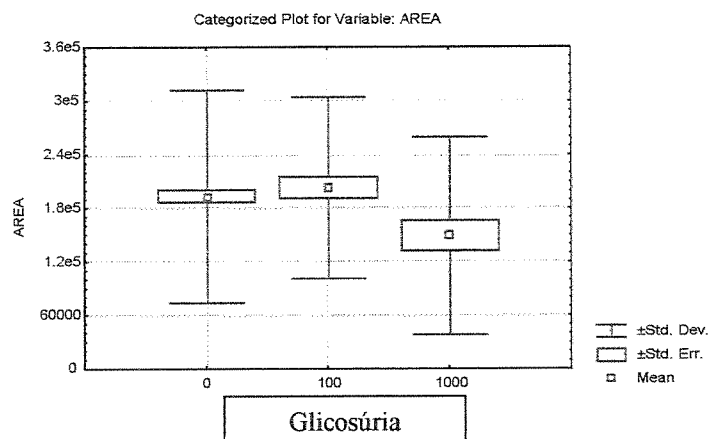
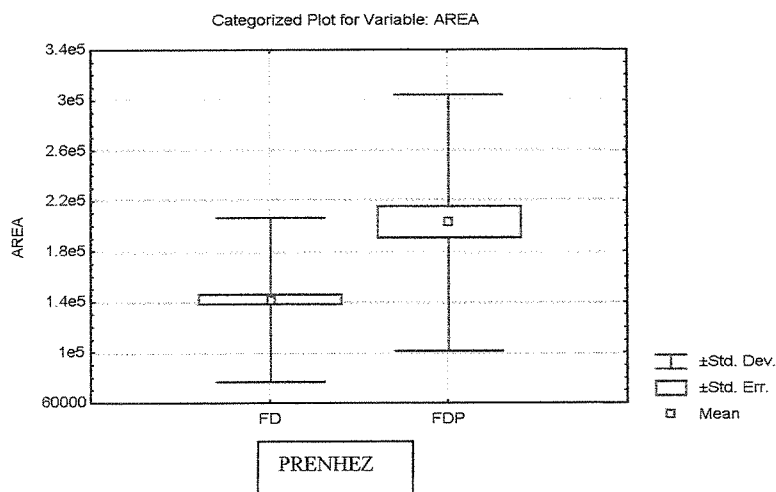


Figura 13
Diagrama de caixa (Box-Plot) da área dos granulomas hepáticos em camundongos NOD/Uni fêmeas diabéticas e fêmeas diabéticas prenhes, em função da glicosúria .



RESULTADO DA ANÁLISE ESTATÍSTICA DE COMPRIMENTO DE VERMES

Figura 14

Diagrama de caixa (Box-plot) para comprimento (mm) de vermes fêmeos do *S. mansoni* em camundongos NOD/Uni fêmeos e machos diabéticos e não diabéticos e fêmeas diabéticas prenhes.

Abreviaturas : F-Fêmea; M- Macho; N- Não; D- Diabético; P- Prenhe

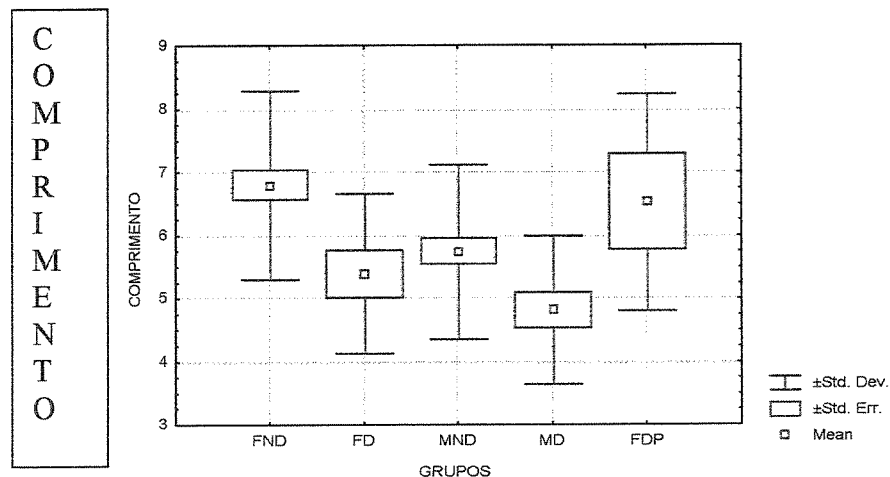


Figura 15

Diagrama de caixa (Box-plot) para comprimento de vermes machos do *S. mansoni* em camundongos NOD/Uni fêmeos e machos diabéticos e não diabéticos e fêmeas diabéticas prenhes. F-Fêmea; M- Macho; N- Não; D- Diabético; P- Prenhe

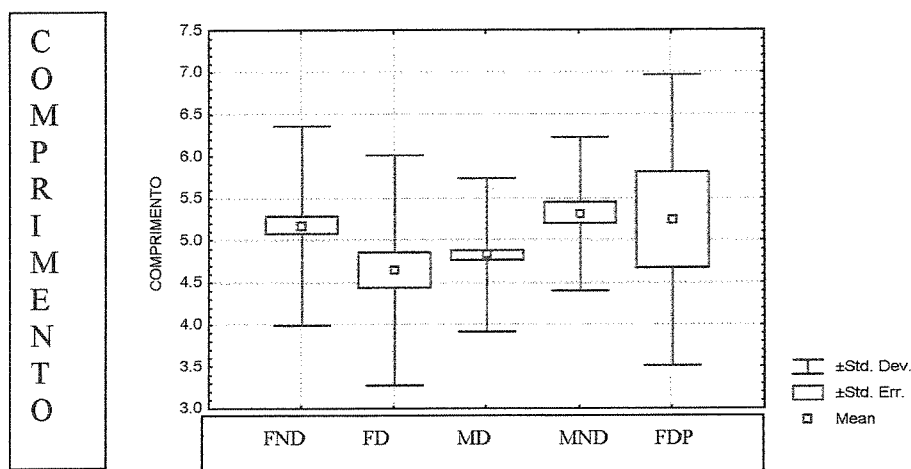


Figura 16

Diagrama de caixa (Box-plot) para comprimento (mm) de vermes machos do *S. mansoni* em camundongos NOD/Uni fêmeos diabéticos com glicosúria de 100, 250 e 1000 mg glicose/dL.

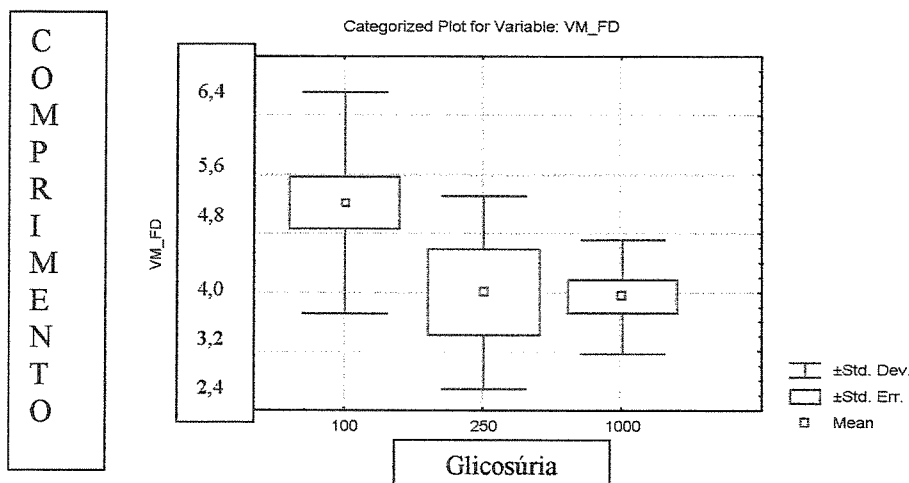
**Figura 17**

Diagrama de caixa (Box-plot) para comprimento de vermes machos do *S. mansoni* em camundongos NOD/Uni machos diabéticos com glicosúria de 100 e 2000 mg glicose/dL

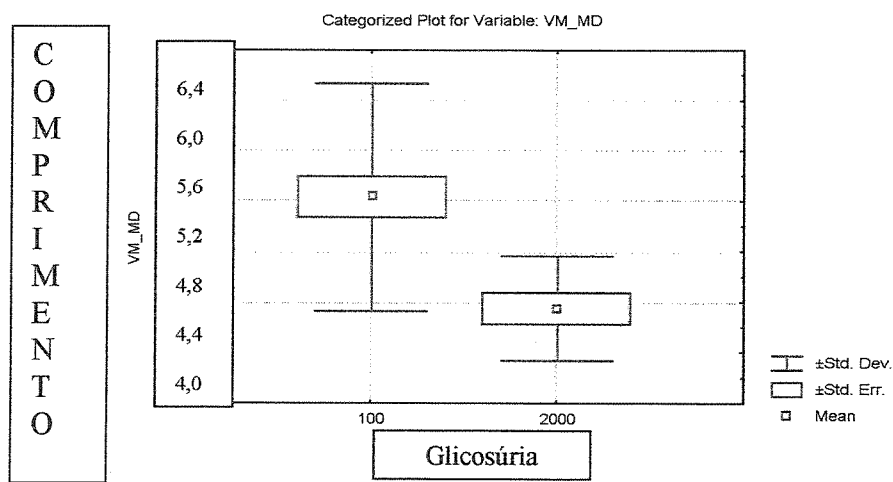
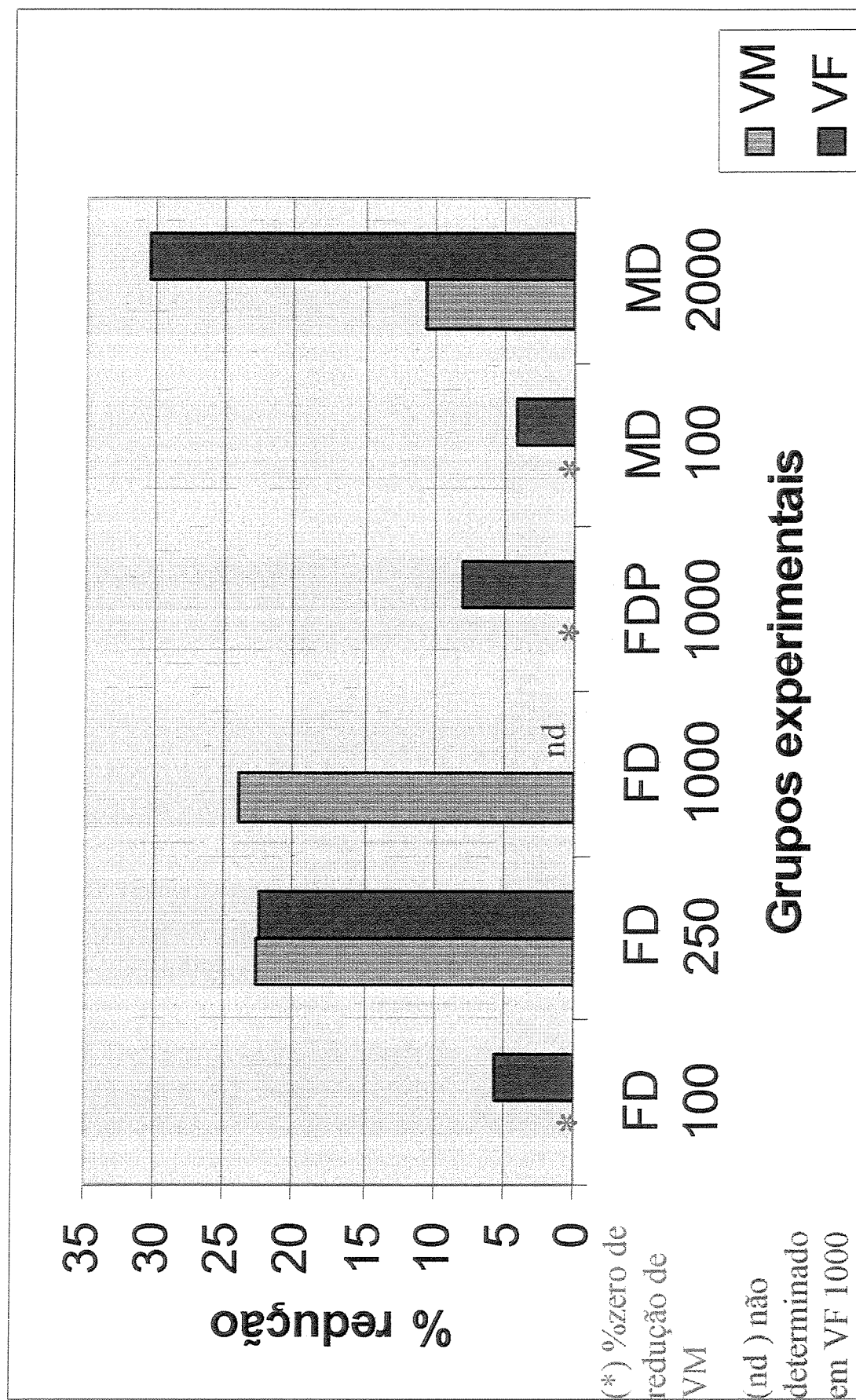


Figura 18 - PORCENTAGEM DE REDUÇÃO DO COMPRIMENTO DE VERMES MACHOS (VM) E VERMES FÊMEOS (VF) NOS GRUPOS DIABÉTICOS INFECTADOS PELO *S. mansoni*, EM FUNÇÃO DA GLICOSÚRIA (mg glicose/dL urina)



6. DISCUSSÃO

6.1. Aspectos do hospedeiro

No presente estudo, a expressão do diabetes na colônia de camundongo NOD/Uni ocorreu entre 11 e 29 semanas para fêmeas e entre 13 e 30 semanas para machos. Este resultado está de acordo com Leiter *et al.* (1987).

