

Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Centro de Pesquisas René Rachou
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DAS CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS NA
TERAPÊUTICA DA ESQUISTOSSOMOSE MANSONI EXPERIMENTAL**

por

VITOR HUGO SIMÕES MIRANDA

Belo Horizonte

2016

DISSERTAÇÃO MCS-CPqRR V.H.S. MIRANDA 2016

VITOR HUGO SIMÕES MIRANDA

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DAS CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS NA
TERAPÊUTICA DA ESQUISTOSSOMOSE MANSONI EXPERIMENTAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisas René Rachou, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências na área de concentração Biologia Celular e Molecular.

Orientação: Dr. Carlos Eduardo Calzavara Silva
Coorientação: Dra. Adriana Bozzi

Belo Horizonte

2016

Catálogo-na-fonte
Rede de Bibliotecas da FIOCRUZ
Biblioteca do CPqRR
Segemar Oliveira Magalhães CRB/6 1975

M672a Miranda, Vitor Hugo Simões.
2016

Avaliação do efeito das células-tronco mesenquimais na terapêutica da esquistossomose mansoni experimental / Vitor Hugo Simões Miranda. – Belo Horizonte, 2016.

XX, 98 f.: il.: 210 x 297 mm.
Bibliografia: 108 - 116

Dissertação (mestrado) – Dissertação para obtenção do título de Mestre em Ciências pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisas René Rachou. Área de concentração: Biologia Celular e Molecular.

1. Esquistossomose mansoni/quimioterapia 2. *Schistosoma mansoni*/patogenicidade 3. Praziquantel /uso terapêutico. I. Título. II. Silva, Carlos Eduardo Calzavara (Orientação). III. Bozzi, Adriana (Coorientação).

CDD – 22. ed. – 616.963

VITOR HUGO SIMÕES MIRANDA

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DAS CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS NA
TERAPÊUTICA DA ESQUISTOSSOMOSE MANSONI EXPERIMENTAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisas René Rachou, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências na área de concentração Biologia Celular e Molecular.

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Carlos Eduardo Calzavara Silva (Fiocruz-Minas) Presidente
Prof.(a) Dr.(a) Andrea Teixeira de Carvalho (Fiocruz-Minas) Titular
Prof. Dr. Alfredo Miranda de Goes (UFMG) Titular
Prof.(a) Dr.(a) Roberta Oliveira Prado (Fiocruz-Minas) Suplente

Dissertação defendida e aprovada em Belo Horizonte, 29/02/2016

“Os mestres sábios, aqueles que ensinaram muitas pessoas a fazer o que é certo, brilharão como as estrelas do céu, com um brilho que nunca se apagará.”
(Daniel 12:3)

Dedico ao meu amado Jesus, por ser a Rocha de Salvação que sempre me sustenta e capacita para toda boa obra. Aos meus preciosos familiares por terem sonhado comigo os meus sonhos, comemorado minhas vitórias e tornado meus insucessos ao longo desta vida mais amenos.

AGRADECIMENTOS

À Deus por me criar, sustentar, amar e salvar.

À minha amada esposa pelo carinho, paciência e encorajamento.

Aos meus pais, pelo carinho e incentivo.

Aos meus irmãos e cunhadas, pela amizade e apoio.

À minha família, pelos momentos de alegria e palavras de incentivo.

À Dra. Adriana Bozzi pela confiança e amizade, por me abrir as portas da ciência e pela orientação durante todo esse percurso. Seu imenso apoio e ensinamentos foram fundamentais para a conclusão desse trabalho.

Ao Dr. Carlos Eduardo Calzavara Silva pela amizade, colaboração e ensinamentos.

À Dra. Érica Alessandra Rocha Alves pelo exemplo de integridade, incentivo e colaboração.

Ao Dr. Marcelo Antônio Pascoal Xavier pelo exemplo, aprendizado, inspiração e colaboração.

Ao Dr. Rodrigo Corrêa Oliveira pelo apoio.

À Dra. Jaqueline Germano de Oliveira pela colaboração e ensinamentos.

Aos pesquisadores do ICM: Soraya Gaze, Bárbara Quinan, Jacqueline Fiuza, Roberta Prado, Rafael e Kelly Bicalho pela colaboração e convivência agradável.

À Talita Rocha, Dirli Emerick e Lorena de Cássia por toda ajuda, trabalho em equipe, incentivo, conselhos, conversas e brincadeiras que deixaram os dias mais leves.

À Clari Lopes Gandra Martins pela enorme disponibilidade e competência. Muito obrigado por sempre facilitar nosso trabalho.

À Fernanda César pela colaboração e apoio.

Aos técnicos do ICM: Luciana Lisboa, Vinícius Paz, Ana Pacheco e Ricardo Ribeiro, pelo auxílio.

À Anna Carolina, Izabella Andrade, Emerson de Castro, Jorge Ferreira, Juliana Ferreira, Yasmin Chalfoun, Nayara Medeiros, Stella Colombarolli, Eneida Santos, Luiza Carvalho, Teresiana Velikkakam, Carolina Bertini e Amanda Helen pela amizade, paciência, aprendizado e companheirismo.

Aos colegas da Pós-Graduação, especialmente Jairo e Jéssica.

À Fundação Oswaldo Cruz, ao Centro de Pesquisas René Rachou e ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde pela oportunidade e infraestrutura.

À Biblioteca do CPqRR por fornecer acesso à informação técnico-científica e pela catalogação e normalização desta dissertação, obrigado.

Aos funcionários do CPqRR que, de alguma forma, tornaram possível a realização deste trabalho, obrigado.

À Comissão de Aperfeiçoamento de Pessoal do Nível Superior (CAPES) pelo financiamento da bolsa de mestrado.

Ao Departamento de Anatomia Patológica da FM-UFMG pela cooperação e disposição em ajudar.

Ao Laboratório de Patologia Molecular da FM-UFMG por todo apoio.

RESUMO

A inflamação constitui um mecanismo de defesa local, porém, a falta de controle dessa reação pode causar severos danos aos tecidos. As células-tronco mesenquimais (CTMs) podem se diferenciar em múltiplos tipos celulares *in vitro* e *in vivo*, contribuindo, por exemplo, para o reparo de tecidos. Além disso, vários estudos demonstraram que as CTMs interagem com células da imunidade inata e adaptativa, levando a modulação negativa de várias funções efetoras, contribuindo assim, para a redução da inflamação. Entretanto, o efeito dessas células sobre a resposta inflamatória associada com doenças infecciosas e parasitárias, como a esquistossomose, ainda é pouco conhecido. Portanto o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito das CTMs derivadas do tecido adiposo (CTM-TA) na reação granulomatosa decorrente da esquistossomose mansoni experimental. Para isto, as CTM-TA foram caracterizadas fenotípica e funcionalmente, por meio da citometria de fluxo, bem como pela indução da diferenciação osteogênica e adipogênica. Posteriormente, as CTM-TA foram injetadas por via intravenosa em camundongos C57BL/6 infectados por *Schistosoma mansoni*, tratados ou não com praziquantel (PZQ). Após 15, 30 e 60 dias do tratamento, foram feitas análises histológicas do baço e fígado dos camundongos, bem como do perfil leucocitário e dosagem da enzima alanina aminotransferase (ALT) sérica. Os resultados mostraram que a recuperação do grupo de camundongos infectados e tratados com as CTM-TA associadas ao PZQ foi superior ao do grupo tratado apenas com PZQ. Observamos também melhorias na estrutura histológica do fígado, na arquitetura do espaço portal, redução do infiltrado inflamatório portal, na simplificação da constituição celular dos granulomas, fase do granuloma avançada e fibrosa com cicatrização parcial das lesões, melhoria da atividade inflamatória periportal e do parênquima. Além disso, observamos diminuição significativa dos níveis séricos da enzima ALT, e do tamanho dos granulomas, no tratamento associado. Em conclusão, os resultados mostraram que as CTM-TA controlaram a resposta inflamatória decorrente da infecção pelo *S. mansoni*, principalmente quando associadas ao praziquantel.

Palavra-chave: Esquistossomose mansoni / quimioterapia, *Schistosoma mansoni* / patogenicidade, Praziquantel.

