

## ESQUISTOSSOMOSE MANSÔNICA HEPATOESPLÊNICA HUMANA: PRODUÇÃO DE TNF- $\alpha$ EM MONÓCITOS

### HEPATOSPLENIC HUMAN SCHISTOSOMIASIS: TNF- $\alpha$ PRODUCTION IN MONOCYTES

Carlos Teixeira Brandt, TCBC-PE<sup>1</sup>  
Carlos Roberto Carvalho Leite<sup>2</sup>  
Célia M. M. B de-Castro<sup>3</sup>  
Raul Manhães-de-Castro<sup>4</sup>  
Carlos Brandt Filho<sup>5</sup>

**RESUMO: Objetivo:** Investigar os níveis de liberação de TNF- $\alpha$  em cultura de monócitos em portadores humanos da forma hepatoesplênica de esquistossomose mansônica. **Método:** Foram incluídos aleatoriamente, no estudo, 39 voluntários de idades variando entre 15 e 31 anos, 19 homens e 20 mulheres, divididos em três grupos. Grupo 1 (GC) 12 indivíduos saudáveis, sem esquistossomose. Grupo 2 (AI) 18 indivíduos portadores de esquistossomose mansônica na forma hepatoesplênica, que tinham se submetido a esplenectomia, ligadura da veia gástrica esquerda e auto-implante de tecido esplênico no omento maior, quando tinham idades entre 7 e 16 anos. Esses pacientes receberam oxaminiquine na dose de 20mg/kg 30 dias antes do procedimento cirúrgico. O seguimento médio atual é de cerca de 8 anos. Grupo 3 - pacientes esplenectomizados sem auto-implante esplênico (ESAI) constituído de nove adultos jovens que tinham se submetido à esplenectomia sem auto-implante esplênico e desconexão ázigo-porta. Os pacientes esquistossomóticos dos grupos 2 e 3 tiveram confirmação dessa doença pela presença de fibrose de Symmers nas biópsias hepáticas realizadas durante o ato cirúrgico. Foram colhidos 6 ml de sangue periférico de cada um dos voluntários incluídos no presente estudo, cujos monócitos foram separados por centrifugação e cultivados no meio de cultura Cultilab®). Amostras de 100 $\mu$ l do sobrenadante da cultura de monócitos (10<sup>6</sup> células/ml), de cada indivíduo dos três grupos, eram colhidas para determinação das concentrações de TNF- $\alpha$ . Essa concentração era mensurada pelo estudo colorimétrico de ELISA para citocinas (Quanticininas<sup>TM</sup> - Sistema R&D), após 4 horas de estimulação com PMA e incubação, em uma atmosfera úmida com 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C. **Resultados:** As concentrações de TNF- $\alpha$  não diferiram significativamente nos três grupos estudados [(GC 135,0  $\pm$  51,6 pg/ml; AI 97,0  $\pm$  25,4 pg/ml e ESAI 107,0  $\pm$  52,1 pg/ml) - ANOVA, F = 0,210; p = 0,813]. **Conclusão:** Os achados contribuem para hipótese de que após esplenectomia com ou sem auto-implante esplênico a função dos monócitos, com relação a produção de TNF- $\alpha$ , mantém-se preservada.

**Descritores:** Esquistossomose mansoni; Baço; Fígado; Esplenectomia; Transplante; Fator de necrose tumoral; Monócitos.

## INTRODUÇÃO

Crianças submetidas à esplenectomia total têm maior susceptibilidade em desenvolverem infec-

ção fulminante pós-esplenectomia (IFPE). Várias medidas têm sido tomadas no sentido da prevenção dessa complicação, potencialmente fatal. Entre elas estão: o uso de vacinas antecedendo a esplenectomia;

1. Prof. Titular de Cirurgia Pediátrica da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)
2. Mestre em Cirurgia - Pós-Graduação em Cirurgia da UFPE
3. Profa. Adjunta do Departamento de Medicina Tropical da UFPE
4. Prof. Adjunto do Departamento de Nutrição da UFPE
5. Bolsista de Iniciação Científica do PIBIC - CNPq/UFPE

Recebido em 15/05/2003

Aceito para publicação em 02/09/2003

Trabalho realizado no Serviço de Cirurgia Geral da Criança do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco.

antibioticoprevenção prolongada e preservação de tecido esplênico ou por esplenectomia parcial ou por auto-implante esplênico no omento maior<sup>1-8</sup>.