O ambiente controlado onde são criados os animais SPF (Specific Pathogen Free) possibilitou a proteção da colônia no que diz respeito a incidência do diabetes. Segundo Oldstone (1988), a incidência do diabetes aumenta em animais criados e mantidos em condições “germ-free”. Infecções virais estão associadas ao decréscimo na incidência de diabetes. Os animais sob experimentação mostraram-se livres de patógenos específicos, certificados pelos resultados do monitoramento da Seção de controle de qualidade sanitária do CEMIB. A realização dos experimentos em ambiente protegido, adotando-se isoladores, foi imprescindível para garantir a ausência de infecções concomitantes.

Recentes observações revelam a influência de agentes microbianos protetores contra o desenvolvimento do diabetes, tais como, o MHV-3 (Wilberz *et al.*, 1991), vírus da encefalomiocardite (Hermitte *et al.*, 1990), vírus da lactato desidrogenase (Takei *et al.*, 1992) e outros agentes microbianos que também atuam de forma protetora contra o desenvolvimento do diabetes no camundongo NOD como o extrato de *Streptococcus* (Toyota *et al.*, 1986) preparações de *Mycobacterium tuberculosis* (Qin *et al.*, 1993) e o BCG (Harada *et al.*, 1990).

Camundongos infectados com *S.mansoni* e co-infectados com o vírus da hepatite murina, MHV-3, apresentaram destruição do parênquima hepático e alta mortalidade (Warren *et al.*, 1969). No Brasil, um levantamento sorológico em várias Instituições de ensino e pesquisa demonstrou que o MHV-3 foi o vírus mais frequentemente detectado nas colônias de camundongos investigadas (Gilioli *et al.*, 1996) que, no entanto, não está presente nas colônias do CEMIB.

É esperado que a esquistossomose induza severa pancreatite em camundongos Swiss machos e fêmeas após 90 a 100 dias da infecção com 70 cercárias (Lenzi *et al.*, 1989). Nossos resultados revelaram que as fêmeas NOD/Uni infectadas com 10 cercárias de *S. mansoni* desenvolveram pancreatite severa aos 42 dias de infecção. A pancreatite não foi constatada em machos diabéticos infectados com 10, 25 ou 50 cercárias, mesmo na vigência do diabetes grave, até 49 dias de infecção. Entretanto, houve o

acompanhamento de um único camundongo macho com diabetes inicial (± 100 mg/dL glicose na urina), que desenvolveu pancreatite, aos 56 dias de infecção por 50 cercárias, porém com quadro mais brando do que o da pancreatite observada em fêmeas diabéticas aos 42 dias de infecção. Este fato sugere que a associação da esquistossomose e o diabetes no modelo NOD fêmea agrava o comprometimento pancreático e indica que a pancreatite ocorre precocemente na fêmea infectada. É importante relatar que foi constatada ausência de pancreatite na totalidade dos camundongos não infectados, de ambos os sexos, diabéticos e não diabéticos.

Infecções parasitárias humanas clássicas que podem induzir a pancreatite são a ascaridíase e clonorquíase.

A pancreatite pode ter sido a causa principal da mortalidade nas fêmeas diabéticas, o que viabilizou apenas os resultados do grupo de fêmeas diabéticas infectadas com 10 cercárias. As fêmeas diabéticas submetidas a 25 ou 50 cercárias apresentaram alta mortalidade principalmente na 6ª semana de infecção, o que reforça a hipótese da indução da pancreatite após o início da oviposição do *S. mansoni*.

Em 1993, Leiter descreveu que em condições SPF os camundongos sobrevivem 3 a 4 semanas depois da primeira detecção da glicosúria.

De modo geral, nas infecções causadas por helmintos, a patogenicidade está diretamente relacionada com a carga parasitária e sexo do hospedeiro. Contrariando o que acontece na maioria das combinações hospedeiro-parasita, na infecção pelo *S. mansoni*, a exposição de várias linhagens de camundongos machos e fêmeos ao mesmo número de cercárias, resulta em maior recuperação de vermes, um quadro clínico mais grave e maior mortalidade em fêmeas do que em machos (Eloi-Santos *et al.*, 1992). Estes autores analisando a mortalidade de camundongos CBA/J machos e fêmeos infectados com 45 cercárias de *S. mansoni* constataram maior mortalidade em camundongos fêmeos (80%) comparada aos machos (20%), com 12 semanas de infecção. Nossos resultados são concordantes porque a sobrevida das fêmeas diabéticas infectadas pelo *S. mansoni* foi menor do que a de machos diabéticos (**Figuras 5 e 6**). A carga parasitária teve importância principalmente em relação à sobrevida, em fêmeas diabéticas porque este grupo suportou a infecção com apenas 10 cercárias.

A sobrevida dos animais não diabéticos foi considerada independentemente do número de cercárias adotadas porque a experiência de laboratório com a linhagem BH do *S. mansoni* comprova que nenhum animal infectado com 100 cercárias morre até a 7ª semana de infecção. O início da mortalidade ocorre após 56 dias de infecção (Guaraldo, 1987).

Em relação a valores bioquímicos que diferem machos de fêmeas NOD, ressalta-se que a cetonúria ocorre somente em camundongos NOD fêmeas diabéticos (Makino *et al.*, 1980). Sendo a cetoacidose ausente em machos diabéticos, em qualquer idade, estes ficam protegidos da gravidade da doença, o que pode explicar a alta sobrevivência dos machos diabéticos infectados (**Figura 6**), aliada ao efeito protetor dos hormônios masculinos (Makino *et al.*, 1981) e a ausência de pancreatite, aos 49 dias de infecção.

Co-infecção associada ao *S. mansoni* foi avaliada por Sabin *et al.* (1996), em que indivíduos infectados pelo parasita e vacinados com toxóide tetânico montaram uma resposta imune alterada, de Th1 para Th2, mostrando que a infecção helmíntica pode afetar a resposta imune a antígenos de vacina ou organismos coinfectados.

Outro exemplo de resposta alterada na produção de citocinas Th2 no organismo coinfectado foi relatada em pacientes com esquistossomose (Th2) e coinfectados com o vírus da imunodeficiência HIV-1 (Th1). Os indivíduos com infecção concomitante apresentaram menores níveis de citocinas tipo 2, comparativamente aos que apresentavam apenas a esquistossomose (Mwinzi *et al.*, 2001).

Em estudo experimental, (Yoshida *et al.*, 2000), constataram que camundongos infectados com malária e coinfectados pelo *S. mansoni*, escaparam da morte, pelo desenvolvimento de resposta imune alterada, de Th2 para Th1.

Camundongos infectados pelo *S. mansoni* e *Trichuris muris*, adquiriram a habilidade de expelir completamente o verme de *T. muris* gerando respostas imunes protetoras e subregulando as respostas não protetoras Th-1 (Curry *et al.*, 1995), influenciando o desenvolvimento de uma infecção parasitária concorrente. Outras respostas alteradas durante a infecção pelo *S. mansoni* e infecção viral pelo vírus da vaccínia atestam atraso na eliminação do vírus (Actor *et al.*, 1993).

Camundongos CBA/Ca tratados pela ciclofosfamida e submetidos à timectomia antes de receber injeção de ovos de *S. mansoni* exibiram severa mortalidade na fase aguda da infecção, que foi associada às elevadas quantidades de citocinas tipo 1 e diminuição de citocinas tipo 2, com prejuízo para o hospedeiro (Fallon & Dunne, 1999). Alta mortalidade em camundongos imunizados com SEA (antígeno solúvel do ovo) em adjuvante completo de Freund foi observada por Rutitzky *et al.* (2001), descrevendo aumento da patologia e correlacionando-a a uma tendência na produção de citocinas do tipo Th1.

Entretanto em estudos envolvendo camundongos diabéticos, a interpretação da patologia tem enfoque distinto dos autores acima. Segundo

Pakala *et al.* (1997), lesões provocadas no pâncreas de animais NOD diabéticos, possivelmente fêmeas, são distintas quando provocadas por células Th1 ou Th2. As lesões Th1 mostram padrão de peri-insulite que é o estágio inicial da insulite e é caracterizada pelo acúmulo de células mononucleares na periferia ou ao redor das ilhotas ainda intactas, e a insulite com pouca inflamação exócrina e dano, enquanto que a lesão tipo Th2 mostra pancreatite com grande número de células do infiltrado inflamatório e infiltração tanto do tecido endócrino quanto do tecido exócrino.

À luz destas evidências podemos interpretar que as **Fotomicrografias M4 a M6** representam a evolução da pancreatite em camundongos fêmeas diabéticos infectados. Não foi observada qualquer ilhota íntegra ou semi-destruída nesta etapa da infecção (42 dias) pelo *S. mansoni*. O padrão destrutivo que culminou em pancreatite, constatada nas **Fotomicrografias M5 e M6**, sugere que a resposta Th2 devido a presença de ovos do *S. mansoni* é parcialmente responsável por este processo. Acrescente-se a isto, o fato de que em nenhuma literatura consultada houve a constatação de tal destruição do parênquima pancreático em animais diabéticos não infectados. A pancreatite, ou destruição do pâncreas exócrino, é resultante de processos auto-digestivos, pela ativação intra-acinar de enzimas. Estas enzimas rompem membranas celulares e determinam edema pancreático. Um dos principais fatores que podem induzir esta patologia é a obstrução do ducto pancreático pelos ovos de *S. mansoni*, causando embolização do pâncreas. As células envolvidas na pancreatite são os neutrófilos, basófilos, eosinófilos e mastócitos.

Em relação a lesão do tipo Th1 do diabetes em animal não infectado, a **Fotomicrografia M2** exibe a infiltração típica e confinada ou focal da ilhota, na qual o tecido exócrino adjacente não é afetado. Este padrão de insulite, sem a evolução da pancreatite, repetiu-se em todos os machos infectados, mesmo em glicosúrias graves. A insulite em modelo NOD é caracterizada pela infiltração linfocitária, primeiramente com o acúmulo de células mononucleares ao redor das ilhotas intactas, formando agrupamentos de células T, células B, macrófagos e células dendríticas. Posteriormente a infiltração evolui para o interior da ilhota, culminando no estágio final com a massiva infiltração linfocitária e extensivo dano à célula beta, provocando destruição das células beta e decréscimo dos níveis de insulina.

Em relação às características da insulite, também ocorre diferença entre os sexos, sendo que as fêmeas exibem maior porcentagem de ilhotas de Langerhans com lesões destrutivas.

Cooke *et al.* (1999) consideraram que a infecção com *S. mansoni* reduziu significativamente a incidência espontânea do diabetes tipo 1 (IDDM)

sendo possível prevenir o diabetes tipo 1 apenas pela injeção de ovos. A mesma proteção foi verificada por Maron *et al.* (1998) em camundongos NOD tratados com insulina, com aumento de resposta do tipo Th2. No presente estudo a mesma proteção ao desenvolvimento do diabetes promovida pela infecção com o *S. mansoni* não foi observada, pois seguidamente, durante o experimento, houve casos de animais de ambos os sexos, expressando o diabetes durante a infecção, ou ao final do experimento, sem a detecção prévia de glicosúria positiva. Conseqüentemente, muitos dos nossos animais diabéticos, ao final da infecção, foram infectados 7 semanas antes, no estágio de pré-diabetes.

O indicativo de diabetes, glicose no sangue acima de 12 mmol/L (218 mg/dL glicose) utilizado pelos autores, não foi o mesmo critério estabelecido no presente experimento. Neste caso, a expressão do diabetes é marcada pelo aparecimento de uma glicosúria inicial, ou seja, a primeira leitura da fita colorimétrica, ± 100 mg glicose/dL na urina. Segundo Leiter (1993) a expressão do diabetes em camundongos NOD é marcada pelo aparecimento de glicosúria inicial, a primeira leitura positiva no teste da fita, e pela glicose no plasma maior que 250 m/dL glicose. Indiscutivelmente, em 100% dos casos, os animais evoluíram rapidamente para leituras superiores, a partir da primeira constatação de glicosúria positiva, confirmando, portanto, a expressão do diabetes, o mesmo acontecendo no manejo da colônia de fundação.

A indução da resposta efetora de Th2, como a que ocorre predominantemente na esquistossomose murina, pode piorar a autoimunidade mediada por Th1. Um dos exemplos deste fato está no modelo experimental de encefalomielite auto-imune, em primata-não humano, no qual a imunização com mielina induz uma conversão em direção a uma resposta Th2, atenuando a resposta aguda, mas resulta em expressão tardia de uma desordem desmielinizante letal (Genain *et al.*, 1996).

De maneira similar, nos camundongos NOD inoculados com bacilos inativados de Calmette-Guérin (BCG), que induzem forte resposta com componente Th2, há o bloqueio da destruição pancreática em células beta mediada por Th1, porém desencadeia uma síndrome mediada por Th2, similar ao lúpus eritematoso (SLE) (Baxter *et al.*, 1994).

Células Th1 e Th2 podem mediar o dano tecidual, por meio de reações inflamatórias e quando atuam em conjunto, freqüentemente causam exacerbação da inflamação (Hernandez-Pando & Rook (1994); Lawrence *et al.*, 1998). Sugerimos que a exacerbação da autoimunidade mediada por Th1 e Th2, seja o mecanismo envolvido na pancreatite de fêmeas em estado

avanzado de diabetes, infectadas (**Fotomicrografias M5 e M6**), mas sem a reação granulomatosa.

As respostas tipo 1 na infecção pelo *S. mansoni* ocorrem precocemente, durante as 4-5 primeiras semanas de infecção estimuladas pelos estágios larvais com a produção de citocinas IFN- γ e IL-2 (Grzych *et al.*, 1991; Pearce *et al.*, 1991). Estas respostas são substituídas posteriormente por respostas do tipo 2, coincidente com a produção de ovos (Grzych *et al.*, 1991). A resposta de citocinas tipo Th2 atinge um pico em 8 semanas após a infecção e subregula a secreção de citocinas tipo Th1 que alcançou o pico poucas semanas antes.