ABSTRACT

Inflammation is a local defense mechanism, but, the lack of control of this reaction can cause severe tissue damage. Mesenchymal stem cells (MSCs) can differentiate into multiple cell types *in vitro* and *in vivo*, contributing, for example, for tissue repair. Furthermore, several studies have demonstrated that MSCs can interact with cells of the innate and adaptive immune system leading to a down-modulation of various effector functions, thus collaborating to reduce inflammation. However, the effect of these cells on the inflammatory response associated with infectious and parasitic diseases, such as schistosomiasis, has not been widely studied. So, the objective of this study was to evaluate the effect of MSCs derived from adipose tissue (MSC-AT) in granulomatous reaction due to the experimental schistosomiasis. Initially, MSC-AT were characterized phenotypically and functionally by flow cytometry, as well as for their osteogenic and adipogenic differentiation. Thereafter, MSC-AT was injected intravenously into C57BL / 6 mice infected with *Schistosoma mansoni*, treated or not with praziquantel (PZQ). After 15, 30 and 60 days of treatment, histologic analysis of the spleen and liver of the mice were taken and the number of blood leukocytes and dosage of the enzyme alanine aminotransferase (ALT) levels. The results showed that recovery from the group of infected mice and treated with MSC-AT associated PZQ was superior to group treated with PZQ. We also observed improvements in the histological structure of the liver, the architecture of the portal space, reduction of inflammatory infiltrate portal, simplifying cell formation of granulomas, advanced granuloma phase and fibrous partial healing of injuries, improvement of periportal inflammatory activity and parenchymal. In addition, we observed a significant reduction in serum levels of ALT enzyme, and granuloma size, the associated treatment. In conclusion, our results showed that MSC-AT control the inflammation associated with *S. mansoni* infection, particularly when associated with praziquantel.

Key-words: Schistosomiasis mansoni / chemotherapy, *Schistosoma mansoni* / pathogenicity, praziquantel / therapeutic use.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	A multipotencialidade das CTMs.....	22
Figura 2	Efeito imunomodulador das CTMs.....	26
Figura 3	Mecanismos induzidos pelas CTMs que contribuem para a modulação da fibrose/cirrose hepática.)	27
Figura 4	Ciclo evolutivo do <i>S. mansoni</i>	30
Figura 5	Estratégia de trabalho para o desenvolvimento do projeto.....	37
Figura 6	Extração do tecido adiposo da região inguinal de camundongos C57BL/6.....	38
Figura 7	Diagrama dos grupos de animais utilizados.....	44
Figura 8	Cultura de CTM-TA.....	52
Figura 9	Análise fenotípica das CTM-TA.....	53
Figura 10	Diferenciação osteogênica.....	54
Figura 11	Diferenciação adipogênica.....	55
Figura 12	Peso corporal de camundongos C57BL/6.....	57
Figura 13	Número de hemácias por microlitro de sangue de camundongos C57BL/6.....	58
Figura 14	Número de leucócitos por microlitro de sangue de camundongos C57BL/6 (15 dias).....	59
Figura 15	Número de leucócitos por microlitro de sangue de camundongos C57BL/6 (30 dias).....	60
Figura 16	Número de leucócitos por microlitro de sangue de camundongos C57BL/6 (60 dias).....	61
Figura 17	Concentração da enzima alanina ALT por mL de soro de camundongos C57BL/6.....	62
Figura 18	Número de vermes recuperados pela perfusão das veias mesentéricas de camundongos C57BL/6.....	63
Figura 19	Esquema dos critérios utilizados para avaliação da arquitetura do espaço porta.....	67
Figura 20	Esquema dos critérios utilizados para avaliação das diferentes fases do granuloma.....	77

	Tamanho dos granulomas no fígado de camundongos C57BL/6 infectados pelo <i>S. mansoni</i> e tratados ou não com PZQ e/ou CTM-TA.....	80
Figura 21	Atividade inflamatória periportal no fígado de camundongos C57BL/6 infectados pelo <i>S. mansoni</i> e tratados ou não com PZQ e/ou CTM-TA.....	81
Figura 22	Imagens representativas de ovos de <i>S. mansoni</i> com diferentes graus de viabilidade.....	85
Figura 23	Esquema dos critérios utilizados para avaliação da polpa vermelha.....	89
Figura 24	Esquema dos critérios utilizados para avaliação da polpa branca	91
Figura 25	Imagens representativas de cortes histológicos do fígado e baço de camundongos não infectados tratados com CTM-TA, associado ao PZQ.....	98
Figura 26		

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Arquitetura hepática de camundongos C57BL/6 infectados pelo <i>S. mansoni</i> e tratados ou não com PZQ e/ou CTM-TA.....	65
Tabela 2	Número de tratos portais no fígado de camundongos C57BL/6 infectados pelo <i>S. mansoni</i> e tratados ou não com PZQ e/ou CTM-TA.....	66
Tabela 3	Arquitetura do espaço portal no fígado de camundongos C57BL/6 infectados pelo <i>S. mansoni</i> e tratados ou não com PZQ e/ou CTM-TA.....	68-69
Tabela 4	Quantidade de infiltrado inflamatório portal no fígado de camundongos C57BL/6 infectados pelo <i>S. mansoni</i> e tratados ou não com PZQ e/ou CTM-TA.....	70
Tabela 5	Presença de granulomas portais no fígado de camundongos C57BL/6 infectados pelo <i>S. mansoni</i> e tratados ou não com PZQ e/ou CTM-TA.....	71
Tabela 6	Quantidade de granulomas no fígado de camundongos C57BL/6 infectados pelo <i>S. mansoni</i> e tratados ou não com PZQ e/ou CTM-TA.....	73
Tabela 7	Constituição dos granulomas no fígado de camundongos C57BL/6 infectados pelo <i>S. mansoni</i> e tratados ou não com PZQ e/ou CTM-TA.....	75
Tabela 8	Fase dos granulomas presentes no fígado de camundongos C57BL/6 infectados pelo <i>S. mansoni</i> e tratados ou não com PZQ e/ou CTM-TA.....	78
Tabela 9	Atividade inflamatória periportal no fígado de camundongos C57BL/6 infectados pelo <i>S. mansoni</i> e tratados ou não com PZQ e/ou CTM-TA.....	82
Tabela 10	Análise da atividade inflamatória no parênquima do fígado de camundongos C57BL/6 infectados pelo <i>S. mansoni</i> e tratados ou não com PZQ e/ou CTM-TA.....	84
Tabela 11	Viabilidade dos ovos de <i>S. mansoni</i> no fígado de	

	camundongos C57BL/6 infectados pelo <i>S. mansoni</i> e tratados ou não com PZQ e/ou CTM-TA.....	86
Tabela 12	Estrutura do baço de camundongos C57BL/6 infectados pelo <i>S. mansoni</i> e tratados ou não com PZQ e/ou CTM-TA.....	88
Tabela 13	Polpa vermelha do baço de camundongos C57BL/6 infectados pelo <i>S. mansoni</i> e tratados ou não com PZQ e/ou CTM-TA.....	90
Tabela 14	Polpa branca do baço de camundongos C57BL/6 infectados pelo <i>S. mansoni</i> e tratados ou não com PZQ e/ou CTM-TA.....	92
Tabela 15	Quantidade de granuloma no baço de camundongos C57BL/6 infectados pelo <i>S. mansoni</i> e tratados ou não com PZQ e/ou CTM-TA.....	94
Tabela 16	Constituição dos granulomas no baço de camundongos C57BL/6 infectados pelo <i>S. mansoni</i> e tratados ou não com PZQ e/ou CTM-TA.....	95-96
Tabela 17	Viabilidade dos ovos no baço de camundongos C57BL/6 infectados pelo <i>S. mansoni</i> e tratados ou não com PZQ e/ou CTM-TA.....	97

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ALT	Alanina aminotransferase
APC	Aloficocianina
APC-Cy7	Aloficocianina combinado ao corante de cianina
CD	Grupo de diferenciação
CEUA	Comissão em Ética no Uso de Animais
CTM	Célula-tronco mesenquimal
CTM-TA	Célula-tronco mesenquimal derivada de tecido adiposo
DMEM	Meio Eagle modificado por Dulbecco
DMSO	Dimetilsulfóxido
DO	Densidade ótica
EDTA	Ácido etilenodiamino tetracético
EGF	Fator de crescimento epidermal
FGF	Fator de crescimento para fibroblasto
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
x g	Força centrífuga
HSC	Célula estrelada hepática
IFN- γ	Interferon gama
IGF-1	Fator de crescimento semelhante à insulina 1
IL	Interleucina
iPS	Célula-tronco de pluripotência induzida
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
MMP	Metaloproteinases de matriz
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBS	Salina tamponada com fosfato
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
PE	Ficoeritrina
PZQ	Praziquantel
SEA	Antígeno solúvel de ovos de <i>S. mansoni</i>
SFB	Soro fetal bovino
TGF- β	Fator de crescimento transformador beta

Th1	Linfócito T auxiliar do tipo 1
Th2	Linfócito T auxiliar do tipo 2
TIMP	Inibidores de metaloproteinases de tecido
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
Treg	Linfócito T regulador
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
XTO	<i>Schistosoma mansoni</i>