Os mecanismos envolvidos na proteção contra a IFPE têm sido investigados e incluem a pesquisa da atividade microbicida dos monócitos e fagócitos em pacientes que tiveram parte do baço preservado ou auto-implantado após esplenectomia<sup>8-10</sup>.

As citocinas estão envolvidas, entre várias funções, e de forma diversa, na resposta inflamatória de pacientes que recebem carga adicional de toxinas por diversos microorganismos. A citocina fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) está envolvida na regeneração hepática quando o hospedeiro entra em contato com agentes que possam danificar o fígado estimulando a regeneração hepática, que em última análise pode participar no mecanismo de defesa desse hospedeiro contra toxinas e/ou infecções<sup>11-15</sup>. Por outro lado, esta citocina desempenha papel crucial na formação do granuloma esquistossomótico e seus altos níveis estão associados a um aumento de risco na fibrose porta esquistossomótica<sup>16-19</sup>.

O presente estudo tem como objetivo avaliar os níveis de produção de TNF- $\alpha$  por monócitos cultivados em amostra de sangue periférico de pacientes jovens portadores de esquistossomose na forma hepatoesplênica, com sangramento digestivo alto, submetidos, quando crianças – sete a dezesseis anos, à esplenectomia, ligadura da veia gástrica esquerda e auto-implante de tecido esplênico no omento maior.

## MÉTODO

Trinta e nove voluntários de idades variando entre 15 e 31 anos, 19 homens e 20 mulheres, foram divididos em três grupos.

Grupo 1 (GC) -12 indivíduos sadios, sem esquistossomose. A ausência de infecção por *Schistosoma mansoni* foi confirmada após três Kato Katz negativos feitos em dias alternados.

Grupo 2 (AI) -18 indivíduos portadores de esquistossomose mansônica na forma hepatoesplênica, procedentes de zona endêmica para esquistossomose com Kato Katz positivo, submetidos à esplenectomia, ligadura da veia gástrica esquerda e auto-implante de 100g de tecido esplênico no omento maior, quando tinham idades entre sete e 16 anos. Esses pacientes receberam oxaminiquine na dose de 20mg/kg, 30 dias antes do procedimento cirúrgico.

Todos os pacientes foram incluídos de forma aleatória, de acordo com suas voltas para seguimento no ambulatório de esquistossomose cirúrgica do Serviço de Cirurgia Geral da Criança – Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco. Esses pacientes são submetidos a uma rotina de investigação clínica, laboratorial, endoscópica e ultrasonográfica desde o período pré-operatório e a cada seis meses no seguimento pós-operatório. O seguimento médio atual é de cerca de oito anos.

Cintigrafia com enxofre coloidal marcado com tecnécio<sup>99m</sup> tem sido usado anualmente, para confirmação da esplenose eficiente – quando o número de nódulos esplênicos é maior que três. Os pacientes incluídos no presente estudo apresentavam esplenose eficiente.

Grupo 3 - Nove adultos jovens submetidos à esplenectomia sem auto-implante esplênico (ESAI) e desconexão ázigo-porta. Todos eram portadores comprovados de esquistossomose hepatoesplênica.

Os pacientes esquistossomóticos dos grupos 2 e 3 tiveram confirmação dessa doença pela presença de fibrose de Symmers nas biópsias hepáticas realizadas durante o ato cirúrgico.

Foram colhidos 6ml de sangue periférico de cada um dos voluntários incluídos no presente estudo. O sangue era centrifugado a 1.640 RPMI separado por gradiente de densidade no Histopaque 1077 (Sigma-Aldrich®), sendo o sedimento celular colhido. Após duas lavagens era re-suspensão, seguindo-se nova centrifugação a 1.640 RPM. O novo sedimento era suplementado com soro fetal bovino (Cultilab®), penicilina 1.000U/ml, estreptomicina (100 $\mu$ g/ml) e anfotericina B (0,25 $\mu$ g/ml). A densidade de monócitos, obtida no sobrenadante era de  $1 \times 10^6$  células/ml. Os monócitos eram transferidos para um tubo de cultura com poços de 35mm de diâmetro (2ml/poço, Falcon®).