A cinética na produção de citocinas pela infecção esquistossomótica foi avaliada por Fallon *et al.* (1998) e Hassan *et al.* (2000). Segundo Fallon *et al.* 1998 no início do estágio pré-patente da infecção, aos 28 dias, somente houve a produção de citocinas tipo 1 (IFN- γ e IL-2). No segundo estágio, aos 49 dias pós infecção, houve elevada produção de citocinas tipo 2 comparada ao dia 28, mais precisamente, IL-4 e IL-5 e diminuição de IFN- γ e particularmente, de IL-2. Segundo Hassan *et al.*, (2000), os níveis de citocinas em ensaio de ELISA mostraram que a mudança na produção de citocinas de Th1 para Th2 ocorreu 6 semanas após a infecção.

O desenvolvimento de diferentes respostas polarizadas pode, a depender das circunstâncias, conduzir a um aumento de sobrevida nos animais diabéticos, como ocorreu com os machos diabéticos infectados. Foi possível observar o efeito protetor da esquistossomose a partir da oviposição (42 dias) e aumento da sobrevida nestes animais (**Figuras 5 e 6**).

O desenvolvimento de fenótipos de produção de citocinas extremos, Th1, Th2 ou ambos (Th1/Th2), é altamente prejudicial na infecção esquistossomótica podendo contribuir para a morbidade durante a infecção. Em camundongos, estudos mostram que a extrema polarização imune tanto para Th1 quanto para Th2 é potencialmente prejudicial (Fallon *et al.*, 2000; Hoffman *et al.*, 2000). O uso de camundongos deficientes em IL-4, IL-13 ou ambas foi determinante para Fallon *et al.* decifram os efeitos das respectivas citocinas na oitava semana de infecção com 100 cercárias. Houve a comprovação da necessidade de IL-4 e IL-13 para desenvolver forte reação Th2. Animais deficientes em IL-13 tiveram maior sobrevida, relacionada com reduzida fibrose hepática. O aumento da mortalidade em camundongos deficientes em IL-4 ou IL-4/13 foi correlacionado com patologia intestinal e dano em hepatócitos. A citocina protetora IL-4 beneficia a sobrevida do animal e em sua ausência, a resposta de citocinas é convertida para o fenótipo do tipo 1, o que acarreta o dano hepático, fibrose, endotoxemia e patologia intestinal por falha na excreção dos ovos. Hoffmann *et al.* (2000) mostraram

que camundongos deficientes em IL-10/IL-12, com respostas polarizadas para Th1 e infectados pelo *S. mansoni*, tiveram 100% de mortalidade em 9 semanas de infecção.

No presente estudo verificamos que a maioria das mortes em fêmeas diabéticas infectadas com 10 cercárias com glicosúria ≥ 1000 mg glicose/dL urina ocorreu entre 42 e 47 dias após a infecção (**Figura 5**), apresentando o quadro de pancreatite. Segundo a cinética da produção de citocinas verificada por Pearce *et al.* (1991), é alta a produção de citocinas do tipo 1 entre os dias 28 e 35. Uma semana depois, aos 42 dias, já há a produção de citocinas do tipo 2, culminando aos 49 dias. Nossos resultados em relação às mortes de fêmeas diabéticas com glicosúrias elevadas ao redor de 42 dias após a infecção sugere-nos que o quadro de pancreatite, a perda progressiva de peso, a resposta inflamatória generalizada no pâncreas pela pancreatite e insulite, a hipofunção do órgão aliada à infecção esquistossomótica e ao diabetes, resultam do desequilíbrio no balanço Th1/Th2.

O aumento de citocinas Th1 no período inicial da esquistossomose, acrescido do efeito da resposta Th1 provocada pelo diabetes, acentuada nos animais com diabetes avançada, ou em curso adiantado do diabetes, pode promover um aumento de mortalidade nos animais infectados. Deste modo, fêmeas infectadas já diabéticas e em estágio avançado do diabetes, aproximadamente na sexta semana de infecção, não tiveram a sobrevida aumentada. Em fêmeas diabéticas infectadas, a sobrevida alcançada é surpreendente quando analisado o número de animais não infectados que ultrapassam 30 dias após a expressão do diabetes, ilustrado na **Figura 3**.

Nossos resultados evidenciam que o tamanho do granuloma está relacionado com o grau de glicosúria. Animais no início do diabetes e normoglicêmicos apresentam o mesmo padrão de formação do granuloma (**Fotomicrografias M10 e M11**). Fêmeas diabéticas prenhes desenvolvem granulomas hepáticos comparáveis ao controle não diabético. A área do granuloma em fêmeas diabéticas prenhes, glicosúria 1000 mg glicose/dL urina, foi a mesma da fêmea com diabetes leve ou 250 mg glicose/dL urina (**Figura 11 e 12, Apêndice A**). Na vigência do diabetes no animal infectado, polarizado para respostas tipo Th2, os resultados do padrão de granuloma hepático expressam maior desorganização celular, característica do padrão difuso em fêmeas e machos diabéticos (**Fotomicrografias M12 e M15**). Por outro lado, a resposta celular no pâncreas de camundongo com esquistossomose evidencia uma infiltração generalizada, principalmente em fêmeas com diabetes grave (**Fotomicrografias M5 e M6**). Foi observado o desenvolvimento de um quadro de pancreatite, com infiltração do tecido

endócrino e exócrino, em fêmeas com diabetes grave, infectadas pelo *S. mansoni*, mesmo com 10 cercárias.

Provavelmente, em ambos os sexos, a mortalidade está associada à evolução irreversível do diabetes.

No caso de fêmeas diabéticas prenhes, a ausência de mortalidade foi associada à resposta imune humoral, um fenômeno do tipo Th2 na prenhez, (Wegmann *et al.*, 1993; Lin *et al.*, 1993), com o redirecionamento da imunidade da fêmea prenhe se distanciando da imunidade mediada por células e aumentando a resposta humoral além do aumento na resposta secretória de insulina e crescimento da célula beta (Hellman, 1960; Hellerstrom, 1963; Green & Taylor, 1972; Van Assche, 1974; Sorenson & Parsons, 1985; Parsons *et al.*, 1992) associado com o desenvolvimento de respostas do tipo 2 durante a esquistossomose e a oscilação da glicosúria, na prenhez.

Para a compreensão do efeito da prenhez na vigência do diabetes temos que levar em conta que para acomodar o aumento na demanda de insulina que ocorre durante a prenhez, é necessário que as ilhotas de Langerhans sofram mudanças estruturais e funcionais. A incapacidade das ilhotas maternas em responderem ao aumento da demanda de insulina pode permitir o desenvolvimento do diabetes gestacional. A prenhez pode ser o estímulo para a síntese de DNA nas células das ilhotas (Green & Taylor, 1972) e podem aumentar a frequência mitótica nas ilhotas de camundongos e ratos (Hellman, 1960; Hellerstrom, 1963). As mudanças adaptativas que ocorrem na prenhez normal incluem: aumento da síntese de insulina, hiperinsulinismo (Bone & Taylor, 1976; Green *et al.*, 1973), correspondendo a uma hipertrofia de células beta, devido principalmente à mitose (Hellman, 1960; Van Assche *et al.*, 1979), aumento na proliferação celular e volume da ilhota (Hellman, 1960; Van Assche, 1974; Aerts & Van Assche, 1975), hiperatividade das ilhotas na prenhez (Green & Taylor, 1972) tanto quanto uma elevação da sensibilidade do tecido à insulina ou das células beta à glicose. A capacidade secretória das ilhotas na prenhez de ratas é tal que podem secretar dez vezes mais insulina, na concentração normal de açúcar no sangue. O perfil de secreção da insulina é revertido aos níveis normais, na fase final da lactação, suportando a hipótese de que os hormônios lactogênicos são potente reguladores da massa da ilhota (Sorenson & Parsons, 1985; Parsons *et al.*, 1992).

Em se tratando do peso pancreático durante o desenvolvimento do diabetes insulino dependente, o pâncreas frequentemente é muito menor do que o normal (Gepts & Lecompte, 1981). A manutenção do peso do pâncreas em fêmeas diabéticas prenhes mesmo infectadas pelo *S. mansoni* (**Tabela 2**) aliada ao ótimo aspecto de saúde, mesmo em condições de diabetes avançada,

juntamente com o fato de exibirem boa formação de granuloma, com melhor performance do que o grupo diabético não prenhe sugere a proteção do microambiente de prenhez, com mínima interferência do diabetes para o sucesso da infecção pelo *S. mansoni*.

Em machos diabéticos, a redução do peso do pâncreas está diretamente relacionada ao aumento da glicosúria, o mesmo ocorrendo com as fêmeas diabéticas no decorrer da infecção (**Figura 6**). No entanto, apesar de machos diabéticos apresentarem pesos de pâncreas maiores quando comparados com as fêmeas no início do diabetes, com a progressão do diabetes e a evolução da infecção esquistossomótica, o decréscimo no peso do pâncreas foi mais acentuado nos machos diabéticos (**Figura 7**).

Foi possível observar que a hepatomegalia em camundongos diabéticos decresce em função da glicosúria e as fêmeas, independentemente do grau de glicosúria, apresentaram maior hepatomegalia do que os machos (**Figuras 8 e 9**). A ausência de hepatomegalia em camundongos com diabetes grave, possivelmente devido ao menor tamanho dos vermes pode não alterar a dinâmica da circulação hepática, não produzindo hipertensão portal. Levando-se em conta que o diabetes também pode afetar a oviposição dos vermes, a chance de aumentar a celularidade no parênquima hepático é menor.

Não foi observado carcinoma pancreático ao final da infecção (49 dias) como descrito por Zanotti *et al.* (1982a).

O camundongo NOD é um modelo útil no estudo de mecanismos patogênicos durante o diabetes tipo 1.

Apesar da proposta deste estudo não prever a quantificação das citocinas envolvidas, é importante destacar o papel regulatório no efeito sinérgico ou antagônico da esquistossomose na vigência do diabetes.

6.2. Aspectos do desenvolvimento dos vermes

O ambiente adverso para o desenvolvimento do *S. mansoni* pode induzir alterações somáticas, tais como as encontradas em dieta hipoproteica (Akpom, 1982; Magalhães *et al.*, 1986; Guaraldo, 1987), hipotireoidismo (Wahab *et al.*, 1971), hormônios do hospedeiro (Mendonça *et al.*, 2000). Em infecções unissexuais produzidas experimentalmente em camundongos (Zanotti *et al.*, 1982b) foi observada deficiência no desenvolvimento, refletido pelo menor comprimento dos vermes, principalmente de fêmeas.

Há relatos de que o padrão de citocinas do hospedeiro influencia a oviposição (Doenhoff *et al.*, 1978) e os vermes requerem TNF-alfa para ovipor.

Magalhães *et al.* (1978) estudando o efeito do diabetes induzido pelo aloxano em camundongos observou elevado número de vermes não desenvolvidos ou atrofiados.

O uso de camundongo knockout deficiente em Interleucina 7 por Wolowczuk *et al.* (1999), onde há predomínio da resposta Th1, evidenciou o desenvolvimento de parasitas atrofiados, considerados anões e com redução do número de ovos, induzindo baixa patologia no fígado. Na patologia do diabetes onde há predomínio da resposta Th1, nossos dados são concordantes.

Resultados similares de redução do comprimento de vermes machos e fêmeos foram encontrados por Guaraldo (1987) e Magalhães *et al.* (1986) no estudo do efeito da subnutrição experimental. A imunossupressão ocorre tanto na subnutrição como em diabetes, o que nos levou a comparar o efeito destas patologias sobre desenvolvimento dos vermes. É notável que ambas as patologias afetaram mais o trematódeo do sexo feminino. Considerando que o experimento de subnutrição foi conduzido apenas em fêmeas da linhagem Swiss, foi comparado o comprimento de vermes em fêmeas, levando-se em conta as glicosúrias encontradas no hospedeiro diabético. Foi possível constatar que houve redução de 18,3% no comprimento de vermes machos em animais subnutridos enquanto que o diabetes induziu uma redução na ordem de 22,5 % em hospedeiro com diabetes moderada (**Figura 18**). A comparação análoga para vermes fêmeos indicou que a subnutrição foi capaz de reduzir 22,4% o comprimento de vermes fêmeos, idêntico valor encontrado para fêmeas com diabetes moderada (**Figura 18**). Entretanto, os vermes fêmeos em hospedeiro macho com diabetes grave alcançaram a redução máxima de tamanho (30,5%) dentre todos os grupos. Os valores máximos de redução do comprimento de vermes machos encontrados para fêmeas com diabetes severa foi de 23,9%.

A prenhez atuou como um microambiente endócrino propício ao desenvolvimento dos vermes (**Figura 18**), pois fêmeas diabéticas prenhes não apresentaram decréscimo no tamanho de vermes machos, mesmo em condições de diabetes severa. Neste caso, houve redução de apenas 8,06% sobre o tamanho de vermes fêmeos.

A fase pré-diabética é importante para vermes fêmeos porque já no início da doença há redução de tamanho dos vermes, independentemente do sexo do hospedeiro.

Considerando que há necessidade de integridade no desenvolvimento do verme macho para a fecundação das fêmeas, sendo que os vermes fêmeos sofrem danos maiores com maior redução de comprimento e sendo que o verme fêmeo é a única fonte de ovos do parasita, pode-se presumir que mesmo que o comprimento de vermes machos não tenha sido

afetado de forma tão expressiva na vigência do diabetes, não há como garantir que houve produção normal de ovos, em quantidade e qualidade, parâmetro não avaliado neste estudo. A qualidade dos ovos produzidos nesta condição e sua capacidade de induzir a formação do granuloma com a conseqüente resposta Th2, merece investigação.