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	21
1.1 Células-tronco	21
1.2 Células-tronco mesenquimais no controle da resposta inflamatória e reparo de lesões teciduais.....	23
1.3 Esquistossomose mansoni	28
1.4 Patologia e tratamento	30
2 OBJETIVOS	36
2.1 Objetivo Geral:	36
2.2 Objetivos específicos:	36
3 MATERIAIS E MÉTODOS	37
3.1 Estratégia de Trabalho.....	37
3.2 Extração das células-tronco derivadas do tecido adiposo (CTM-TA).....	37
3.3 Cultura e expansão de CTM-TA.....	39
3.4 Congelamento das CTM-TA.....	39
3.5 Caracterização fenotípica das CTM-TA	40
3.6 Caracterização funcional das CTM-TA	41
3.6.1 Indução da diferenciação osteogênica.....	41
3.6.2 Indução da diferenciação adipogênica.....	42
3.7 Grupos de estudo.....	43
3.8 Infecção com <i>S. mansoni</i> e tratamentos	45
3.9 Determinação do número de hemácias e leucócitos.....	46
3.10 Dosagem da enzima alanina aminotransferase	46
3.11 Determinação da carga parasitária	47
3.12 Análises histopatológicas	47
3.13 Análises estatísticas.....	50
4 RESULTADOS	52
4.1 Cultura e expansão das CTM-TA.....	52
4.2 Caracterização fenotípica das CTM-TA	52

4.3 Caracterização funcional das CTM-TA	53
4.3.1 Diferenciação osteogênica.....	53
4.3.2 Diferenciação adipogênica.....	54
4.4 Influência do tratamento com CTM-TA e/ou praziquantel sobre o peso corporal de camundongos C57BL/6 infectados pelo <i>Schistosoma mansoni</i>	55
4.5 Influência do tratamento com CTM-TA e/ou praziquantel sobre o número de hemácias na circulação sanguínea de camundongos C57BL/6 infectados pelo <i>Schistosoma mansoni</i>	57
4.6 Influência do tratamento com CTM-TA e/ou praziquantel sobre o número de leucócitos na circulação sanguínea de camundongos C57BL/6 infectados pelo <i>Schistosoma mansoni</i>	58
4.7 Influência do tratamento com CTM-TA e/ou PZQ sobre os níveis de alanina aminotransferase (ALT) no soro de camundongos C57BL/6 infectados pelo <i>Schistosoma mansoni</i>	61
4.8 Influência do tratamento com CTM-TA e/ou PZQ sobre a carga parasitária de camundongos C57BL/6 infectados pelo <i>Schistosoma mansoni</i>	63
4.9 Influência do tratamento com CTM-TA e/ou PZQ sobre a morfologia do fígado de camundongos C57BL/6 infectados pelo <i>Schistosoma mansoni</i>	64
4.9.1 Influência do tratamento com CTMs e/ou PZQ sobre a arquitetura do fígado de camundongos C57BL/6 infectados pelo <i>Schistosoma mansoni</i>	64
4.9.2 Influência do tratamento com CTM-TA e/ou PZQ sobre o número de tratos portais no fígado de camundongos C57BL/6 infectados pelo <i>Schistosoma mansoni</i>	66
4.9.3 Influência do tratamento com CTM-TA e/ou PZQ sobre a arquitetura do espaço portal no fígado de camundongos C57BL/6 infectados pelo <i>Schistosoma mansoni</i>	66
4.9.4 Influência do tratamento com CTM-TA e/ou PZQ sobre quantidade de infiltrado inflamatório portal no fígado de camundongos C57BL/6 infectados pelo <i>Schistosoma mansoni</i>	69
4.9.5 Influência do tratamento com CTM-TA e/ou PZQ sobre a presença de granulomas portais no fígado de camundongos C57BL/6 infectados pelo <i>Schistosoma mansoni</i>	71
4.9.6 Influência do tratamento com CTM-TA e/ou PZQ sobre a quantidade de granulomas no fígado de camundongos C57BL/6 infectados pelo <i>Schistosoma mansoni</i>	72
4.9.7 Influência do tratamento com CTM-TA e/ou PZQ sobre a constituição dos granulomas no fígado de camundongos C57BL/6 infectados pelo <i>Schistosoma mansoni</i>	73

4.9.8	Influência do tratamento com CTM-TA e/ou PZQ sobre a fase dos granulomas no fígado de camundongos C57BL/6 infectados pelo <i>Schistosoma mansoni</i>	76
4.9.9	Influência do tratamento com CTM-TA e/ou PZQ sobre o tamanho dos granulomas no fígado de camundongos C57BL/6 infectados pelo <i>Schistosoma mansoni</i>	79
4.9.10	Influência do tratamento com CTM-TA e/ou PZQ sobre a atividade inflamatória periportal no fígado de camundongos C57BL/6 infectados pelo <i>Schistosoma mansoni</i>	81
4.9.11	Influência do tratamento com CTM-TA e/ou PZQ sobre a atividade inflamatória no parênquima do fígado de camundongos C57BL/6 infectados pelo <i>Schistosoma mansoni</i>	83
4.9.12	Influência do tratamento com CTM-TA e/ou PZQ sobre a viabilidade dos ovos no fígado de camundongos C57BL/6 infectados pelo <i>Schistosoma mansoni</i>	85
4.10	Influência do tratamento com CTM-TA e/ou PZQ sobre a morfologia do baço de camundongos C57BL/6 infectados pelo <i>Schistosoma mansoni</i>	86
4.10.1	Influência do tratamento com CTM-TA e/ou PZQ sobre a estrutura do baço de camundongos C57BL/6 infectados pelo <i>Schistosoma mansoni</i>	86
4.10.2	Influência do tratamento com CTM-TA e/ou PZQ sobre a polpa vermelha do baço de camundongos C57BL/6 infectados pelo <i>Schistosoma mansoni</i>	89
4.10.3	Influência do tratamento com CTM-TA e/ou PZQ sobre a polpa branca do baço de camundongos C57BL/6 infectados pelo <i>Schistosoma mansoni</i>	90
4.10.4	Influência do tratamento com CTM-TA e/ou PZQ sobre a quantidade de granuloma no baço de camundongos C57BL/6 infectados pelo <i>Schistosoma mansoni</i>	93
4.10.5	Influência do tratamento com CTM-TA e/ou PZQ sobre a constituição dos granulomas no baço de camundongos C57BL/6 infectados pelo <i>Schistosoma mansoni</i>	94
4.10.6	Influência do tratamento com CTM-TA e/ou PZQ sobre a viabilidade dos ovos no baço de camundongos C57BL/6 infectados pelo <i>Schistosoma mansoni</i>	96
4.10.7	Influência do tratamento com CTM-TA e PZQ sobre camundongos C57BL/6 não infectados pelo <i>Schistosoma mansoni</i>	97
5	DISCUSSÃO	99
6	CONCLUSÃO	107
7	PERSPECTIVAS	107

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	108
ANEXOS	117
Anexo I - Licença da CEUA	117

1 INTRODUÇÃO

1.1 Células-tronco

As células-tronco são células indiferenciadas que podem ser definidas por duas propriedades peculiares: 1) capacidade de auto-renovação, que se refere à capacidade de proliferar e gerar células idênticas à original, e 2) capacidade de diferenciação em diversos tipos de células especializadas sob certas condições fisiológicas ou experimentais (Xin Wei *et al.*, 2013). De acordo com seu potencial de diferenciação, as células-tronco podem ser classificadas em grupos: como totipotentes, pluripotentes e multipotentes (Wagers & Weissman, 2004).

As células-tronco totipotentes têm a capacidade de originar todas as células diferenciadas de um organismo, incluindo tecidos extra-embrionários, como a placenta. Podem ser encontradas nas primeiras fases da embriogênese, desde o ovócito fecundado (zigoto) até o estágio de mórula (Fischbach & Fischbach, 2004).

As células-tronco pluripotentes têm a capacidade de dar origem a células dos três folhetos embrionários (ectoderma, mesoderma e endoderma), que darão origem a todos os tecidos do organismo. Em contrapartida, não podem originar um indivíduo como um todo, pois não são capazes de gerar tecidos extra-embrionários. Nesse grupo podem ser destacadas as células-tronco embrionárias e as células-tronco de pluripotência induzida (Yu & Thomson, 2008).

As células-tronco multipotentes são células adultas com capacidade de gerar células dos tecidos dos quais são provenientes. No entanto, estudos evidenciam que sob condições especiais essas células podem se diferenciar em células de outra origem embriológica (Uccelli *et al.*, 2008).

Entre as células multipotentes, as células-tronco hematopoéticas foram as primeiras descritas na literatura e são muito utilizadas no transplante de medula óssea (Wang *et al.*, 2013). Outro grupo muito estudado são as mesenquimais, livres de preocupações éticas e formação de teratomas (Xin Wei *et al.*, 2013) e que têm se destacado por seu potencial reparador de lesões teciduais e imunomodulador (Caplan, 1991; Uccelli *et al.*, 2008).

Friedeinstein foi a primeira pessoa a identificar a multipotencialidade de células precursoras do estroma, em 1968, as quais foram nomeadas por Caplan como células-tronco mesenquimais (CTMs). O campo de estudos sobre as CTMs tem aumentado progressivamente: 45% das quase 25.000 publicações disponíveis sobre este tema (Pubmed; palavras-chave: "células estromais mesenquimais" ou "células-tronco mesenquimais" ou "células estromais multipotentes") são datadas dos últimos três anos (Fiore EJ *et al.*, 2015). As CTMs caracterizam-se por ser uma população de células multipotentes capazes de se diferenciar e produzir qualquer tipo celular necessário num processo de reparação (Pittenger *et al.*, 1999; Corcione A, *et al.*, 2006). Devido à sua multipotencialidade, as CTMs apresentam potencial de diferenciação em células da linhagem mesodérmica, ectodérmica e endodérmica como osteoblastos, condroblastos, hepatócitos, neurônios, células epiteliais, renais, cardíacas, dentre outras (Figura 1) (Pittenger *et al.*, 1999; Corcione A, *et al.*, 2006).