Resumidamente, amostra de 100ml da cultura de monócitos ( $10^6$  células/ml), de cada indivíduo dos três grupos, era colhida para determinação da concentração de TNF- $\alpha$ . Essa concentração era mensurada pelo estudo colorimétrico de ELISA para citocinas (Quanticininas<sup>TM</sup> – Sistema R&D), após 4 horas de estimulação com PMA e incubação, em uma atmosfera úmida com 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C.

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética do Centro de Ciências da Saúde e os voluntários assinaram termo de consentimento para o desenvolvimento da pesquisa.

Os dados foram expressos por suas médias e desvios padrão. O número de dados em cada experimento refere-se as amostras separadas de cada voluntário. Foi utilizado o teste “t” de Student para amostras não pareadas. A análise de variância (ANOVA) foi usada para avaliação de diferenças entre as médias. Aceitou-se  $p < 0,05$  para rejeição da hipótese de nulidade.

## RESULTADOS

A concentração de TNF- $\alpha$  no sedimento da cultura de monócitos dos três grupos foram similares: GC  $135,0 \pm 51,6$  pg/ml; AI  $97,0 \pm 25,4$  pg/ml e ESAI  $107,0 \pm 52,1$  pg/ml (Tabela 1).

**Tabela 1** – Distribuição das concentrações de TNF- $\alpha$  no sobrenadante da cultura de monócitos dos grupos estudados. Os dados estão expressos por suas médias e desvios padrão (ANOVA,  $F = 0,210$ ;  $p = 0,813$ ).

Grupos	n	Média $\pm$ DP
GC*	12	$135,0 \pm 51,6$ pg/ml
AI**	18	$97,0 \pm 25,4$ pg/ml
ESAI***	09	$107,0 \pm 52,1$ pg/ml

\*GC – Grupo controle; \*\*AI – Grupo com autoimplante esplênico; \*\*\*ESAI – Grupo esplenectomizado sem autoimplante.

## DISCUSSÃO

O baço é importante na resposta imune<sup>20</sup>. Sua remoção acompanha-se da redução da atividade fagocítica por diminuição de macrófagos, de monócitos, dos níveis séricos de IgM, de tuftisina e de linfócitos T supressores<sup>20</sup>. IFPE é mais freqüente em crianças portadoras de doenças hepáticas, como esquistossomose hepatoesplênica, quando comparada com pacientes que se submetem a cirurgias equivalentes<sup>21</sup>. Os microorganismos na corrente sanguínea podem se multiplicar em poucas horas, resultando em um estado vulnerável do paciente quando na ausência do baço e de suas funções<sup>20</sup>.

O auto-implante de tecido esplênico é uma forma de preservar a função imunológica esplênica quando a esplenectomia for inevitável<sup>20-23</sup>. A esplenose pode contribuir na produção de monócitos que mantêm a atividade microbicida normal, preservando parcialmente a resposta imune do hospedeiro.

No presente estudo, no grupo AI foram incluídos os pacientes que tiveram uma esplenose eficiente. Nenhum desses casos desenvolveu maior freqüência de infecção do que na comunidade ou apresentou sinais ou sintomas de IFPE<sup>7,8,21</sup>.

A esplenose adquire algumas características de todo baço, tais como fluxo vascular rico permitindo uma ocorrência abundante de células inflamatórias, fatores de crescimento e produção de citocinas<sup>24</sup>. A regeneração do tecido esplênico auto-implantado é mais efetiva nos seres humanos jovens do que nos mais idosos<sup>25,26</sup>. Achados similares foram descritos em ratos. A esplenose após auto-implante não apresentou função de proteção em adultos, contudo, os níveis de sobrevivência aumentaram em ratos recém-nascidos, quando eram infectados intencionalmente<sup>26</sup>.