Apesar do excesso de glicose estar presente no sangue de animais diabéticos e sendo esta a fonte de energia vital para o desenvolvimento do verme, os mesmos apresentaram redução de tamanho com o aumento da glicosúria. Além dos elegantes resultados de Wolowczuk *et al.* (1999), enfatizando a importância do microambiente endócrino propício a Th1, sugerimos outros mecanismos pelos quais o parasita sofre com o ambiente endócrino alterado. As hipóteses aventadas estão relacionadas a atividades biológicas alteradas, tais como o consumo de oxigênio, vital para o início do desenvolvimento do verme, a incorporação da glicose e a presença de produtos metabólicos tóxicos em contato direto com o parasita, decorrente de alterações metabólicas provocadas pelo diabetes, como ocorre na cetonúria. Convém lembrar que a cetonúria ocorre apenas em fêmeas diabéticas, fato que pode ter colaborado não só para o agravamento do diabetes nas fêmeas mas possivelmente alterando o metabolismo do trematódeo, com maiores danos em vermes fêmeos.

7. CONCLUSÕES

Em relação ao hospedeiro:

A esquistossomose exerceu função protetora no diabetes principalmente em machos NOD/Uni diabéticos, evidenciado pelo aumento da sobrevida (70%) quando comparados com o grupo não infectado de machos diabéticos (41,6%). Em fêmeas diabéticas infectadas, a sobrevida também foi maior (25%) quando comparada com o grupo sem infecção (21%).

A associação do diabetes, esquistossomose e prenhez diminuiu a patologia do diabetes e da esquistossomose, expressa pelo aumento de sobrevida do hospedeiro e a resposta granulomatosa, compatível com a do hospedeiro não diabético.

A esquistossomose induziu pancreatite severa aos 42 dias de infecção com 10 cercárias em camundongos fêmeos diabéticos. Em machos diabéticos infectados, o quadro de pancreatite foi brando aos 56 dias de infecção por 50 cercárias de *S. mansoni*.

A fêmea diabética da linhagem NOD/Uni infectada com 10 cercárias de *S.mansoni* revelou ser excelente modelo para estudo de pancreatite.

As reações granulomatosas no fígado de camundongos diabéticos sofreram redução de área em função do aumento da glicosúria.

A hepatomegalia em camundongos diabéticos infectados pelo *S. mansoni* diminuiu em função do aumento da glicosúria, sendo mais evidente em machos diabéticos .

A massa do pâncreas em ambos os sexos de camundongos diabéticos diminuiu em função do aumento da glicosúria. Este fato não ocorreu em fêmeas diabéticas prenhes.

Em relação ao desenvolvimento do *Schistosoma mansoni*

O diabetes interferiu no desenvolvimento de vermes machos e fêmeos independente do sexo do hospedeiro.

Na vigência de diabetes severa, a redução do comprimento de vermes machos de *S. mansoni* atinge 24% em camundongos fêmeos diabéticos.

Os vermes fêmeos sofreram redução de tamanho desde o início do diabetes, fato que não ocorreu em vermes machos.

Os vermes fêmeos sofreram maior redução de comprimento (30,5%) em hospedeiro macho com diabetes grave.

Vermes adultos de *S. mansoni* que se desenvolvem em microambiente do diabetes concomitante à prenhez, não sofreram redução de tamanho pelo diabetes.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABE, T. & COLLEY, D.G. Modulation of *Schistosoma mansoni* egg-induced granuloma formation . III-Evidence for an anti-idiotypic I-J-positive,I-J restricted,soluble T suppressor factor. **J. Immunol.**, v.132, p. 2084-88, 1984.
- ACTOR, J.K., SHIRAI, M., KULLBERG, M.C., BULLER, R.M., SHER, A., BERZOFSKY, J.A. Helminth infection results in decreased virus-specific CD8+ cytotoxic T-cell and Th1 cytokine responses as well as delayed virus clearance. **Proc.Natl.Acad.Sci.USA**, v .90, p. 948-52,1993.
- ACTOR, J.K., MARSHALL, M.A., ELTOUM, I.A., BULLER, R.M., BERZOFSKY, J.A., SHER, A. Increased susceptibility of mice infected with *Schistosoma mansoni* to recombinant vaccinia virus:association of viral persistence with egg granuloma formation. **Eur. J.Immunol.**, v.24, p. 3050-56, 1994.
- ADORINI, L., GREGORI, S., HARRISON, L.C. Understanding autoimmune diabetes: insights from mouse models. **Trends Mol. Med.**,v.8,p.31-8,2002.
- AERTS, L. & VAN ASSCHE, F.A. Ultrastructural changes of the endocrine pancreas in pregnant rats. **Diabetologia**,v.11,p.285-89,1975.
- AKPOM, C.A., Schistosomiasis:Nutritional Implications.**Rev.Infect.Dis.**,v.4,p.776-82,1982.
- ALMAWI, W.Y., TAMIN, H., AZAR, S.T. T helper type 1 and 2 cytokines mediate the onset and progression of type 1 (insulin-dependent) diabetes . **J.Clin.Endocrinol.Metab.**, v.84, p.1947-502, 1999.
- AMIEL, A.S., CAPRIO, S., SHERWIN, R.S., PLEWE, G., HAYMOND, M.W., TAMBORLANE, W.V. Insulin resistance of puberty: a defect restricted to peripheral glucose metabolism .**J.Clin. Endocrinol. Metab.**, v.72, p. 277-82, 1991.
- AMIRI, P., LOCKSLEY, R.M., PARLOW, T.G., SADICK, M., RECTOR, E., RITTER, D., MCKERROW, J.H. Tumor necrosis factor alpha restores granulomas and induces parasite egg-laying in schistosome-infected SCID mice. **Nature**, v. 356, p. 604-7, 1992.
- ANDERSON, J.T., CORNELIUS, J.G., JARPE, A.J., WINTER, W.E., PECK, A.B. Insulin-dependent diabetes in NOD mouse model. II. β -cell destruction in autoimmune diabetes is a Th2-and not a Th1-mediated event. **Autoimmunity**,v.15,p.113-122,1993.
- ANDRADE, Z.A., SILVA, L.M., de SOUZA, M.M. An experimental approach to

the pathogenesis of "pipestem " fibrosis (Symmers ' fibrosis of the liver).
Mem. Inst. Oswaldo Cruz, v. 92, p. 699-706, 1997.

ARAFI, M.A. & HASHEM, M. 3rd European Congr. Nat. Soc. Gastro
 Ent., Bologna, Italy, 1952.

AUGSTEIN, P., STEPHENS, L.A., ALLISON, J., ELEFANTY, A. G., EKBERG,
 M., KAY, T.W., HARRISON, L.C. Beta- cell apoptosis is an accelerated
 model of autoimmune diabetes. **Mol. Med.**, v. 4, p. 495-501, 1998.

BAHAKIM, H.H., HUSSAIN, S., SULAIMANI, S.H. Ultrasonography of
 pancreatic schistosomiasis: a case report.
J. Trop. Med. Hyg., v.89, p. 81-84, 1986.

BAXTER, A.G., HEALEY, D., COOKE A. Mycobacteria precipitate autoimmune
 rheumatic disease in NOD mice via an adjuvant-like activity. **Scand. J.**
Immunol., v.39, p. 602-6, 1994.

BAXTER, A. G. & MANDEL, T.E. Hemolytic anemia in non-obese diabetic mice.
Eur. J.Immunol., v. 21., p. 2051-55, 1991.

BAXTER, A.G., HORSFALL, A.C., HEALEY, D., OZEGBE, P., DAY, S.,
 WILLIAMS, D.G., COOKE, A. Mycobacteria precipitate an SLE-like
 syndrome in diabetes-prone NOD mice. **Immunology**, v.83, p.227-31, 1994.

BERGQUIST, N.R. Schistosomiasis Vaccine Development . **The Immunologist**,
 v.2, p.131-34, 1994.

BIBAWI, E. Schistosomiasis and diabetes mellitus. **Trans.R.S.Trop.Med.Hyg.**,
 v. 64, p. 907-8 , 1970.

BLOCH, E.H., WAHAB, A .M.F., WARREN, K.S. In vivo microscopic
 observations of the pathogenesis and pathophysiology of hepatosplenic
 schistosomiasis in the mouse liver **Am.J.Trop.Med.Hyg.**, v.21, p. 546-57,
 1972.

BOGLIOLO, L. Patologia da esquistossomose mansoni. **Rev.Bras.Malariol.**, v.11,
 p.359-424, 1959.

BONE, A. J. & TAYLOR, K.W. Metabolic adaptation to pregnancy shown by
 increased biosynthesis of insulin in islets of Langerhans isolated from
 pregnant rats. **Nature**, v.262, p.501-2, 1976.

BOROS, D.L. & WARREN, K.S. Delayed hypersensitivity-type granuloma
 formation and dermal reaction induced and elicited by a soluble factor isolated
 from *Schistosoma mansoni* eggs. **J.Exp.Med.**, v. 132, p. 488-507, 1970.

- BOROS, D.L., PELLE, R.P., WARREN, K.S. Spontaneous modulation of granulomatous hypersensitivity in schistosomiasis mansoni . **J. Immunol.**, v.114,p. 1437-41, 1975.
- BOROS, D.L. Immunopathology of *Schistosoma mansoni* infection. **Microbiol. Rev.**, v.2,p.250,1989.
- BOWMAN, M.A., LEITER, E.H., ATKINSON, M.A. Prevention of diabetes in the NOD mouse: implications for therapeutic intervention in human disease. **Immunol.Today**, v.15, p. 115-20, 1994.
- CARRASCO, E., LOPEZ, G., GARCIA DE LOS RIOS, M., VARGAS, N. Incidencia de diabetes mellitus insulin-dependiente en menores de 15 anos. Periodo 90-91. Santiago, Chile. **Revista de la Sociedad Argentina de Diabetes**,v.26,p.14-15,1992.
- CHAPPEL, C.I. & CHAPPEL, W.R. The discovery and development of the BB-rat colony: An animal model of spontaneous Diabetes Mellitus. **Metabolism**, v.32, fasc.7., Suppl, p.8-10, 1983.
- CHEEVER, A.W. & ANDRADE, Z.A. Pathological lesions associated with *Schistosoma mansoni* infection in man . **Trans.R.Soc.Trop.Med.Hyg.**, v.61, p. 626-39,1967.
- CHENSUE, S.W., WELHAUSEN, S. R., BOROS, D.L. Modulation of granulomatous hypersensitivity II-Participation of Ly 1+ and Ly 2+ T lymphocytes in the supression of granuloma formation and lymphokine production in *Schistosoma mansoni* infected mice. **J.Immunol.**, v.127,p. 363-7, 1981.
- CHIKUNGUWO, S.M., KANAZAWA, T., DAYAL, Y., STAADECKER, M.J. The cell-mediated response to schistosomal antigens at the clonal level: in vivo functions of cloned murine egg antigen-specific CD4+ T helper/type 1 lymphocytes. **J. Immunol.**,v.147, p.3921-25, 1991.
- COLEMAN, D.L., KUZAVA, J.E., LEITER, E.H. Effect of Diet on incidence of diabetes in nonobese diabetic mice **Diabetes**, v.39,p. 432-436, 1990.
- COLLE, E. Genetic susceptibility to the development of spontaneous Insulin-dependent diabetes mellitus in the rat. **Clin.Immunol.Immunopath.**, v. 57,p. 1-9, 1990.
- COLLEY, D.G. Immune responses to a soluble schistosomal egg antigen preparation during chronic primary infection with *Schistosoma mansoni*. **J.Immunol.**, v.115, p. 150-56, 1975.

- COLLEY, D.G., LEWIS, F.A., TODD, C.W. Adoptive suppression of granuloma formation by T lymphocytes and by lymphoid cells sensitive to cyclophosphamide. **Cell.Immunol.**, v. 46,p. 192-97, 1979.
- CONCEIÇÃO, M.J., ARGENTO, C.A., CHAGAS, V.L., TAKIYA, C.M., MOURA, D.C., SILVA, S.C. Prognosis of schistosomiasis mansoni patients infected with hepatitis B virus. **Mem.Inst.Oswaldo Cruz**, v. 93, p. 255-58, 1998.
- COOKE, A., TONKS, P., JONES, F.M., O'SHEA, H., HUTCHINGS, P., FULFORD, A.J., DUNNE, D.W. Infection with *Schistosoma mansoni* prevents insulin dependent diabetes mellitus in non-obese diabetic mice.**Parasite Immunol.**,v.21,p.169-76,1999.
- CRAIGHEAD, J.E. & McLANCE, M.F. Diabetes mellitus :induction in mice by encephalomyocarditis virus. **Science**,v.162, p. 913-4, 1968.
- CURRY, A.J., ELSE, K.J., JONES, F., BANCROFT, A., GRENCIS, R.K., DUNNE, D.W. Evidence that cytokine-mediated immune interactions induced by *Schistosoma mansoni* alter disease outcome in mice concurrently infected with *Trichuris muris* . **J.Exp.Med.**,v. 181, p.769-74, 1995.
- DOENHOFF, M., MUSALLAM, R., BAIN, J., MCGREGOR, A. Studies on the host-parasite relationship in *Schistosoma mansoni*- infected mice:the immunological dependence of parasite egg excretion. **Immunology**, v.35,p.771-78,1978.
- DOMINGO, E.O., COWAN, B.T.,WARREN, K.S. The inhibition of granuloma formation around *Schistosoma mansoni* eggs. I- Immunosuppressive drugs. **Am.J.Trop.Med.Hyg.**, v.16,p.284-92, 1967.
- DOMINGO, E.O. & WARREN K.S. The inhibition of granuloma formation around *Schistosoma mansoni* eggs. II – Thimectomy. **Am.J.Path.**, v. 51,p. 757-67 , 1967.
- DOMINGO, E.O. & WARREN, K.S. The inhibition of granuloma formation around *Schistosoma mansoni* eggs III-Heterologous antilymphocyte serum. **Am.J.Path.**, v.52,p. 613-31, 1968.
- DOUGHTY, B.L. & PHILLIPS, S.M. Delayed hypersensitivity granuloma formation and modulation around *Schistosoma mansoni* eggs in vitro II-Regulatory T cell subsets. **J.Immunol.**, v.128, p.137-44, 1982.
- EISENBARTH, G.S. Type I Diabetes Mellitus. A Chronic Autoimmune Disease. **N. Engl. J. Med.** 314 (21),1360-1368,1986.