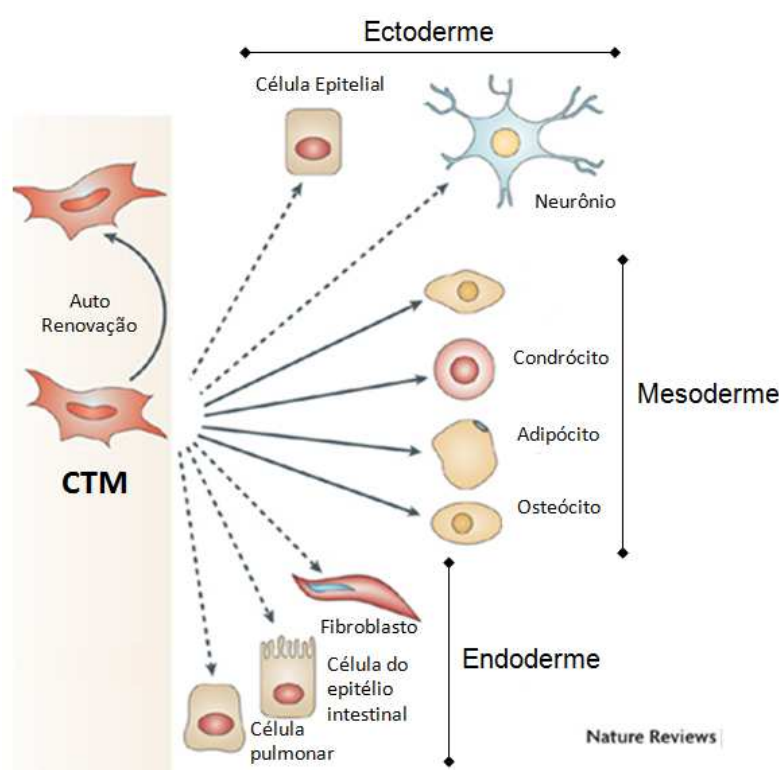


Figura 1: A multipotencialidade das CTMs. As CTMs possuem a capacidade de auto-renovação (seta encurvada) e diferenciação para a linhagem mesodérmica (setas lineares cheias), podendo, também, originar células da ectoderme e endoderme (setas tracejadas). Fonte: Ucelli A. *et al.*, 2008; adaptado.

As CTMs podem ser isoladas de muitos tecidos adultos como medula óssea, músculo, tecido adiposo, polpa do dente, placenta, cordão umbilical, dentre outros (Bianco *et al.*, 2008).

O tecido adiposo só recentemente foi considerado como uma fonte potencial de CTMs, em parte pela fácil obtenção e expansão em cultura, além desse tecido ser fonte abundante dessas células (Zuk *et al.*, 2001). Além disso, foi demonstrado sua superioridade, em termos de imunomodulação *in vitro* em comparação com as CTMs derivadas da medula óssea (Schubert T. *et al.*, 2011).

As CTMs apresentam algumas propriedades como boa aderência ao plástico, morfologia fusiforme, semelhante aos fibroblastos, e capacidade de diferenciação em células especializadas (Uccelli *et al.*, 2008). Alguns critérios básicos são requeridos para a caracterização das CTMs, como a expressão de alguns marcadores de superfície celular, tais como CD29, CD44 e CD71 e ser negativas para marcadores de superfície de células hematopoiéticas (Dominici M, *et al.*, 2006; Aquino, *et al.* JB, 2010). Além disso, devem ser capazes de se diferenciar em osteoblastos, condroblastos e adipoblastos (Pittenger, MF *et al.*, 1999).

1.2 Células-tronco mesenquimais no controle da resposta inflamatória e reparo de lesões teciduais

A inflamação é um processo fisiológico que ocorre em resposta à infecções, ferimentos e exposição à contaminantes, desencadeada por receptores da imunidade inata que reconhecem patógenos e células danificadas. Entre os vertebrados, a cascata inflamatória é uma rede complexa de eventos fisiológicos e imunológicos coordenados por citocinas e outras moléculas sinalizadoras do sistema imune. A falta de controle dessa reação pode causar danos aos tecidos, tornando-a a principal causa patológica de várias enfermidades. As lesões teciduais podem ser mediadas ou não pelo sistema imunitário. Lesões mediadas pelo sistema imunitário podem resultar de doenças autoimunes ou infecções de patógenos ou transplantes alogênicos. A resposta imunitária tem papel fundamental na defesa contra agentes infecciosos e se constitui no principal impedimento para a ocorrência de infecções disseminadas, habitualmente associadas com alto índice de mortalidade. O sistema imunológico atua numa rede de cooperação, envolvendo a participação de muitos

componentes estruturais, moleculares e celulares (Janeway CA., 2001). Embora a resposta imunitária seja fundamental para a defesa contra a maioria dos agentes infectantes, em muitas doenças infecciosas os principais aspectos patológicos não estão relacionados com uma ação direta do agente agressor, mas sim com uma resposta imune exacerbada. Em muitas dessas situações existe uma reação de hipersensibilidade com uma resposta imune exagerada e não modulada, o que conseqüentemente causa a maioria dos danos teciduais, (Cooke A. *et al.*, 2004).

A pesquisa com células-tronco tem sido um dos campos que mais tem evoluído, o qual tem levado ao entendimento do desenvolvimento celular e descoberta de terapêuticas alternativas para doenças de importância em Saúde Pública como degenerativas, negligenciadas, cânceres, doenças do fígado, pulmão, doenças auto-imune e pós-transplante. As CTMs têm se demonstrado muito eficientes no reparo de lesões teciduais (Hossein R. *et al.*, 2015; El-Mahdi M *et al.*, 2014; Wei X *et al.*, 2013; Aziz A *et al.*, 2012; Lee *et al.* 2009; Tzaribachev *et al.*, 2008; Parekkadan *et al.*, 2007). As funções reparativas das CTMs têm sido parcialmente atribuídas as suas funções inibitórias da resposta imune. Estudos evidenciaram que os benefícios terapêuticos das CTMs são oriundos de sua interação com estímulos locais após sua migração para os sítios de injúria. Acredita-se que nos locais de lesão tecidual as CTMs interajam com diferentes estímulos que fazem com que produzam uma variedade de fatores críticos para angiogênese, além de prevenirem a apoptose de células nesses locais (Karp *et al.*, 2009; Wei *et al.*, 2013). Dentre os diversos fatores liberados pelas CTMs encontram-se o fator de crescimento epidermal (EGF), o fator de crescimento para fibroblasto (FGF), o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), o fator de crescimento transformador beta (TGF- β), o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), o fator de crescimento semelhante à insulina 1 (IGF-1), a angiopoetina-1 e o fator derivado de células estromais 1 (SDF-1), que dentre outras propriedades, podem estimular o desenvolvimento de fibroblastos e células endoteliais (Da Silva M *et al.*, 2009). A liberação dessas moléculas pode ser o mecanismo fundamental utilizado pelas CTMs para acelerar o reparo de diversos tipos de injúrias teciduais. O mecanismo de reparo das CTMs sobre os tecidos danificados pode ser diferente, dependendo do tipo de lesão. Por exemplo, lesões do osso, cartilagem, músculo e tendões,

causadas por força mecânica e imperfeita osteogênese, a diferenciação e substituição da célula lesionada pode ser o principal mecanismo (Shi *et al.*, 2010). Fibroblastos e células endoteliais podem ser os tipos celulares mais comumente envolvidos no processo de reparo de lesões. Os fibroblastos são a principal reserva de matriz extracelular, e contribuem para o remodelamento de danos teciduais.

No campo da medicina regenerativa, muitas pesquisas básicas e estudos pré-clínicos são conduzidos com o uso de CTMs. Por meio dessa população celular, pesquisadores têm explorado a segurança e eficácia de CTMs injetadas em diferentes modelos animais. Da mesma forma, dados pré-clínicos e ensaios clínicos em andamento são iniciados em vários campos da medicina e têm sugerido um potencial das CTMs para o tratamento de lesões (Horwitz *et al.*, 1999; Le Blanc *et al.*, 2004; Garcia-Olmo *et al.*, 2005; Parekkadan *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2008; Hayashi *et al.*, 2008; Erokhin *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2009; Karaaltin *et al.*, 2012).

Além de apresentarem a capacidade de indução do reparo tecidual, as CTMs podem interagir com células da imunidade inata e adaptativa levando à modulação de várias funções efetoras (Figura 2) (Uccelli *et al.*, 2008). Estudos tem mostrado que as CTMs apresentam um grande potencial para modular desordens do sistema imunológico, suprimir a inflamação e reduzir danos nos rins e intestino de pacientes com lúpus eritematoso sistêmico e doença de Crohn (Caplan, 2009; Wei *et al.*, 2013).