O baço contém uma grande quantidade de monócitos e macrófagos que estão envolvidas na endocitose e degradação intra-celular de moléculas estranhas<sup>20</sup>. A sua remoção constitui-se em obstáculo importante nessas funções e a manutenção, pelo menos parcial, de tecido esplênico, como o auto-implante, visa a manter essas atividades de defesa do hospedeiro.

Os monócitos participam da resposta imune através de aderência ao substrato, quimiotaxia, ingestão de células e partículas inertes, fagocitose bacteriana, liberação de mediadores bioativos e citocinas pró-inflamatórias como TNF- $\alpha$  e produção de radicais livres como o ânion superóxido<sup>27</sup>.

Após 30 minutos da aderência dos monócitos ocorre o início de um evento regulador complexo definido por alterações rápidas nos níveis de RNA-m e mediadores inflamatórios como a interleucina 1 (IL-1) e TNF- $\alpha$ <sup>28</sup>. Macrófagos que não estejam aderidos não são capazes de produzir quantidades adequadas de TNF- $\alpha$ . Ao contrário, os macrófagos aderidos aumentam a secreção desta citocina<sup>29</sup>.

Semelhante aos resultados do presente estudo as quantidades normais de TNF- $\alpha$  liberados no sobrenadante das culturas de monócitos dos três grupos estudados indicam uma capacidade normal de geração de citocina pelos monócitos desses pacientes. Além do mais, os resultados dão suporte à hipótese de que os monócitos dos portadores de esquistossomose mansônica, submetidos a tratamento clínico-cirúrgico, com ou sem auto-implante esplênico não modificaram suas capacidades de produzirem aquela citocina, de forma similar ao grupo controle.

A infecção por *S. mansoni* está associado com altos níveis de TNF- $\alpha$ , particularmente na forma hepatoesplênica<sup>16-18</sup>. Aparentemente, os níveis normais de TNF- $\alpha$  encontrados no presente estudo sugerem que exista a indução para produção dessa citocina e que também ocorra a formação do receptor solúvel do TNF- $\alpha$ . Esse receptor estaria ligado ao TNF- $\alpha$  reduzindo a fração livre dessa citocina. A interleucina (IL-10) seria importante na regulação da

resposta imune e possivelmente no controle da própria morbidez da forma humana da esquistossomose mansônica. É provável que a expressão da IL-10 inibindo o TNF- $\alpha$  possa estar associado à resistência e à intensidade da infecção pelo *S. mansoni*<sup>30</sup>. Por outro lado, o estímulo à produção e ao bloqueio de TNF- $\alpha$  estão relacionados aos processos de dano e regeneração do fígado, em diversos processos que levam à necrose e regeneração desse órgão<sup>11-15</sup>.

## ABSTRACT

**Background:** To investigate TNF- $\alpha$  levels released by monocyte culture in bearers of human hepatosplenic schistosomiasis mansoni. **Methods:** In this study we randomly included 39 volunteers with ages from 15 to 31 years, 19 men and 20 women, divided into three groups. Control Group 1 (CG) 12 healthy people without schistosomiasis. Auto implanted spleen group 2 (AIS) 18 young adults with hepatosplenic schistosomiasis mansoni who underwent splenectomy, ligation of the left gastric vein and auto implantation of spleen tissue into the major omentum, when the age varied between 7 and 16 years. These patients received oxaminiquine in a single dose of 20mg/kg 30 days before the surgical treatment. The mean follow-up was about 8 years. Group 3 – splenectomized patients without auto implantation of spleen tissue (SP). Nine young adults were included and underwent total splenectomy without auto implantation of spleen tissue and azigo portal disconnection. The patients with schistosomiasis from groups I and III had the confirmation of their disease by the presence of Symmers fibrosis in the wedge liver biopsies during the surgical procedure. Six 6ml of blood from all volunteers we collected. The monocytes were separated by centrifugation and cultivated in Cultilab® medium. Supernatant samples of 100 $\mu$ l from the monocyte culture (10<sup>6</sup>cells/ml), of each person were taken for the measure of TNF- $\alpha$  concentrations. This measure was performed by colorimetric ELISA (Quantikine™ – R&D systems), after 4 hours of stimulation with PMA and incubation with 37°C humid atmosphere of 5% CO<sub>2</sub>. **Results:** The TNF- $\alpha$  concentrations did not differ significantly among the three groups [(GC 135.0  $\pm$  51.6 pg/ml; AIS 97.0  $\pm$  25.4 pg/ml and SP 107.0  $\pm$  52.1 pg/ml) - ANOVA  $F = 0.210$ ;  $p = 0.813$ ]. **Conclusions:** These findings give support to the hypothesis that after splenectomy with or without auto implantation of spleen tissue the monocyte function, as far as the production of TNF- $\alpha$  is concerned, it is still preserved.