- ELLIOT, R.B., REDDY, S.N., BIBBY, N.J., KIDA, K. Dietary prevention of diabetes in the non-obese diabetic mice **Diabetologia**, v. 31, p.62-4, 1988.
- ELOI-SANTOS, S., OLSEN, N.J., CORREA-OLIVEIRA, R., COLLEY, D. G. *Schistosoma mansoni*: Mortality, Pathophysiology and Susceptibility. Differences in Male and Female mice. **Exp. Parasitol.**, v.75, p.168-175, 1992.
- FALCÃO, P.L., MALAQUIAS, L.C.C., MARTINS-FILHO, O.A., SILVEIRA, M.A.S., PASSOS, V.M.A., PRATA, A., GAZZINELLI, G., COFFMAN, R.L., CORREA-OLIVEIRA, R. Human Schistosomiasis mansoni: IL-10 modulates the in vitro granuloma formation. **Parasite Immunol.**, v.20, p. 447-54, 1998.
- FALLON, P.G. & DUNNE, D.W. Tolerization of mice to *Schistosoma mansoni* egg antigens causes elevated type 1 and diminished type 2 cytokine responses and increased mortality in acute infection. **J.Immunol.**, v.162, p.4122-32, 1999.
- FALLON, P.G., RICHARDSON E.J., McKENZIE G.J., McKENZIE A.N.J. Schistosome infection of transgenic mice defines distinct and contrasting pathogenic roles for IL-4 and IL-13: IL-13 is a profibrotic agent. **J.Immunol.**, v.164, p.2585-2591, 2000
- FALLON, P.G., SMITH, P., DUNNE, D.W. Type 1 and type 2 cytokine-producing mouse CD4⁺ and CD8⁺ T cells in acute *Schistosoma mansoni* infection. **Eur.J.Immunol.**, v.28, p.1408-16, 1998.
- FERREIRA, S.R., FRANCO, L.J., VIVILO, M.A., NEGRATO, C.A., SIMÕES, A.C., VENTURELI, C.R. Population-based incidence of IDDM in the state of São Paulo, Brazil. **Diabetes Care**, v.16, p.701-704, 1993.
- FIDEL, P.L.Jr. & BOROS, D.L. Regulation of granulomatous inflammation in murine schistosomiasis V-Antigen induced T cell-derived suppressor factors down-regulate proliferation and IL-2, but not IL-4, production by CD4⁺ effector T cells. **J.Immunol.**, v.146, p. 1941-48, 1991.
- FOWELL, D. & MASON, D. Evidence that the T cell repertoire of normal rats contains cells with the potential to cause diabetes. Characterization of CD4⁺ T cell subset that inhibits this autoimmune potential. **J.Exp.Med.**, v. 177, p. 627-33, 1993.
- FOX, C.J. & DANSKA, J.S. Independent genetic regulation of T-cell and antigen presenting cell participation in auto-immune islet inflammation. **Diabetes**, v.47, p. 331-38, 1998.
- FUJITA, T., YUI, R., KUSUMOTO, Y., SERIZAWA, Y., MACHINO, S., TOCHINO, Y. Lymphocytic insulinitis in a non obese diabetic (NOD) strain of mice: an immunohistochemical and electron microscope investigation. **Biomed.Res.**, v.3, p. 429-43, 1982.

- GENAIN, C.P., ABEL, K., BELMAR, N., VILLINGER, F., ROSENBERG, D.P., LININGTON, C., RAINE, C.S., HAUSER, S.L. Late complications of immune deviation therapy in a nonhuman primate. **Science**, v.274, p. 2054-2057, 1996.
- GEPTS, W. Pathologic anatomy of the pancreas in juvenile diabetes mellitus. **Diabetes**, v. 14, p.19-33, 1965.
- GEPTS, W. Islet morphologic changes in diabetes. **Diab.Metab.Ver.**, v. 3, p. 859-72, 1987.
- GEPTS, W. & LECOMPTE, P.M. The pancreatic islets in Diabetes **Am.J.Med.**, v. 70, p. 105-15, 1981.
- GHAFFAR, Y.A., KAAMEL, M., ABDEL-WAHAB, M.F., DORGHAM, L.S., SALEH, M.S., DEEB, A.S. Hepatitis B vaccination in children infected with *Schistosoma mansoni*. Correlation with ultrasonographic data. **Am.J.Trop.Med.Hyg.**, v.43, p. 516-19, 1990.
- GHANEM, M.H., SAID, M., GUIRGIS, F.K. Glucose intolerance in hepatic schistosomiasis. **J.Trop.Med.Hyg.**, v.74, p. 189-94, 1971.
- GILIOLI, R., SAKURADA, J.K., ANDRADE, L.A.G., KRAFT, V., MEYER, B., RANGEL, H.A. Virus infection in rat and mouse colonies reared in Brazilian animal facilities. **Lab.Anim.Science**, v. 46, p.582-84, 1996.
- GILIOLI, R., ANDRADE, L.A. G., PASSOS, L.A. C., SILVA, F.A., RODRIGUES, D.M., GUARALDO, A. M.A. Parasite survey in mouse and rat colonies of Brazilian laboratory animal houses kept under different sanitary barrier conditions. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.52, n.1, p.33-37, 2000.
- GÖNNERT, VON R. Schistosomiasis-Studien-1. Beiträge zur Anatomie und Histologie von *Schistosoma mansoni*. **Zeitschrift für Tropenmedizin und Parasitologie.**, v.6, p. 18-33, 1955.
- GREEN, I.C., HOWELL, S.L., MONTAGUE, W., TAYLOR, K.W. Regulation of insulin release from isolated islets of Langerhans of the rat in pregnancy. **Biochem. J.**, v.134, p.481-87, 1973.
- GREEN, I.C. & TAYLOR, K.W. Effects of pregnancy in the rat on the size and insulin secretory response of islets of Langerhans. **J. Endocrinol.**, v.54, p.317-25, 1972.
- GRZYCH, J.M., PEARCE, E.J., CHEEVER, A., CAULADA, Z.A., CASPAR, P., HEINY, S., LEWIS, F.A., SHER, A. Egg deposition is the major stimulus for the production of the Th2 cytokines in murine

- schistosomiasis mansoni. **J.Immunol.**, v.146,p. 1322-27, 1991.
- GUARALDO, A. M.A. Avaliação da resposta imune à infecção por *Schistosoma mansoni* em camundongos C3H/H e J submetidos à dieta hipoproteica e normoproteica. Campinas,S.P. Tese de Doutorado- Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas, 1987.
- HARADA, M., KISHIMOTO, Y., MAKINO, S. Prevention of overt diabetes and insulinitis in NOD mice by a single BCG vaccination. **Diabetes Res. Clin. Pract.**,v.8,p.85-89,1990.
- HASKINS, K. & McDUFFIE, M. Acceleration of diabetes in young mice with a CD4+ islet-specific T cell clone. **Science**, v. 249, p. 1433-36 , 1990.
- HASSAN, M.M., RAMADAN, M. A., MOSTAFA, N. E., FEKRY, A.A.,GABER, O.A. Different cytokines profiles in spleen and liver granuloma of *Schistosoma mansoni* experimentally infected mice during disease development. **J.Egypt.Soc.Parasitol.**, v.30,p.245-56,2000.
- HEALEY, D.,OZEGBE, P.,ARDEN, S.,CHANDLER, P., HUTTON, J.,COOKE,A. In vivo activity and in vitro specificity of CD4+ Th1 and Th2 cells derived from spleens of diabetic NOD mice. **J.Clin.Invest.**, v. 95,p. 2979-85, 1995.
- HELLERSTRÖM, C. The influence of pregnancy and lactation on the endocrine pancreas of mice. **Acta Soc. Med. Upsaliensis**,v.68,p.17-28,1963.
- HELLMAN, B. The islets of Langerhans in the rat during pregnancy and lactation with special reference to the change in the B/A cell ratio. **Acta Obst.Gynecol. Scand.**,v.39,p.311-42,1960.
- HERMITTE, L., VIALETES, B., NAQUET, P., ATLAN, C., PAYAN, M.J., VAGUE, P. Paradoxical lessening of autoimmune process in nonbese diabetic mice after infection with the diabetogenic variant of encephalomyocarditis virus. **Eur. J. Immunol.**,v.20,p.1297-303,1990.
- HERNANDEZ-PANDO, R., ROOK, G.A.W. The role of TNF- α in T-cell mediated inflammation depends on the Th1/Th2 cytokine balance. **Immunol.**,v.82, p.591-95,1994.
- HOFFMANN, K.F., CHEEVER, A.W., WYNN, T.A. IL-10 and the dangers of immune polarization:excessive Type 1 and Type 2 cytokine responses induce distinct forms of lethal immunopathology in murine schistosomiasis. **J.Immunol.**,v.164, p.6406-6416, 2000
- HSU, C.K., HSSU, S.H., WHITNEY, R.A.JR., HANSEY, C.T. Immunopathology of schistosomiasis in athymic mice. **Nature**, v. 262,p. 397-99, 1976.

- IWAHASHI, H., ITOH, N., YAMAGATA, K., IMAGAWA, A., NAKAJIMA, H., TOMITA, K., MORIWAKI, M., WAGURI, M., YAMAMOTO, K., MIYAGAWA, J., NAMBA, M., HANAFUSA, T., MATSUZAWA, Y. Molecular mechanisms of pancreatic beta-cell destruction in autoimmune diabetes: potential targets for preventive therapy. **Cytokines Cell Mol. Ther.**, v. 4, p. 45-51, 1998
- JAMES, S.L. & SHER, A. Cell-mediated immune response to Schistosomiasis. **Curr. Topics Microb. Immunol.**, v. 155, p. 21-31, 1990.
- KANAZAWA, Y., KOMEDA, K., SATO, S., MORI, S., AKANUMA, K., TAKUKU, F. Non-obese-diabetic mice: immune mechanisms of pancreatic B-cell destruction. **Diabetologia**, v. 27, (Supp) p. 113-15 1984.
- KARVONEN, M., VIK-KAJANDER, M., MOLTCHANOVA, E., LIBMAN, I., LAPORTE, R., TUOMILEHTO, J. Incidence of Childhood Type 1 Diabetes Worldwide. **Diabetes Care**, 23, 1516-1526, 2000.
- KIKUTANI, H. & MAKINO, S. The murine autoimmune diabetes model: NOD and related strains **Adv. Immunol.**, v. 51, p. 285-322, 1992.
- KING, H., AUBERT, R.E., HERMAN, W.H. Global burden of diabetes, 1995-2025: prevalence, numerical estimates, and projections. **Diabetes Care**, 21, 1414-1431, 1998.
- KOIKE, T., YOGIRO, I., ISHII, T., ITO, I., TAKABAYASHI, K., MARUYAMA, N., TOMIOKA, H., YOSHIDA, S. Preventive effect of monoclonal anti L3T4 antibody on development of diabetes in NOD mice. **Diabetes**, v. 36, p. 539-41, 1987.
- KULLBERG, M.C., PEARCE, E.J., HIENY, S.E., SHER, A., BERZOFISKY, J.A. Infection with *Schistosoma mansoni* alters Th1/Th2 cytokine responses to a non-parasite antigen. **J. Immunol.**, v. 148, p. 3264-70, 1992.
- KURRER, M.O., PAKALA, S.V., HANSON, H.L., KATZ, J.D. Cell apoptosis in T cell-mediated autoimmune diabetes. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 94, p. 213-18, 1997.
- LADOSKY, W. O comportamento do pâncreas na esquistossomose mansônica hepato-esplênica. Estudo comparativo com o comportamento do mesmo órgão na cirrose de Morgagni-Laennec. **Rev. Assoc. Médica Brasileira**, v. 4, p. 141-50, 1958.
- LaPORTE, R.E., TUOMILEHTO, J., KING, H. WHO Multinational Project for Childhood Diabetes. **Diabetes Care**, 13, 1062-1068, 1990.

- LAWRENCE, C.E., PATERSON, J.C.M., HIGGINS, L.M., MACDONALD, T.T., KENNEDY, M., GARSIDE, P. IL-4-regulated enteropathy in an intestinal nematode infection. **Eur.J.Immunol.**, v.28, p.2672-84, 1998.
- LAWRENCE, P.O. Hormonal effects on insects and other endoparasites in vitro. **In Vitro Cell Dev. Biol.**, 27, p.487-496, 1991.
- LEE, M-S, MUELLER, R., WICKER, L.S., PETERSON, L.B., SARVETNICK, N. IL-10 is necessary and sufficient for autoimmune diabetes in conjunction with NOD MHC homozygosity. **J.Exp.Med.**, v.183, p. 2663-68, 1996.
- LEITER, E.H. The NOD mouse: a model for analyzing the interplay between heredity and environment in development of autoimmune disease. **ILAR News-Part One**, v.35, p. 4-14 , 1993.
- LEITER, E.H., PROCHAZKA, M., COLEMAN, D.L. Animal models of human disease: The Non-obese diabetic (NOD) mouse. **Am.J.Path.**, v.128, p. 380-83, 1987.
- LENZI H.L., LENZI, J.A ., ROSMAN, F.C. Pancreatic involvement in murine schistosomiasis . **Brazilian J.Med.Biol.Res.** , v.22, p. 1105-9, 1989.
- LIKE, A.A. & ROSSINI, A.A. Streptozotocin-induced pancreatic insulinitis: New model of diabetes mellitus. **Science**, v.193, p. 415-17, 1976.
- LIMA, J.P.R. Estudo das chamadas lesões “ectópicas” na esquistossomose mansônica I-Incidência Geral. **Rev.Inst. Med.Trop.S.Paulo**, v.8, p. 167 , 1966.
- LIN, H., MOSMANN, T.R., GUILBERT, L., TUNTIPOPIPAT, S., WEGMANN, T.G. Synthesis of T helper 2-type cytokines at the maternal-fetal interface. **J.Immunol.**, v.151, p.4562-73, 1993.
- LISBÔA, H.R.K., GRAEBIN, R., BUTZKE, L., RODRIGUES, C.S. Incidence of type 1 diabetes mellitus in Passo Fundo, RS, Brazil. **Braz.J.Med.Biol.Res.**, v.31, p.1553-1556, 1998.
- LO, D., REILLY, C.R., SCOTT, B., LIBLAU, R., MCDEVITT, H.O., BURKLY L.C. Antigen-presenting cells in adoptively transferred and spontaneous autoimmune diabetes. **Eur.J.Immunol.**, v.23, p. 1693-98, 1993.
- LUKACS, N.W. & BOROS, D.L. Lymphokine regulation of granuloma formation in murine schistosomiasis mansoni. **Clin.Immunol.Immunopath.**, v. 68, p. 57-63, 1993.
- MAGALHÃES, L.A. Técnica para avaliação da viabilidade de penetração de cercárias de *Schistosoma mansoni* em *Mus musculus*. **Hospital, Rio de Janeiro**, v. 75, p. 137-40, 1969.