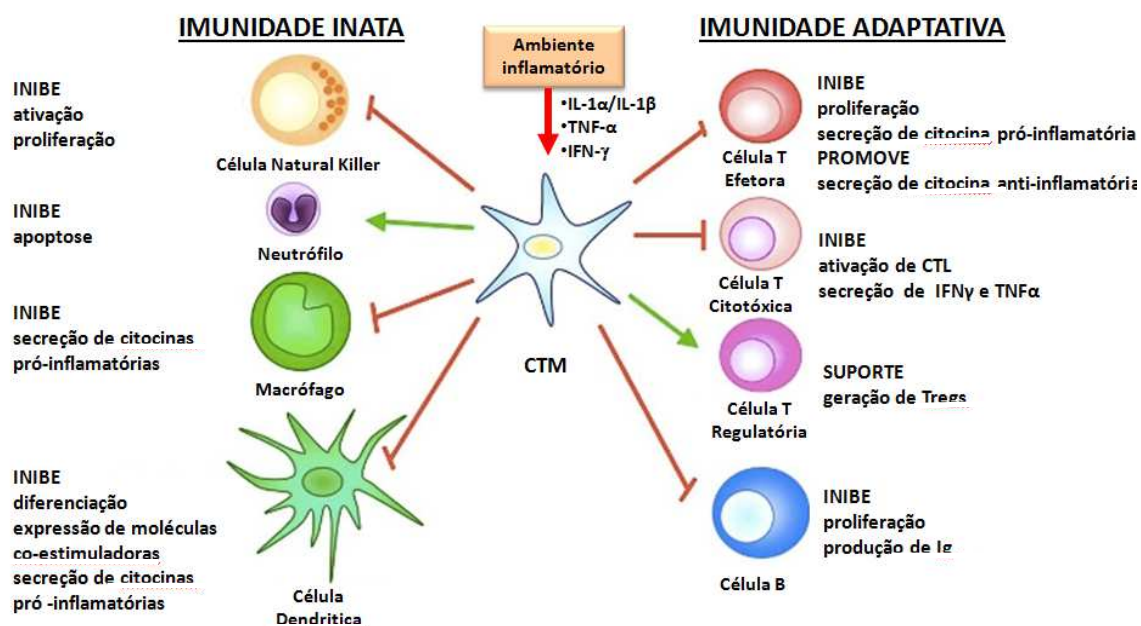


Figura 2: Efeito imunomodulador das CTMs. As CTMs são ativadas em ambiente inflamatório a exercerem o papel imunomodulador, tanto sobre células da resposta imune inata (direita) quanto em células da resposta imune adaptativa (esquerda). Fonte: <http://www.cahs.colostate.edu/events/item/?ID=346>; adaptado.

Diversos trabalhos têm demonstrado que as propriedades imunomodulatórias das CTMs contribuem, em grande parte, para o seu efeito antifibrótico no contexto da fibrose/cirrose do fígado. De acordo com relatos disponíveis, as CTMs induzem, *in vitro* uma melhora na fibrose hepática, principalmente através de mecanismos parácrinos, em grande parte mediados pela modulação da resposta imune (Meier, RP *et al.*, 2013; Cui, L *et al.*, 2014; Gomez-Aristizabal, A., *et al* 2012; Prockop, DJ *et al.*, 2012; Usunier, B. *et al.*, 2014; Di Nicola, M. *et al.*, 2002; Yen, BL. *et al.*, 2013) hepatoproteção reforçada (Meier, RP *et al.*, 2013; Zhang D, *et al.*, 2011; Cho, KA *et al.*, 2012; Nasir, GA. *et al.*, 2013), proliferação celular hepática (Fiore, EJ *et al.*, 2014; Li, P *et al.*, 2013; Jung, J *et al.*, 2013; Chagoya de Sanchez, V *et al.*, 2012) e efeito modulador de colágeno que possivelmente é mediado por alterações nos níveis relativos da expressão de metaloproteinases de matriz (MMPs) e seus inibidores teciduais (TIMPs) (Figura 3) (Aziz MT *et al.*, 2012; Arthur MJ, 2000; McCrudden R *et al.*, 2000).

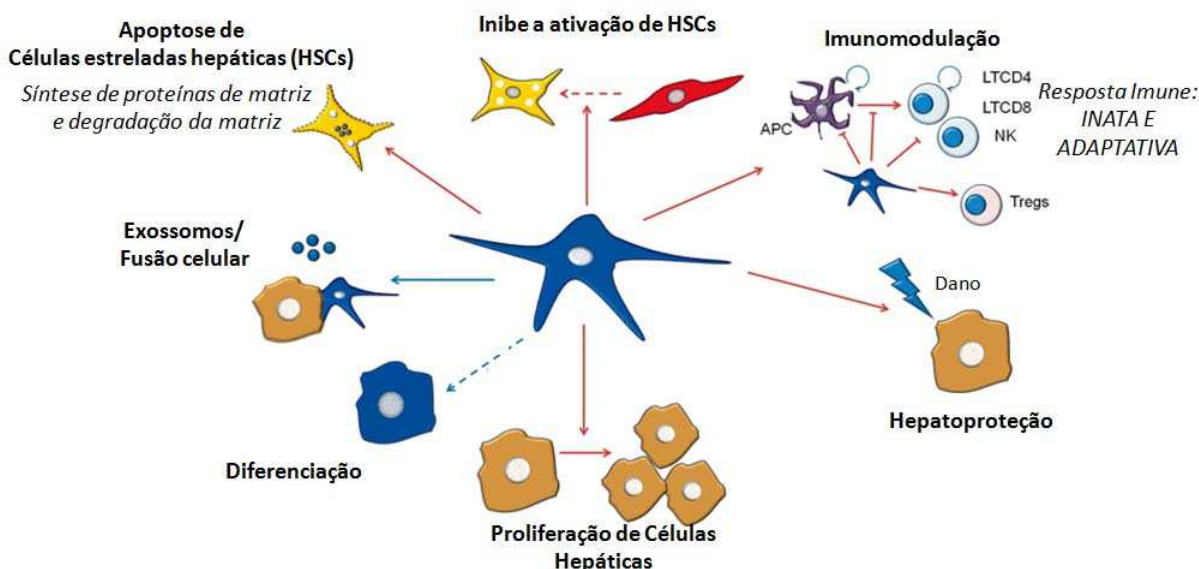


Figura 3: Mecanismos induzidos por CTMs para a modulação da fibrose/cirrose hepática. De acordo com relatos disponíveis *in vitro*, CTMs desempenham benefício na fibrose hepática principalmente através de mecanismos parácrinos (*setas vermelhas*). Além disso, a contribuição por meio da diferenciação de CTMs em células hepáticas, exossomos e fusão celular (*setas azuis*) também têm sido sugeridas. Fonte: Fiore, EJ *et al.*, 2015; adaptado.

O perfil imunológico das CTMs revela a baixa expressão de moléculas do complexo de histocompatibilidade principal (MHC) de classe I. Além disso, elas não expressam antígenos do MHC de classe II e as moléculas co-estimulatórias CD80 (B7-1), CD86 (B7-2), CD40 ou CD40 ligante, na presença ou ausência de interferon gama (IFN- γ), uma das mais potentes citocinas inflamatórias conhecidas (Chang *et al.*, 2006; Parolini *et al.*, 2008; Banas *et al.*, 2008). Essas características indicam que as CTM são células imuno-privilegiadas, capazes de sobreviver em receptores de transplante alogênico imunologicamente incompatíveis. A baixa imunogenicidade associada a atividade regenerativa e imunomodulatória das CTMs tornam-as excelentes candidatas para a terapia de diversas doenças com perfil inflamatório, decorrentes, principalmente, de desordens imunológicas, transplantes e doenças infecciosas e parasitárias. Neste contexto, um exemplo de doença parasitária com perfil inflamatório é a esquistossomose. Consideramos que este modelo é ideal para a avaliação da combinação terapêutica medicamentosa com CTMs. O modelo da esquistossomose está bem estabelecido e o processo patológico é melhor compreendido, facilitando significativamente o estudo do papel das CTMs.

1.3 Esquistossomose mansoni

A esquistossomose é uma doença infecto parasitária provocada por helminto do gênero *Schistosoma*. As quatro espécies de importância médica encontradas parasitando o homem são: *S. haematobium*, *S. japonicum*, *S. mekongi* e *S. mansoni*. Entre as parasitoses que afetam o homem, a esquistossomose é uma das mais disseminadas no mundo, ocorrendo em 54 países endêmicos. No Brasil, as maiores prevalências da esquistossomose são encontradas nas regiões Nordeste e Sudeste do país e fatores biológicos, sociais, políticos e culturais têm contribuído para formação dos quadros endêmicos (Rey 1991).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), a esquistossomose ocupa o segundo lugar depois da malária, pela sua importância e repercussão socioeconômica. Estima-se que 200 milhões de pessoas são afetadas pela doença e mais de 600 milhões de indivíduos vivem em áreas de risco. Embora a esquistossomose apresente um baixo índice de mortalidade, sua acentuada morbidade faz com que estes números sejam preocupantes, sendo ainda considerada um grave problema de saúde pública no país (Brasil, 2014; Who, 2015). A doença possui caráter insidioso, não sendo comum seu diagnóstico em seus estágios iniciais, mas sua evolução pode levar ao desenvolvimento de doenças incapacitantes para homens e mulheres em suas idades mais produtivas (Engels *et al.* 2002).