**Key Words:** Schistosomiasis mansoni; Spleen; Liver; Splenectomy; Tumor necrosis factor; Monocytes.

## REFERÊNCIAS

1. Cooney DR, Dearth JC, Swanson SE, et al. - Relative merits of partial splenectomy, splenic reimplantation, and immunization in preventing postsplenectomy infection. *Surgery*, 1979, 86(4): 561-569.
2. Petroianu A, Ferreira VL, Barbosa AJ - Morphology and viability of the spleen after subtotal splenectomy. *Brazilian J Med Biol Res*, 1989, 22(4): 491-495.
3. Rezende V, Petroianu A - Subtotal splenectomy for treatment of severe splenic injuries. *J Trauma*, 1998, 44(5): 933-935.
4. Pachter HL, Grau J - The current status of splenic preservation. *Adv Surg*, 2000, 34: 137-174.
5. Rezende V, Petroianu A. Estado funcional tardio do auto-implante esplênico após trauma complexo do baço humano. *Rev Bras Col Cir*, 2001, 28(3): 165-170.
6. Brandt CT, Araujo LB, Castro CMMB. Autotransplantation of spleen tissue in children with mansonic schistosomiasis who underwent splenectomy: evaluation of splenic residual functions. *Acta Cir Bras* [Serial on line] 1998, Oct/Nov/Dec [cited 23 nov 2003]; 13(4):212-216. Available from: URL: <http://www.scielo.br/scielo>
7. Brandt CT, Maciel DT, Caneca OAF, et al. - Autotransplant of spleen tissue in children with schistosomiasis: evaluation of splenic function after splenosis. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 2001, 96(suppl): 117-122.