- MAGALHÃES, L.A., GUARALDO, A.M.A.G., BASTOS, O.C., BOSCHERO, A.C., PIEDRABUENA, A.E., DOTTAVIANO, E.J. Influência da dieta hiperglicêmica e do diabetes aloxânico sobre a vitalidade do *Schistosoma mansoni*, Sambon, 1907, em camundongos experimentalmente infectados. **Rev.Saúde públ.,S.Paulo.**, v. 12, p. 267-76, 1978.
- MAGALHÃES, L.A., GUARALDO, A.M.A., ZANOTTI-MAGALHÃES, E.M., CARVALHO, J.F., SGARBIERI, V.C., ALCÂNTARA, F.G. Esquistossomose mansônica em camundongos experimentalmente subnutridos. **Rev.Saúde públ.,S.Paulo.**, v.20 , p.362-68, 1986.
- MAHMOUD, A.A., CHEEVER, A.W., WARREN, K.S. Streptozotocin-induced diabetes mellitus and the host-parasite relation in murine schistosomiasis mansoni. **J. Inf. Dis.**, v.131, p. 634-42, 1975 a .
- MAHMOUD, A.A .F., MANDEL, M.A., WARREN, K.S., WEBSTER, L.T.Jr. Niridazole – II . A potent long-acting suppressant of cellular hypersensitivity. **J.Immunol.**, v.114,p.279-83, 1975 b.
- MAHMOUD, A.A.F., WARREN, K.S., GRAHAN, R.C.JR. Anti-eosinophil serum and kinetics of eosinophilia in schistosomiasis mansoni. **J. Exp.Med.**, v.142,p. 560-74, 1975 c.
- MAHMOUD, A.A., RODMAN, H.M., MANDEL, M.A., WARREN, K.S. Induced and spontaneous diabetes mellitus and suppression of cell-mediated immunologic responses. Granuloma formation ,delayed dermal reactivity and allograft rejection. **J.Clin.Invest.**, v.57,p. 362-67, 1976.
- MAHMOUD, A.A. Host parasite relationship in schistosomiasis mansoni in the mutation diabetic mouse (db/db). **Am.J.Trop.Med.Hyg.**, v.28,p.286-89, 1979.
- MAKINO, S., KUNIMOTO, K., MURAOKA, Y., MIZUSHIMA, Y., KATAGIRI, K., TOCHINO, Y. Breeding of a non-obese, diabetic strain of mice. **Exp.Anim.**, v.29,p.1-13, 1980.
- MAKINO, S., KUNIMOTO, K., MURAOKA, Y., KATAGIRI, K. Effect of castration on the appearance of diabetes in NOD mouse. **Exp. Anim.** v.30,p.137-40, 1981.
- MAKINO, S., HARADA, M., KISHIMOTO, Y., HAYASHI, Y. Absence of insulinitis and overt diabetes in athymic nude mice with NOD genetic background. **Jikken Dobutsu**, v.35,p. 495-98, 1986.
- MARON, R., PALANIVEL, V., WEINER, H.L., HARN, D.A. Oral administration of schistosome eggs antigens and insulin B-chain generates and enhances Th2-type responses in NOD mice. **Clin.Immunol.Immunopathol.**, v.87,p.85-

92,1998.

- MARUYAMA, T., TAKEI, I., ASBA, Y., YANAGAWA, T., TAKAHASHI, T., KATOKA, K., ISHII, T. Insulin autoantibodies in non-obese diabetic mice and low-dose streptozotocin-induced diabetes in mice. **Diabetes Res.** v.7, p. 93-96, 1988.
- MAURICIO, D. & MANDRUP-POULSEN, T. Apoptosis and the Pathogenesis of IDDM- a question of life and death. **Diabetes**, v. 47, p.1537-43, 1998
- McHUGH, S.M., COULSON, P.S., WILSON, R.A. Pathologically induced alterations in the dimensions of the hepatic portal vasculature of mice infected with *Schistosoma mansoni*. **Parasitology**, v.94, p.69-80, 1987.
- MENDONÇA, R.L., ESCRIVÁ, H., BOUTON, D., LAUDET, V., PIERCE, R.J. Hormones and nuclear receptors in schistosome development. **Parasitol. Today**, v.16, p.233-40, 2000.
- MESSMER, U. K., ANKARCRONA, M., NICOTERA, P., BRÜNE, B. p53 Expression in nitric oxide-induced apoptosis. **FEBS Lett.**, v. 355, p. 23-26, 1994.
- MILLER, B.J., APPEL, M.C., O'NEIL, J. J., WICKER, L.S. Both The LYt-2 and L3T4+ T cell subsets are required for the transfer of diabetes in nonobese diabetic mice **J.Immunol.**, v.140, p. 52-58, 1988.
- MONTGOMERY, D.C. Design and analysis of experiments 2^oEd. John Willey & Sons. New York, USA, 1984.
- MOSMANN, T.R., CHERWINSKY, H., BOND, M.A., GIEDLIN, I., COFFMANN, R.L. Two types of murine helper T cell clone. I- definition according to the profiles of lymphokine activities and secreted proteins. **J.Immunol.**, v. 136, p. 2348-54, 1986.
- MOSMANN, T.R & COFFMAN, R.L. TH1 and TH2 cells: Different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. **Ann.Rev.Immunol.**, v.7, p. 145-73, 1989.
- MOTT, C.B., NEVES, D.P., BETTARELLO, A. Absorção intestinal na forma hepatoesplênica da esquistossomose mansônica. **Rev.Hosp.Clin.Fac.Med.S.Paulo**, v. 26, p. 55, 1971.
- MOTT, C.B., NEVES, D.P., OKUMURA, M., De BRITO, T., BETTARELLO, A. Histologic and functional alterations of human exocrine pancreas in Manson's schistosomiasis **Am.J.Dig.Dis.**, v. 17, p. 583-90, 1972.
- MWINZI, P.N., KARANJA, D.M., COLLEY, D.G., ORAGO, A.S., SECOR, W.E.

- Cellular immune responses of schistosomiasis patients altered by human immunodeficiency virus type 1 coinfection. **J Infect.Dis.**, v.184,p.488-96,2001.
- NOORCHASHM, H., NOORCHASHM, N., KERN, J., ROSTAMI, S.Y., BARKER, C.F., NAJI, A. B-Cells are required for the initiation of insulinitis and sialitis in nonobese diabetic mice. **Diabetes**, v. 46 , p. 941-46, 1997.
- O'BRIEN, B.A ., HARMON, B.V., CAMERON, D.P., ALLAN, D. J. Apoptosis is the mode of cell -death responsible for the development of IDDM in the nonobese diabetic (NOD) mouse, **Diabetes**, v. 46, p. 750-7, 1997.
- OGAWA, M., MARUYAMA, T., HASEGAWA, T., KANAYA, T., KOBAYASHI, F., TOCHINO, Y., UDA, H. The inhibitory effect of neonatal thymectomy on the incidence of insulinitis in non -obese diabetic (NOD) mice. **Biomed.Res.**, v. 6, p. 103-105, 1985
- OHSUGI, T. & KUROSAWA, T. Increased incidence of diabetes mellitus in specific pathogen-eliminated offspring produced by embryo transfer in NOD mice with low incidence of the disease. **Lab. Anim.Science**,v. 44,p.386-388,1994.
- OLDSTONE, M.B. Prevention of type 1 diabetes in nonbese diabetic mice by virus infection .**Science**,v.239(4839),p.500-502,1988.
- PAKALA, S.V., KURRER, M.O., KATZ, J.D. T Helper (Th2) T cells induce pancreatitis and diabetes in Immune-compromised Nonobese Diabetic (NOD) mice. **J.Exp.Med.**, 186,299-306,1997.
- PARSONS, J.A., BRELJE, T.C., SORENSON, R.L. Adaptation of islets to pregnancy:increase in β -cell division and insulin secretion correlates with the onset of placental lactogen secretion.**Endocrinology**,v.130,1459-1466,1992.
- PASSOS, A.D.C. & AMARAL, R.S. Esquistossomose mansônica: aspectos epidemiológicos e de controle. **Rev. Soc. Bras. Med.Trop.**, v.31, (Suplemento II) : 61-74, 1998.
- PAKALA, S.V., KURRER, M.O., KATZ, J.D. T helper 2 (Th2) T cells induce acute pancreatitis and diabetes in immune-compromised nonobese diabetic (NOD) mice. **J.Exp.Med.**, v.186, p. 299-306, 1997.
- PAVIN, E. J. & ZOLLNER, R. L. Implantação da linhagem "NOD-Mice" (Camundongos Diabéticos Não Obesos) no Brasil: Contribuição deste modelo animal ao estudo do diabetes mellitus insulino-dependente e outras doenças autoimunes. **Arq. Bras. Endocrinol. Metabol.**, v.38, p. 105-108, 1994.
- PEARCE, E.J., CASPAR, P., GRZYCH, J.M., LEWIS, F.A., SHER, A.

- Downregulation of Th1 cytokine production accompanies induction of Th2 responses by a parasitic helminth *Schistosoma mansoni* **J.Exp.Med.**, v. 173, p. 159-66, 1991.
- PEREIRA,O.A. & BARRETTO NETTO, M. Esquistossomose pancreática- Aspectos clínico-patológicos.Apresentação de três casos. **Arq.Bras.Med.**, v. 42, p. 311, 1952.
- PERRIN, P.J. & PHILLIPS, S.M. The molecular basis of granuloma formation in schistosomiasis I -A T cell-derived suppressor effector factor . **J.Immunol.**, v.141, p. 1714-19, 1988.
- PHILLIPS, S.M., DiCONZA, J.J., GOLD, J.A., REID, W.A. Schistosomiasis in the congenitally athymic (nude)mouse I-Thymic dependency of eosinophilia,granuloma formation,and host morbidity . **J.Immunol.**, v. 118,p.594-99, 1977.
- PHILLIPS, S.M. & LAMMIE, P. Immunopathology of granuloma formation and fibrosis in schistosomiasis. **Parasitol. Today** ,v.2,p.296-302,1986.
- PHILLIPS, S.M., REID, W.A., DOUGHTY, B.L., BENTLEY, A.G.
The immunologic modulation of morbidity in schistosomiasis.Studies in athymic mice and in vitro granuloma formation. **Am.J.Trop.Med.Hyg.** , v. 29, p. 820-31, 1980.
- PONTESILLI,O., CAROTENUTO, P., GAZDA, L.S., PRATT, P.F., PROWSE, S.J. Circulating lymphocyte populations and autoantibodies in non-obese diabetic (NOD) mice: a longitudinal study **Clin.Exp.Immunol.**, v.70,p. 84-93, 1987.
- POZZILI, P., SIGNORE, A., WILLIAMS, A. J.K., BEASLES, P. E. NOD mouse colonies around the world- recent facts and figures. **Immunol. Today**, v.14,p. 193-96, 1993.
- QIN, H-Y., SADELAIN, M.W.Y., HITCHON, C., LAUZON, J., SINGH, B.
Complete Freund's adjuvant-induced T-cells prevent the development and adoptive transfer of diabetes in nonobese diabetic mice.**J Immunol.**,v.150,p.2072-80,1993.
- RABINOVITCH, A. An update on cytokines in the pathogenesis of insulin-dependent diabetes mellitus.**Diabetes Metab. Rev.**,v.14,p.129-151,1998.
- RABINOVITCH, A. & SUAREZ-PINZON, W.L. Cytokines and their roles in pancreatic islet -cell destruction and insulin-dependent diabetes mellitus **Biochem.Pharm.**, v. 55, p. 1139-49 , 1998.
- RACE, G.J., MICHAELS, R.M., MARTIN, J.H., LARSH, J.E.Jr., MATTEWS, J.L.