O ciclo biológico do *S. mansoni* é formado por duas fases parasitárias: uma no hospedeiro definitivo (vertebrado/homem) e outra no hospedeiro intermediário (invertebrado/caramujo) (figura 4). No homem, o ciclo inicia-se com a penetração da cercária, forma larval de vida livre do parasito, na pele ou mucosa. Após penetração das cercárias, iniciam-se várias adaptações bioquímicas e morfológicas que preparam o parasito para sobrevivência no novo ambiente e, assim, surge uma nova forma evolutiva chamada esquistossômulo. A saída dos esquistossômulos da pele ocorre por vasos sanguíneos ou linfáticos e são carregados para os pulmões, onde sofrem algumas alterações, como aumento em seu comprimento. Então são distribuídos para os vasos intra-hepáticos do sistema porta, onde os esquistossômulos completam seu desenvolvimento atingindo a fase adulta (Carvalho *et al.*, 2008). Os vermes adultos alojam-se no organismo humano nos vasos

sanguíneos do sistema porta-hepático, com posterior migração para os vasos mesentéricos. O macho é de cor esbranquiçada e mede de 6 a 13 mm de comprimento por 1,1 mm de largura. A fêmea é cilíndrica e mais fina e longa que o macho. Mede de 10 a 20 mm de comprimento por 0,16 mm de largura. A fêmea aloja-se no canal ginecóforo (fenda longitudinal) do macho, onde é facilmente fecundada e inicia a postura dos ovos no interior das vênulas da submucosa intestinal (Katz N & Almeida K, 2003). Uma fêmea coloca cerca de 300 ovos por dia nos capilares do intestino, dos quais cerca da metade é eliminada nas fezes. A migração dos ovos do vaso para a luz intestinal provoca micro-hemorragias e áreas de inflamação responsáveis pelo aparecimento de diarreia mucossanguinolenta e de outros distúrbios gastrointestinais. Os ovos que não conseguem alcançar a luz intestinal por ficarem retidos nos tecidos, preferencialmente fígado e intestinos, são os responsáveis pela formação de granulomas que, no fígado, podem ocluir, total ou parcialmente, a passagem do sangue, e juntamente com a fibrose periportal vão ocasionar as manifestações das formas mais graves da doença (Katz N & Almeida K, 2003; Brasil, 2014).

Os ovos contêm embriões que necessitam do contato com a água para continuar sua evolução. Então a casca do ovo se rompe, liberando as larvas ciliadas, denominadas miracídeos, que se movimentam ativamente em busca do caramujo, hospedeiro intermediário. O hospedeiro intermediário para o *S. mansoni* é o caramujo do gênero *Biomphalaria*. Ao penetrar nas partes moles do molusco, o miracídio perde parte de suas estruturas. As células remanescentes transformam-se em um saco alongado, esporocisto, repleto de células germinativas, que após multiplicações dão origem às cercárias, que ao emergirem no meio aquático podem penetrar na pele ou mucosa do hospedeiro vertebrado dando continuidade ao ciclo do parasito (Figura 4) (Carvalho *et al.*, 2008; Brasil, 2014).

No homem (ciclo sexuado), o período decorrido entre a penetração das cercárias e o encontro de ovos nas fezes é de cerca de 40 dias, aproximadamente o mesmo tempo que dura o ciclo assexuado no caramujo. Assim, o ciclo evolutivo do parasito se completa em aproximadamente 80 dias (Katz N & Almeida K, 2003).

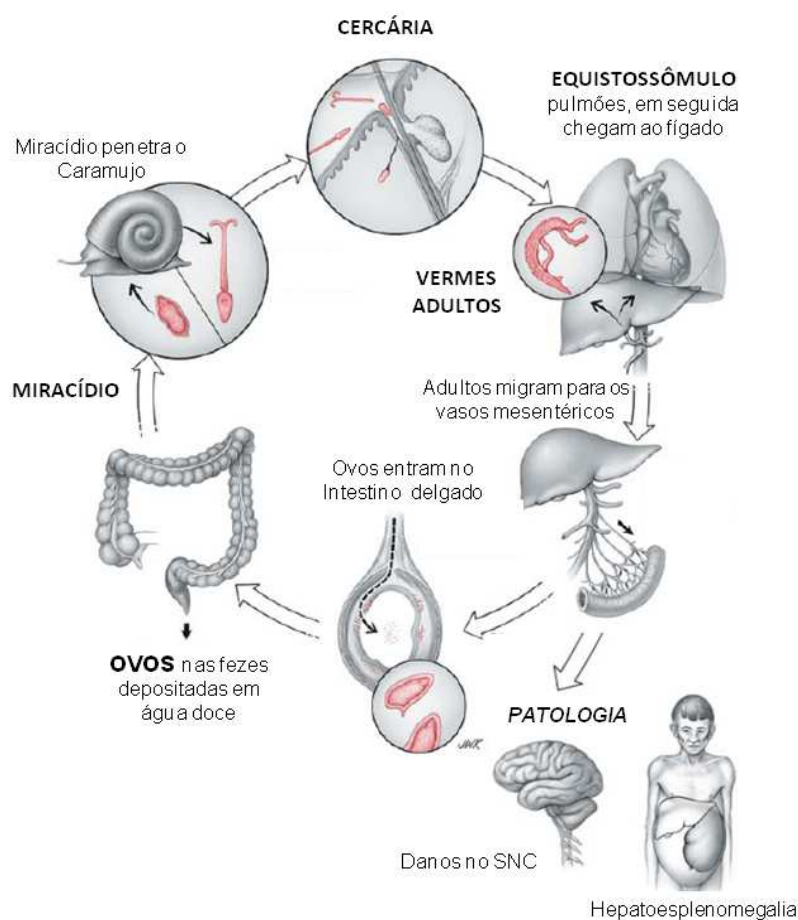


Figura 4: Ciclo evolutivo do *S. mansoni*. As diferentes fases do parasito estão representadas em vermelho. Fonte: www.parasiticdiseases.org; adaptado.

1.4 Patologia e tratamento

A patologia na esquistossomose mansoni desenvolve-se, principalmente, como consequência da deposição de ovos do parasito no tecido do hospedeiro, suscitando a formação de granulomas e fibrose em órgãos como intestino e sistema porta hepático do hospedeiro. Por ocasião da oviposição, alguns ovos não alcançam a luz intestinal, ficando retidos nos capilares da mucosa intestinal, podendo ser carregados pela circulação mesentérica até os sinusóides hepáticos (Abath *et al.*, 2006; Caldas *et al.*, 2008).

As reações granulomatosas protegem o hospedeiro humano contra os agentes infecciosos e moléculas, mas quando numerosas e descontroladas levam à patologia grave. Antígenos secretados pelos ovos (SEA) quando não são

sequestrados ou neutralizados de forma eficaz, podem danificar tecidos do hospedeiro, como o tecido hepático, sensível às toxinas secretadas pelo ovo. Estudos indicam que camundongos imunodeficientes apresentam dano hepático generalizado, a partir dos produtos tóxicos do ovo, e menor sobrevivência comparado aos camundongos imunocompetentes. Entretanto, os granulomas também trazem efeitos prejudiciais ao hospedeiro, como fibrose hepática grave e hipertensão portal, que podem ser fatais (Gryseels, 2012).

O granuloma é caracterizado por ser uma reação inflamatória local, constituída por uma variedade de células mononucleares fagocíticas e outros tipos celulares, dispostos de forma organizada (Lenzi *et al.*, 1998).

Estudos mostram as diferentes fases do granuloma, bem como suas características, sendo dois os estágios do granuloma: o estágio pré-granulomatoso e o estágio granulomatoso.

O estágio pré-granulomatoso, é caracterizado pelo preparo do espaço, ao redor do ovo do parasito, para o estabelecimento e organização da reação granulomatosa, com destruição focal das paredes dos vasos envolvidos e/ou parênquima adjacente e presença abundante de eosinófilos e macrófagos. Tal estágio pode ser subdividido em estágio pré-granulomatoso de reatividade fraca ou inicial e estágio pré-granulomatoso exsudativo.

O estágio granulomatoso é subdividido em três fases: exsudativo-produtivo, produtivo e involucional (involucional com dissociação das fibras colágenas, involucional com camada de colágeno espessa, involucional com camada de colágeno fina e involucional com pigmento macrofágico).