8. Brandt, CT, Leite, CRC, Manhaes-de-Castro, R, *et al.* Aderência e atividade microbicida de monócitos em portadores de esquistossomose mansônica na forma hepatoesplênica cirúrgica. *Acta Cir. Bras.* [online]. mar./abr. 2003, vol. 18, no.2 [citado 25 Novembro 2003], p.143-153. Available from: URL: <<http://www.scielo.br/scielo>>
9. Petroianu A, Barbosa AJ - Quantitative studies on macrophages phagocytosis in whole spleen and in remnant of subtotal splenectomy. *Med Sci Res*, 1991, 19: 373-375.
10. Petroianu A, Simal CJ, Barbosa AJ - Assesment of phagocytic function in remnants of subtotal splenectomy and in autologous spleen implantation. *Med Sci Res*, 1993, 21: 715-717.
11. Callery MP, Kamei T, Flye MW - Kupffer cell tumor necrosis factor-alpha production is suppressed during liver regeneration. *J Surg Res*, 1991, 50(5): 515-519.
12. Miyamoto K, Nagakawa J, Hishinuma I, et al. - Suppressive effects of E3330, a novel quinone derivative, on tumor necrosis factor-alpha generation from monocytes and macrophages. *Agents Actions*, 1992, 37(3-4): 297-403.
13. Akerman PA, Cote PM, Yang SQ, et al. - Long-term ethanol consumption alters the hepatic response to the regenerative effects of tumor necrosis factor-alpha. *Hepatology*, 1993, 17(6): 1066-1073.
14. Kubo Y, Yasunaga M, Masuhara M, et al. - Hepatocyte proliferation induced in rats by lead nitrate is suppressed by several tumor necrosis factor alpha inhibitors. *Hepatology*, 1996, 23(1): 104-114.
15. Kimura T, Sakaida I, Terai S, et al. - Inhibition of tumor necrosis factor- $\mu$  production retards liver regeneration after partial hepatectomy in rats. *Biochem Biophys Res Commun*, 1997, 231(3): 557-560.
16. Haseeb MA, Shirazian DJ, Preis J - Elevated serum levels of TNF-alpha, sTNF-RII in murine schistosomiasis correlate with schistosome oviposition and circumoval granuloma formation. *Cytokine*, 2001, 15(5): 266-269.
17. Araujo MI, Bliss SK, Suzuki Y, et al. - Interleukin-12 promotes pathologic liver changes and death in mice coinfectd with *Schistosoma mansoni* and *Toxoplasma gondii*. *Infect Immun*, 2001, 69(3): 1454-1462.
18. Henri S, Chevillard C, Mergani A, et al. - Cytokine regulation of periportal fibrosis in humans infected with *Schistosoma mansoni*: IFN-gamma is associated with protection against fibrosis and TNF-alpha with aggravation of disease. *J Immunol*, 2002, 169(2): 929-936.
19. de Jesus AR, Silva A, Santana LB, et al. - Clinical and immunologic evaluation of 31 patients with acute schistosomiasis mansoni. *J Infect Dis*, 2002, 185(1): 98-105.
20. Kays MA, Stolar CJH. - "The spleen and splenectomy: implication for the pediatric population". In Fonkalsrud EW, Krumel TM (eds) - *Infectious and immunologic disorders in pediatric surgery*. Philadelphia. WB Saunders Company, 1993, pp. 91-100.
21. Brandt CT, Moraes Filho JL, Tavares DJS - Esquistossomose mansônica avançada em crianças: Uso prolongado de antibiótico no pós-operatório imediato em esplenectomia associada ao auto implante esplênico. *An Fac Med Univ Fed Pernamb*, 1992, 37(1): 30-32.
22. McCarthy JE, Redmond PH, Duggan SM, et al. - Characterization of the defects in murine peritoneal macrophage function in the early postsplenectomy period. *J Immunol*, 1995, 155(9): 387-396.
23. Lüdtke FE, Mack SC, Schuff-Werner P, et al. - Splenic function after splenectomy for trauma. Role of autotransplantation and splenosis. *Acta Chir Scand*, 1989, 155(10): 533-539.
24. Patel JM, Williams JS, Shmigel B, et al. - Preservation of splenic function by autotransplantation of traumatized spleen in man. *Surgery*, 1981, 90(4): 683-688.
25. Pabst R, Kamran D - Autotransplantation of splenic tissue. *J Pediatr Surg*, 1986, 21(2): 120-124.
26. Willführ KU, Wertermann J, Pabst R - Splenic autotransplantation provides protection against fatal sepsis in young but not in old rats. *J Pediatr Surg*, 1992, 27(9): 1207-1212.
27. Zapolska-Downar D, Naruszewicz M, Zapolska-Downar A, et al. - Ibuprofen inhibits adhesiveness of monocytes to endothelium and reduces cellular oxidative stress in smokers and no-smokers. *Eur J Clin Invest*, 2000, 30(11): 1002-1010.
28. Sporn SA, Eierman DF, Johnson CE, et al. - Monocyte adherence results in selective induction of novel genes sharing homology with mediators of inflammation and tissue repair. *J Immunol*, 1990, 144(11): 4434-4441.
29. Bauer GJ, Arbabi S, Garcia IA, et al. - Adherence regulates macrophage signal transduction and primes tumor necrosis factor production. *Shock*, 2000, 14(4): 435-440.
30. Corrêa-Oliveira R, Malaquias LCC, Falcão PL, et al. - Cytokines as determinants of resistance and pathology in human *Schistosoma mansoni* infection. *Braz J Med Biol Res*, 1998, 31(1): 171-177.

Endereço para correspondência:

Carlos Teixeira Brandt, TCBC

Av. Boa Viagem, 5090

Edf. Lula Cardoso Ayres - Apto. 1201 - Boa Viagem

50011-000 – Recife-PE

E-mail: carlosbrandt@bol.com.br