- Schistosoma mansoni* eggs: an electron microscope study of shell pores and microbarbs. **Proc.Soc.Exp.Biol.Med.**, v. 130, p. 990-92. ,1969.
- RAIA, S., MIES, S., MACEDO, A.L. Portal Hypertension in Schistosomiasis. **Clin. Gastroenterol.**,v.14,p.57-82, 1985.
- RAGHEB, S. & BOROS, D.L. Characterization of granuloma T lymphocyte function from *Schistosoma mansoni*-infected mice.**J.Immunol.**, v.142,p.3239-46, 1989.
- RAPOPORT, M.J., MOR, A., VARDI, P., RAMOT, Y., WINKER, R., HINDI, A., BISTRITZER, T. Decreased secretion of Th2 cytokines preceds up-regulated and delayed secretion of Th1 cytokines in activated peripheral blood mononuclear cells from patients with insulin-dependent diabetes , **J.Automimmun.**, v. 11, p. 635-42,1998.
- REDDY, S., BIBBY, N.J., ELLIOT, R.B. Ontogeny of islet cell antibodies, insulin autoantibodies and insulitis in the non-obese diabetic mouse. **Diabetologia**, v.31, p. 322-28, 1988.
- REDONDO, M.J., REWERS, M., YU, L., GARG, S., PILCHER, C.C., ELLIOT, R.B., EISENBARTH, G.S. Genetic determination of islet cell autoimmunity in monozygotic twin,dizygotic twin, and non-twin siblings of patients with type 1 diabetes :prospective twin study. **BMJ** v.318, p. 698-702,1999.
- REPORT OF THE EXPERT COMMITTEE ON THE DIAGNOSIS AND CLASSIFICATION OF DIABETES MELLITUS. Members of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. **Diabetes Care** ,v.20(7) p.1183-1197,1997
- RERUP,C. & TARDING, F. Streptozotocin and alloxan diabetes in mice. **Eur.J.Pharmacol.**, v. 7, p. 89-96, 1969.
- REWERS, M., LAPORTE, R.E., KING, H., TUOMILEHTO, J. Trends in the prevalence and incidence of diabetes:insulin-dependent diabetes mellitus in childhood.**World Health Statistics Quaterly** v. 41 , p.179-89, 1988.
- ROBINSON, E.J.Jr. Further studies on the effect of abnormal host metabolism on *Schistosoma mansoni* .**J. Parasitology.**, v.45, p. 295-99, 1959.
- ROTHER, H., FAUST, A., SCHADE, U., KLEEMANN, R., BOSSE, G., HIBINO, T., MARTIN, S., KOLB, H. Cyclophosphamide treatment of female non-obese diabetic mice causes enhanced expression of inducible nitric oxide synthase and Interferon-gamma, but not of Interleukin-4. **Diabetologia**,v.37,p.1154-1158,1994.
- RUTITZKY, L.I., HERNANDEZ , H.J., STADECKER, M.J. Th1-polarizing

- immunization with egg antigens correlates with severe exacerbation of immunopathology and death in schistosome infection. **Proc.Natl.Acad.Sci.**, v.98,p.13243-48,2001.
- SABIN, E.A., ARAUJO, M.I., CARVALHO, E.M., PEARCE, E.J. Impairment in tetanus toxoid-specific Th1-like immune responses in humans infected with *Schistosoma mansoni*. **J.Infect.Dis.**,v.173,p.269-72,1996.
- SALEH, S.A., HIGAZI, A.M., ATA, A.A. Pancreatic Bilharziasis and its relation to diabetes mellitus . **J.Egypt.Med.Assoc.**, v.50, p. 425-41, 1967.
- SECLÉN, S., ROJAS, M.I., NUÑEZ, O., VALDIVIA, H., MILLONES, B. Type 1 (Insulin-Dependent) Diabetes in Mestizo children of Lima,Peru. Report on a ten years (1985-1994) incidence. **The Proceedings of the international Diabetes Epidemiology Group Symposium**. Savonlinna,Finland, Poster N.008,1997.
- SHIZURU, J.A., TAYLOR-EDWARDS, C., BANKS, B.A., GREGORY, A.K., EFATHMAN, C.G. Immunotherapy of nonobese diabetic mouse: Treatment with antibody to T-helper lymphocytes . **Science** , v. 420, p. 659-62, 1988.
- SOLIMAN, A.T., EL-NAWAWY, A.A., EL-AZZOUNI, O.F., AMER, E.A., DEMIAN, S.R., EL-SAYED, M.H. High prevalence of islet cell antibody and defective insulin release in children with schistosomiasis. **J.Trop.Pediatr.**,v.42,p.46-49,1996.
- SORENSEN, R.L. & PARSONS, J.A. Insulin secretion in mammosomatotropic tumor-bearing and pregnant rats: a role for lactogens. **Diabetes**,v.34,p.337-41,1985.
- STANDEN, O.D. The effects of temperature,light and salinity upon the hatching of the ova of *Schistosoma mansoni*. **Trans.R.Soc.Trop.Med.Hyg.**,v. 45, p. 221-41, 1951.
- STENGER, R.J., WARREN, K.S., JOHNSON E.A. An ultra-structural study of hepatic granulomas and schistosoma egg shells in murine hepatosplenic schistosomiasis mansoni. **Exp.Mol.Pathol.**, v. 7,p. 116, 1967.
- SUAREZ-PINZON, W., SZABÓ, C., RABINOVITCH, A. Development of autoimmune diabetes in NOD mice is associated with the formation of peroxynitrite in pancreatic islet -cells. **Diabetes**, v.46, p. 907-11, 1997.
- SUKKAR, M.Y., OMER, A.H.S., EL DIN AHMED, N. Impaired glucose tolerance in hepatic schistosomiasis. **Trans.R.Soc.Trop.Med.Hyg.**,v. 68, p. 327-32, 1974.

- TAKEI, I., ASABA, Y., KASATANI, T., MARUYAMA, T., WATANABE, K., YANAGAWA, T., SARUTA, T., ISHII, T. Suppression of development of diabetes in NOD mice by lactate dehydrogenase virus infection. **J. Autoimmun.**, v.5, p.665-74, 1992.
- TODD J.A. A protective role of the environment in the development of type I diabetes? **Diabetic Med.**, v.8, p.906-10, 1991
- TODD, J.A. & BAIN, S.C. A practical approach to identification of susceptibility genes for type I diabetes. **Diabetes.** v.41, p. 1029-34, 1992.
- TOYOTA, T., SATOH, J., OYA, K., SHINTANI, S., OKANO, T. Streptococcal preparation (OK-432) inhibits development of type I diabetes in NOD mice. **Diabetes.** v.35, p.496-99, 1986.
- VAN ASSCHE, F.A. Quantitative morphologic and histoenzymatic study of the endocrine pancreas in nonpregnant and pregnant rats. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, v.118, p.39-41, 1974.
- VAN ASSCHE, F.A., AERTS, L., GEPTS, W. Morphological changes in the endocrine pancreas in pregnant rats with experimental diabetes. **J.Endocrinol.**, v.80, p.175-79, 1979.
- VYSE, T.J. & TODD, J.A. Genetic analyses of autoimmune disease. **Cell**, v.85, p.311-18, 1996
- WAHAB, A.M.F., WARREN, K.S., LEVY, R.P. Function of the thyroid and the host-parasite relation in murine schistosomiasis mansoni. **J.Infect.Dis.**, v.124, p.161-71, 1971.
- WARREN, K.S. Inhibition of granuloma formation around *Schistosoma mansoni* eggs V-"Hodgkin's -like lesion" in SJL-J mice. **M.J.Pathol.**, v.56, p. 293-303, 1969.
- WARREN, K.S., DOMINGO, E.S., COWAN, R.B.T. Granuloma formation around schistosome eggs as a manifestation of delayed hypersensitivity **Am.J.Pathol.**, v. 51, p. 735-56, 1967.
- WARREN, K.S., ROSENTHAL, M.S., DOMINGO, E.O. Mouse hepatitis virus (MHV-3) infection in chronic schistosomiasis. **Bull.N.Y.Acad.Med.**, v.45, p.211-24, 1969.
- WARREN, K.S., MAHMOUD, A.A., BOROS, D.L., RALL, T.W., MANDEL, M.A., CARPENTER, C.C.Jr. In vivo suppression by cholera toxin of cell-mediated and foreign body inflammatory responses. **J.Immunol.**, v.112, p. 996-1007, 1974.

- WEGMANN, T.G., LIN, H., GUILBERT, L., MOSMANN, T.R. Bidirectional cytokine interactions in the maternal-fetal relationship: Is successful pregnancy a Th2 phenomenon? **Immunol. Today**, v.14, p.353-56, 1993.
- WEISBREN, B.A. Alloxan diabetes in mice. **Proc. Soc. Exp. Biol.**, v.67, p.154-7, 1948
- WICKER, L.S., TODD, J.A., PETERSON, L.B. Genetic control of autoimmune diabetes in the NOD mouse. **Ann.Rev.Immunol.**, v.13, p. 179-200, 1995.
- WILBERZ, S., PARTKE, H.J., DAGNAES-HANSEN, F., HERBERG, L. Persistent MHV (mouse hepatitis virus) infection reduces the incidence of diabetes mellitus in nonobese diabetic mice. **Diabetologia**, v.34, p.2-5, 1991.
- WOLOWCZUK, I., NUTTEN, S., ROYE, O., DELACRE, M., CAPRON, M., MURRAY, R. M., TROTTEIN, F., AURIAULT, C. Infection of mice lacking interleukin -7 (IL-7) reveals an unexpected role for IL-7 in the development of the parasite *Schistosoma mansoni* **Infect.Immun.**, v.67, p.4183-90, 1999.
- WYNN, T.A. & CHEEVER, A.W. Cytokine regulation of granuloma formation in schistosomiasis. **Curr. Opin. Immunol.**, v.7, p.505-511, 1995.
- YOLLES, T.K., MOORE, D.V., DeGIUSTI, D.L., RIPSON, C.A., MELENEY, H.E. A technique for the perfusion of laboratory animals for the recovery of schistosomes. **J.Parasit.**, v. 33, p. 419-26, 1947.
- YOON, J.W., JUN, H.S., SANTAMARIA, P. Cellular and molecular mechanisms for the initiation and progression of beta cell destruction resulting from the collaboration between macrophages and T cells. **Autoimmun.**, v.27, p.109-22, 1998.
- YOSHIDA, A., MARUYAMA, H., KUMAGAI, T., AMANO, T., KOBAYASHI, F., ZHANG, M., HIMENO, K., OHTA, N. *Schistosoma mansoni* infection cancels the susceptibility to *Plasmodium chabaudi* through induction of type 1 immune responses in A/J mice. **Int Immunol.**, v.12, p.1117-25, 2000.
- ZANOTTI, E.M., HADLER, W.A., PAIVA, S.M., MAGALHÃES, L.A. Esquistossomose pancreática e carcinoma pancreático pós-esquistossomótico em camundongos experimentalmente infectados **Resumos do VII Congresso Brasileiro de Parasitologia (Porto Alegre)** p. 54, 1982 a.
- ZANOTTI, E.M., MAGALHÃES, L.A., PIEDRABUENA, A.E. Morfologia e desenvolvimento de *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907 em infecções unissexuais experimentalmente produzidas no camundongo. **Rev.Saúde públ., S.Paulo**, v.16, p.114-19, 1982 b.

ZANOTTI, E.M. & MAGALHÃES, L.A. Granulomas esquistossomóticos em vísceras de *Mus musculus* infectados pelas linhagens BH e SJ de *Schistosoma mansoni*, com especial referência ao pâncreas. **Resumos do VI Congresso da Federacion Latinoamericana de Parasitologia,(SP)** p. 64, 1983.

APÊNDICE A **Análise Estatística da área dos granulomas hepáticos em camundongos NOD/Uni**

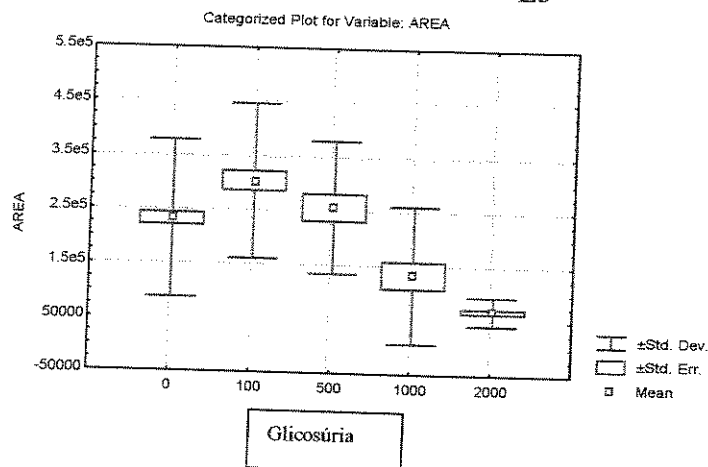
Figura 10

ANÁLISE DAS MEDIDAS DOS GRANULOMAS NO GRUPO DOS ANIMAIS MACHOS DIABÉTICOS E NÃO DIABÉTICOS

Summary of all Effects; design: (finalmd.sta)

1-GLICOSÚRIA

	df	MS	df	MS	F	p-level
Effect	Effect	Error	Error			
1	4	43426258	288	16898576	25.69818	.000000
	E4	E3				



Means (finalmd.sta)
1 Dependent Variable

	ÁREA	Valid N
G_1:0	231727.8	133
G_2:100	302805.5	68
G_3:500	256275.1	22
G_4:1000	132911.7	25
G_5:2000	68159.4	45
All Groups	216514.0	293

Standard Deviations (finalmd.sta)
1 Dependent Variable

	ÁREA	Valid N
G_1:0	145086.7	133
G_2:100	142441.5	68
G_3:500	121830.3	22
G_4:1000	126902.2	25
G_5:2000	26360.6	45

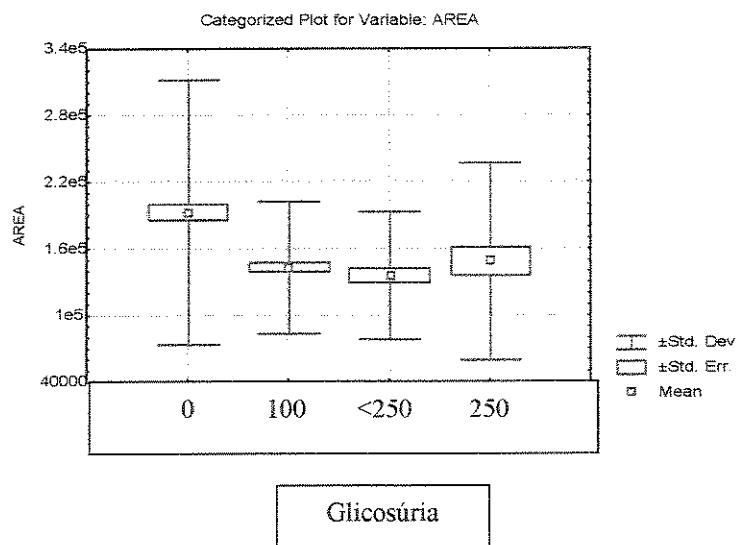
ANÁLISE DAS MEDIDAS DOS GRANULOMAS DO GRUPO DAS FÊMEAS NÃO DIABÉTICAS E FÊMEAS DIABÉTICAS