Ao longo da evolução do granuloma, através destas fases, células, tais como, macrófago, neutrófilos, eosinófilos, mastócitos, fibroblastos, células epitelióides, células gigantes e linfócitos, se dispõem ao redor do ovo em diferentes zonas, envoltas por uma matriz extracelular rica em fibras colágenas, as quais, no início estão dispostas em malha e que, com o desenvolvimento do granuloma se dispõem de forma concêntrica. No estágio involucional ocorre a degradação da matriz extracelular (Lenzi *et al.*, 1998).

No curso da infecção pelo *S. mansoni*, indivíduos infectados podem apresentar duas fases distintas da doença: a fase aguda e a fase crônica, as quais diferem entre si em relação às características clínicas e imunológicas.

A fase aguda é o estágio inicial da doença que pode ser caracterizada por mal-estar, febre, tosse, emagrecimento, dor abdominal e diarreia. A resposta imune nessa fase é marcada pela produção de altos níveis de IL-1, IL-6 e TNF- α em pacientes recém infectados. O quadro leucocitário periférico tem sido amplamente estudado, sendo frequente a eosinofilia em pacientes esquistossomóticos nesta fase (de Jesus, *et al.*, 2002; Atta, A. *et al* 1981).

Em geral, tanto em modelos experimentais, quanto em humanos, a resposta imune nessa fase é similar, sendo orquestrada por células T CD4⁺. A mesma é marcada por um balanço na expressão de citocinas Th1 e Th2. No começo da infecção, a resposta Th1 é predominante, com produção de IFN- γ , IL-2, IL-1, IL-6. Após o desenvolvimento do parasito em verme adulto e o começo da produção de ovos, a resposta Th1 começa a declinar, enquanto a resposta Th2 (produção de IL-4, IL-13 e IL-5) aumenta (Pearce & MacDonald, 2002; Burke, *et al.*, 2009).

Na fase crônica, distintas manifestações clínicas podem se desenvolver, sendo as mesmas relacionadas à gravidade da doença. Na maioria dos indivíduos residentes nas áreas endêmicas, a doença se apresenta assintomática, sendo esta considerada a forma intestinal da doença. A mesma se caracteriza pelo aparecimento de episódios de fraqueza, fadiga, dor abdominal e diarreia. Uma pequena percentagem da população, porém, desenvolve formas clínicas mais graves da doença, as quais são denominadas como hepatointestinais ou hepatoesplênicas. Os indivíduos portadores destas formas clínicas mais graves apresentam hepatomegalia ou hepatoesplenomegalia, variados graus de fibrose periportal, hipertensão portal e conseqüente desenvolvimento de varizes esofágicas (Prata e Bina, 1968). Como regra geral, são encontrados níveis elevados de enzimas hepáticas, como alanina aminotransferase (ALT), indicando lesão nos hepatócitos (Boros, 1989; Brasil, 2014). Estudos mostram que tanto a hiperplasia intensa do tecido linforreticular e a congestão moderada ou intensa dos seios venosos esplênicos provocadas pelos SEA do trematódeo participam na instalação da esplenomegalia (Smithers & Terry, 1969; Andrade, 1977).

Além das alterações patológicas, em decorrência da reação granulomatosa, na infecção esquistossomótica alterações hematológicas como anemia são frequentemente encontradas. Esta anemia parece ser ocasionada por múltiplos fatores, como a esplenomegalia, as hemorragias intestinais e/ou gástricas, pelas

alterações na eritropoese medular, ou ainda, pela própria espoliação parasitária. Além disso, se observa uma eosinofilia acompanhada de uma neutropenia, sendo estas alterações mais evidentes na fase crônica da infecção (Borojevic *et al.*, 1983; Santos-Da-Silva *et al.*, 1988).

A gravidade da doença depende da interação entre o hospedeiro e o parasito. Em relação ao *S. mansoni*, são importantes a cepa, a intensidade e o número de infecções. Do lado do hospedeiro participam a constituição genética, se o órgão foi previamente lesado, infecções associadas e, sobretudo, o perfil de resposta imunitária contra o *S. mansoni*, sendo este o fator mais importante na determinação da evolução das formas anatomoclínicas (Pearce & Macdonalds, 2002). Embora a infecção em si possa ocasionar algum dano direto aos tecidos do hospedeiro, a patologia causada pelo parasito é limitada; a morbidade está relacionada principalmente com a resposta imune do hospedeiro contra o parasito, um efeito secundário inevitável de uma resposta imunitária eficaz (Abath *et al.*, 2006).

As citocinas Th1 ativam funções inflamatórias e citotóxicas, e resulta em granulomas maiores, extensa patologia e acelerada mortalidade, enquanto que as citocinas do Th2 estimulam a produção de anticorpos e aumentam a proliferação e a função de eosinófilos. Prolongada a resposta Th2 contribui para o desenvolvimento da fibrose hepática e morbidade crônica. Autores acreditam que os indivíduos que modulam mal, ou seja, aqueles que mantêm granulomas grandes são os que evoluirão para a forma hepatoesplênica da doença (Pearce & Macdonalds, 2002; Abath *et al.*, 2006; Brasil, 2014). Portanto, a polarização imune extrema para qualquer Th1 ou 2 durante a esquistossomose mansoni é prejudicial e até letal. A manutenção de uma resposta Th1 ou Th2 equilibrada e controlada é crítica para formação de granulomas protetores sem patologia excessiva nesta infecção. A IL-10 tem demonstrado ser uma importante citocina durante a infecção com atividade de modulação negativa de ambas as subpopulações de células Th1 e Th2 T (Mosmann T. R. & Moore K. W., 1991). A fibrose do fígado é tradicionalmente vista como um processo patológico progressivo envolvendo múltiplos eventos celulares e moleculares que conduzem, finalmente, para a deposição das proteínas da matriz em excesso no espaço extracelular. Quando este processo é combinado com uma regeneração e reparação ineficaz, há uma crescente distorção da arquitetura hepática normal, e o resultado final é a cirrose. As evidências atuais indicam que a

fibrose hepática é dinâmica e pode ser bidirecional (envolvendo as fases de progressão e regressão) e que, além de aumento da síntese de matriz, este processo patológico envolve grandes mudanças na regulação da degradação da matriz. No espaço extracelular, a degradação da matriz ocorre predominantemente como uma consequência da ação de uma família de enzimas denominadas metaloproteinases de matriz (MMPs). Estas enzimas são secretadas a partir de células estreladas hepáticas (HSCs) para o espaço extracelular, como pró-enzimas, as quais são, em seguida, ativadas por um número específico de mecanismos de clivagem geralmente associados a superfície celular. As enzimas ativas, são por sua vez inibidas por uma família de inibidores de metaloproteinases de tecido (TIMP-1 a 4). Por esta combinação de mecanismos, a degradação da matriz extracelular é regulada de perto, o que evita danos nos tecidos (Athur MJ., 2000).

Atualmente, o medicamento de escolha para o tratamento da esquistossomose causada por todas as espécies de *Schistosoma* é o praziquantel (PZQ) (Doenhoff *et al.* 2002), que está disponível para uso humano e veterinário no tratamento de doenças causadas por cestódeos e trematódeos, sendo utilizado na terapêutica da esquistossomose desde 1980 (Dayan *et al.* 2003). O mecanismo de ação do PZQ não está totalmente esclarecido. Porém, alguns efeitos relacionados à sua ação sobre o parasito, tais como, contração muscular, deformações no tegumento e alterações metabólicas são bem documentados. Acredita-se que todos esses efeitos estejam direta ou indiretamente relacionados ao aumento do influxo de cálcio nos tecidos (Cioli *et al.* 1995), provocado após exposição do verme à droga. O tratamento quimioterápico contra o parasito *S. mansoni* é eficaz e contribui para regressão da doença hepatoesplênica, porém deixam, muitas vezes, lesões irreversíveis (Coutinho & Domingues, 1987; Dietze & Prata, 1986). Nos últimos anos, tem-se buscado terapias alternativas para acelerar o processo de recuperação do fígado danificado. Portanto, como as células-tronco mesenquimais tem demonstrado capacidade regenerativa, imunomoduladora e anti-fibrogênica, este estudo analisará a influência do tratamento com células-tronco mesenquimais associado ou não com praziquantel sobre a resposta granulomatosa e reparo morfofisiológico do fígado de camundongos C57BL/6 infectados pelo *S. mansoni*. Estas análises contribuirão para o conhecimento da função das CTMs no controle da resposta inflamatória e fibrose hepática, abrindo perspectivas para o tratamento de doenças que causam danos,

inflamação e fibrose hepática intensa como a esquistossomose mansoni. Nossa hipótese é que as CTMs modulam o ambiente inflamatório induzido pela infecção com *S. mansoni*, controlando o desenvolvimento de granulomas e contribuindo para a regressão da fibrose hepática e reparo tecidual.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral:

Avaliar o efeito das células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo na patogenia decorrente da esquistossomose mansoni experimental.