Figura 11

Summary of all Effects; design: (macdia~2.sta)

1-GLICOSÚRIA

	df	MS	df	MS	F	p-level
Effect	Effect	Error	Error			
1	3	12027608	552	89127290	13.49486	.000000
		E4		88		



macdia~2.sta)
1 Dependent Variable

	ÁREA	Valid N
G_1:0	192576.7	261
G_2:100	142817.6	170
G_3: <250	135539.1	75
G_4:250	148348.1	50

Standard Deviations (macdia~2.sta)
1 Dependent Variable

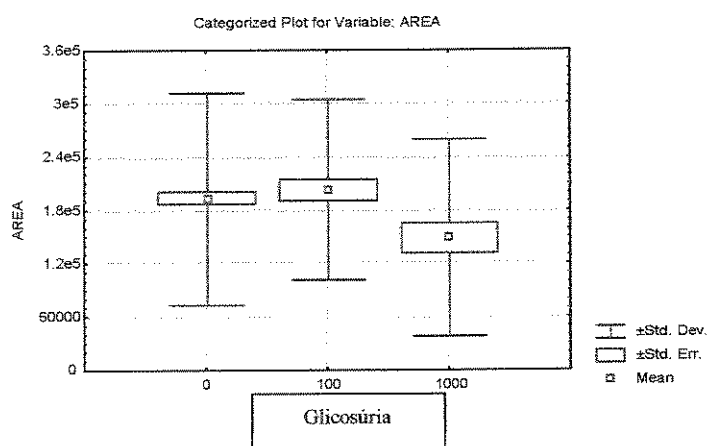
	ÁREA	Valid N
G_1:0	119086.0	261
G_2:100	59722.7	170
G_3: <250	57322.2	75
G_4:250	88836.1	50

ANÁLISE DAS MEDIDAS DOS GRANULOMAS DO GRUPO DAS FÊMEAS NÃO DIABÉTICAS E FÊMEAS DIABÉTICAS PRENHES

Figura 12

Summary of all Effects; design:
1-GLICOSÚRIA

	df	MS	df	MS	F	p-level
Effect	Effect	Effect	Error	Error		
1	2	40996401	361	13313613	3.079284	.047202
		E3		E3		



Means
1 Dependent Variable

	ÁREA	Valid N
G_1:0	192576.7	261
G_2:100	202932.3	62
G_3:1000	148673.3	41

Standard Deviations
1 Dependent Variable

	ÁREA	Valid N
G_1:0	119086.0	261
G_2:100	101492.6	62
G_3:1000	110756.9	41

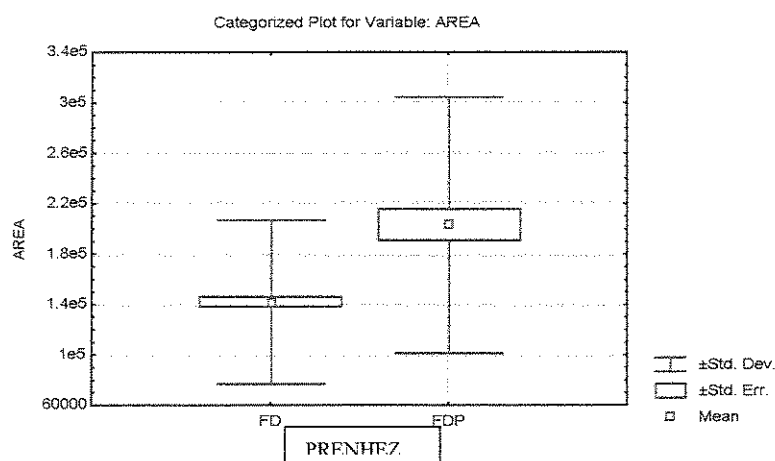
ANÁLISE DAS MEDIDAS DOS GRANULOMAS DAS FÊMEAS DIABÉTICAS E DAS FÊMEAS DIABÉTICAS PRENHES

Figura 13

Summary of all Effects; design: (fdpvsfd.sta)

1-PRENHEZ

	df	MS	df	MS	F	p-level
Effect	Effect	Error	Error			
1	1	19081021	355	52570250	36.29623	.000000
		E4		24		



Means (fdpvsfd.sta)

1 Dependent Variable

	ÁREA	Valid N
G_1:0	141904.5	295
G_2:1	202932.3	62

Standard Deviations (fdpvsfd.sta)

1 Dependent Variable

	ÁREA	Valid N
G_1:0	64888.7	295
G_2:1	101492.6	62

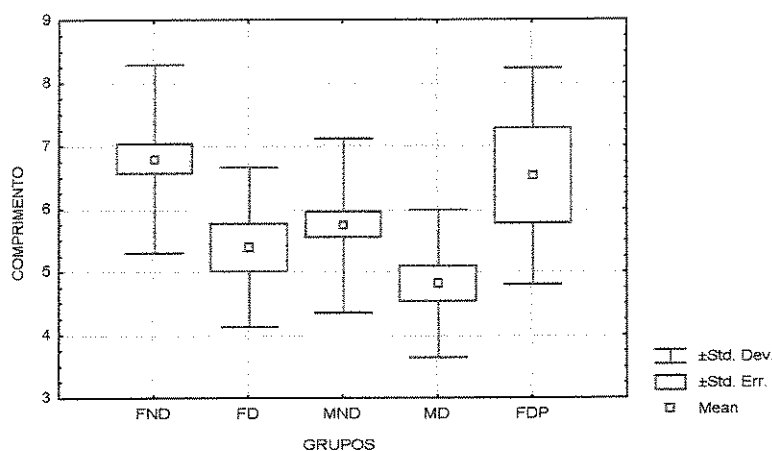
APÊNDICE B

ANÁLISE ESTATÍSTICA DO EFEITO DO DIABETES SOBRE O COMPRIMENTO DE VERMES ADULTOS DE *Schistosoma mansoni*

RESULTADOS PARA VERMES FÊMEOS

Figura 14

Diagrama de caixa (Box-plot) para comprimento de vermes fêmeas do *S. mansoni* em camundongos NOD/Uni fêmeas e machos diabéticos e não diabéticos e fêmeas diabéticas prenhas. Fêmea não diabética (FND), Fêmea diabética (FD), Macho não diabético (MND), Macho diabético (MD) e fêmea diabética prenha (FDP).



Teste de Tukey para a média de comprimento dos vermes fêmeos nos grupos experimentais infectados

Means (vf.sta)
1 Dependent Variable

GRUPOS	COMPRIMENTO (mm)	N
FND (1)	6.79 a	36
FD (2)	5.39 b	11
MND (3)	5.73 b	46
MD (4)	4.81 b	17
FDP (5)	6.51 ab	5
Todos os grupos	5.92	115

Obs. Letras iguais não diferem significativamente, letras diferentes diferem

Standard Deviations (vf.sta)
1 Dependent Variable

GRUPOS	COMPRIMENTO	Valid N
FND	1.489180	36
FD	1.266060	11
MND	1.379890	46
MD	1.174139	17
FDP	1.714841	5
All Groups	1.532371	115

Tukey HSD test; variable COMPRI (vf.sta)
Probabilities for Post Hoc Tests
MAIN EFFECT: DIABETE

	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}
MEDIAS	6.790000	5.390909	5.734783	4.811765	6.514000
FND {1}		.034145	.008118	.000152	.993737
FD {2}	.034145		.947665	.818949	.567437
MND {3}	.008118	.947665		.141524	.757858
MD {4}	.000152	.818949	.141524		.122129
FDP {5}	.993737	.567437	.757858	.122129	

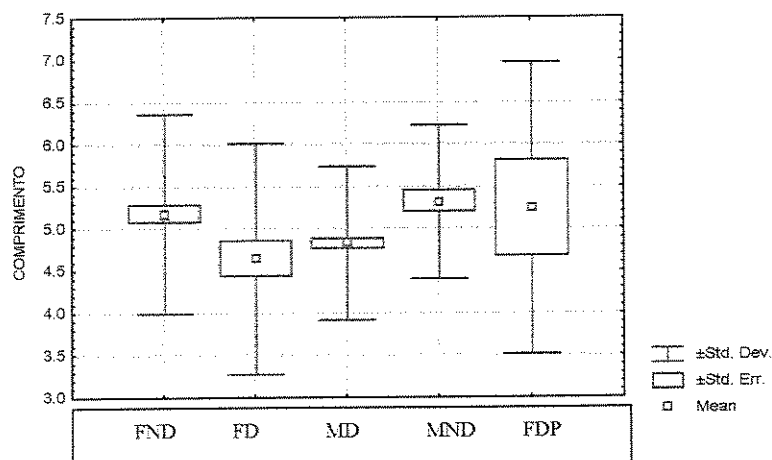
Números em negrito indicam que as médias diferem para um nível de 5% de significância

RESULTADOS PARA VERMES MACHOS

Figura 15

Summary of all Effects; design: (vm.sta)
1-DIABETE

	df	MS	df	MS	F	p-level
Effect	Effect	Error	Error			
1	4	5.362305	492	1.093294	4.904722	.000693



Teste de Tukey para a média de comprimento dos vermes machos nos grupos experimentais infectados

Means (vm.sta)
1 Dependent Variable

GRUPOS	COMPRI	Valid N
FND (1)	5.18 a	127
FD (2)	4.64 b	38
MD (3)	4.83 b	49
MND (4)	5.31 ac	274
FDP (5)	5.24 ab	9
All Groups	4.96	497

Obs. Letras iguais não diferem significativamente, letras diferentes diferem

Standard Deviations (vm.sta)
1 Dependent Variable

GRUPOS	COMPRI	Valid N
FND	1.185	127
FD	1.370	38
MD	.9128	49
MND	.913	274
FDP	1.731	9
All Groups	1.062	497

Tukey HSD test; variable COMPRI (vm.sta)
Probabilities for Post Hoc Tests
MAIN EFFECT: DIABETE

	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}
MEDIAS	5.175591	4.642105	4.825912	5.312245	5.240000
FND {1}		.045832	.015797	.937272	.999773
FD {2}	.045832		.848364	.025214	.534687
MD {3}	.015797	.848364		.022755	.769127
MND {4}	.937272	.025214	.022755		.999707
FDP {5}	.999773	.534687	.769127	.999707	

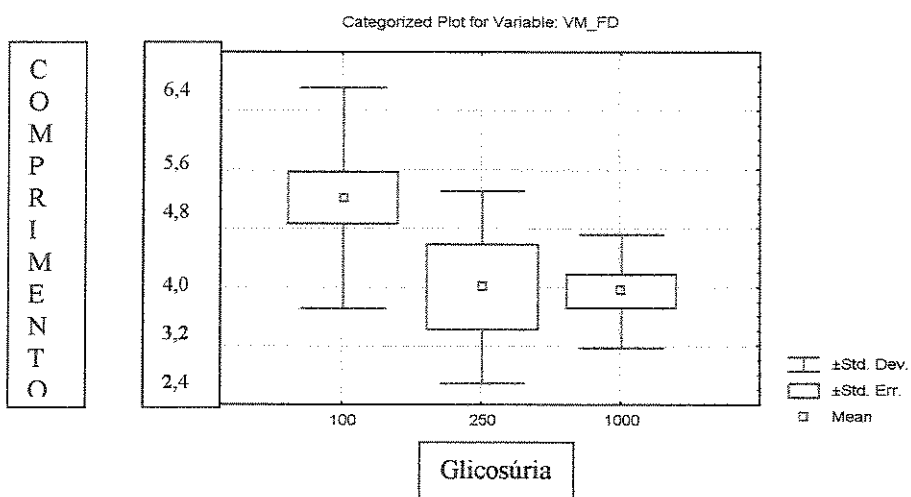
Números em negrito indicam que as médias diferem para um nível de 5% de significância

ANÁLISE DOS COMPRIMENTOS DOS VERMES MACHOS EM FÊMEAS DIABÉTICAS (não prenhes), EM FUNÇÃO DA GLICOSÚRIA

Figura 16

Summary of all Effects; design: (vermxglic.sta)
1-GLICOSÚRIA

	df	MS	df	MS	F	p-level
	Effect	Effect	Error	Error		
1	2	163.6467	31	42.59021	3.842355	.032303



Means (vermxglic.sta)
1 Dependent Variable

	VM_FD	Valid N
G_1:100	5,21	19
G_2:250	4,00	5
G_3:1000	3,94	10
All Groups	4,65	34

Standard Deviations (vermxglic.sta)
1 Dependent Variable

	VM_FD	Valid N
G_1:100	1,501057	19
G_2:250	1,309121	5
G_3:1000	0,774565	10
All Groups	1,413180	34

**ANÁLISE DOS COMPRIMENTOS DOS VERMES MACHOS EM MACHOS
DIABÉTICOS, EM FUNÇÃO DA GLICOSÚRIA**

Figura 17

Summary of all Effects; design: (vermxglic.sta)
1-GLICOSÚRIA

	df	MS	df	MS	F	p-level
	Effect	Effect	Error	Error		
1	1	146.3021	38	16.57504	8.826649	.005124

Means (vermxlic.sta)
1 Dependent Variable

	VM_MD	Valid N
G_1:100	5,63	30
G_2:2000	4,75	10
All Groups	5,41	40

Standard Deviations (vermxglic.sta)
1 Dependent Variable

	VM_MD	Valid N
G_1:100	0,903042	30
G_2:2000	0,414326	10
All Groups	0,892219	40