2.2 Objetivos específicos:

- Obter e caracterizar fenotípica e funcionalmente as células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo;
- Avaliar o peso e o perfil laboratorial dos camundongos C57BL/6 infectados com *Schistosoma mansoni* tratados com praziquantel associado à células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo;
- Analisar o perfil histológico da reação granulomatosa presente no fígado e baço de camundongos C57BL/6 infectados com *Schistosoma mansoni* tratados com praziquantel associado à células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Estratégia de Trabalho

Para o desenvolvimento do projeto, foi delineada a estratégia apresentada na figura 5:

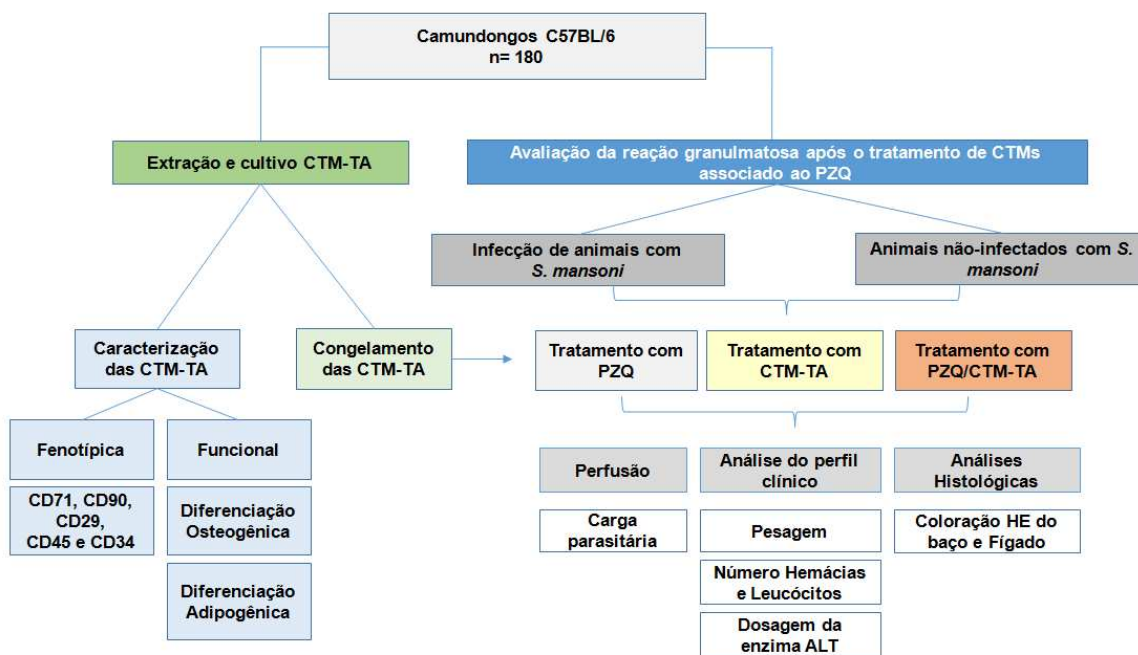


Figura 5 – Estratégia de trabalho para o desenvolvimento do projeto.

3.2 Extração das células-tronco derivadas do tecido adiposo (CTM-TA)

A obtenção das CTM-TA seguiu o protocolo descrito por Ogawa *et al.* (2004) com adaptações. Após a eutanásia do animal, foi feita a assepsia da região abdominal do camundongo com álcool 70% e, posteriormente, a tricotomia com auxílio de um bisturi na mesma região. Em capela de fluxo laminar, foi feita uma incisão na região abdominal, com tesoura e pinça cirúrgica estéril, separando a pele do peritônio. Com outro conjunto de pinça e tesoura, o peritônio foi rompido próximo à região inguinal e foi coletada a gordura branca acima do epidídimo (Figura 6).



Figura 6. Extração do tecido adiposo da região inguinal de camundongos C57BL/6 para obtenção de CTMs. Seta amarela aponta o tecido adiposo.

A gordura foi depositada em tubo de centrifuga, tipo Falcon de 50mL, mantido em gelo, contendo Meio Eagle modificado por Dulbecco alta glicose (DMEM alta glicose) (Cultilab), pH 7,2, suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Gibco), 1% de antibiótico-antimicótico, contendo 10.000 unidades/mL de penicilina, 10.000 ug/mL de estreptomicina e 25 ug/mL de anfotericina B (Gibco) e 0,08% de gentamicina (Sigma, St Louis MO, USA) contendo 50mg/mL, filtrado em ambiente estéril, utilizando membrana de 0,22 μ m (Millipore). Posteriormente, foi feita a lavagem da gordura com salina tamponada com fosfato (PBS) a 0,15M e a digestão enzimática do tecido adiposo, a fim de separar as CTMs da fração adipocitária. Neste procedimento, o tecido foi fragmentado com o auxílio de tesoura cirúrgica estéril, imerso em solução de colagenase do tipo II (Sigma) a 0,15% em PBS 0,15 M e incubado com agitação periódica por 1 hora, a 37°C, em atmosfera umidificada e contendo 5% de CO₂.

Após a incubação, a solução de colagenase foi inativada em volume igual de DMEM alta glicose, suplementado com 10% de SFB e procedeu-se a centrifugação da amostra à temperatura ambiente, a 379 xg e por 10 minutos. O sobrenadante contendo os adipócitos foi descartado e o precipitado contendo CTM-TA foi transferido para um tubo tipo Falcon de 50mL contendo DMEM alta glicose para nova centrifugação e remoção da gordura remanescente. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspendido em DMEM alta glicose suplementado com 10% de SFB para ser utilizado na expansão das CTMs.

3.3 Cultura e expansão de CTM-TA

As CTM-TA foram semeadas em garrafas plásticas de cultura T75mm³ (TPP, Suíça) e mantidas em estufa com atmosfera de 5% de CO₂ e a 37°C. As culturas foram monitoradas diariamente até a terceira passagem, observando-se cor, turbidez do meio, confluência e morfologia das células em microscópio óptico. Foram realizadas trocas do meio de cultura no dia seguinte à extração das CTM-TA e a cada dois dias, para a remoção de células não aderentes. Ao final deste período, estabeleceram-se culturas homogêneas, contendo células aderentes e com morfologia fibroblastóide.

Quando as células atingiram o grau de confluência de 90% a 95%, as células foram lavadas com PBS 0,15 M e incubadas com solução de tripsina/EDTA (Sigma, St Louis MO, USA) em estufa a 37°C e 5% de CO₂, por 1 minuto, até que as células perdessem completamente a capacidade de aderência à garrafa plástica. A seguir, foi feita a inativação da solução de tripsina/EDTA com o meio de cultivo DMEM suplementado com 10% de SFB, seguida da centrifugação por 10 minutos, a 4°C, em 379 xg. O sobrenadante foi descartado e o sedimento celular foi ressuscitado em meio DMEM suplementado com 10% de SFB. Estas células foram novamente distribuídas em garrafas de cultura, obedecendo a razão de 1 garrafa inicial para 2 garrafas finais. Esse tratamento permitiu a expansão da população e, conseqüentemente, sua purificação, sendo repetido por no máximo três vezes, a fim de evitar a senescência das células, que ocasionava a redução da capacidade proliferativa.

3.4 Congelamento das CTM-TA

Após a terceira passagem, as células foram armazenadas para o seu posterior uso utilizando o criopreservador dimetilsufóxido (DMSO). Para a realização deste procedimento, as células foram coletadas da garrafa utilizando-se solução de tripsina/EDTA e centrifugadas por 10 minutos, à 4°C, em 379 xg. Descartou-se o sobrenadante e o precipitado de células foi ressuscitado em 1mL de DMEM contendo 10% SFB.

Previamente ao congelamento, realizou-se a determinação da viabilidade das CTM-TA por meio da coloração com azul de tripan, um corante que permite diferenciar as células vivas de células mortas já que as células viáveis não permitem a penetração do corante, uma vez que a membrana celular está intacta, ao contrário das células mortas que apresentam uma cor azul distinta devido à penetração do corante no citoplasma (Marchenkoe & Flanagan, 2007).

A determinação da viabilidade das CTM-TA foi feita diluindo-se 10 μL de células-tronco em 190 μL de azul de tripan (1:20). Posteriormente, 10 μL dessa diluição foi distribuída em câmara de Neubauer, e o número de células viáveis contido nos quatro quadrantes laterais da câmara foram contados. O número médio por quadrante foi multiplicado por vinte (diluição da amostra) e pelo erro da câmara de Neubauer (10^4) para determinação do número de CTMs viáveis em 1 mL de meio de cultura.

Para o congelamento celular, 1×10^6 células-tronco foram ressuspendidas, em 600 μL de solução A, composta por DMEM suplementado com 20% SFB, e 400 μL da solução B, composta por DMEM suplementado com 20% SFB e 10% de DMSO. A seguir, os criotubos acondicionados em recipiente para congelamento celular com isopropanol, foram armazenados em freezer a -80°C por 48 horas e, posteriormente, transferidos para caixas de armazenamento de criotubos e mantidas a -80°C .

3.5 Caracterização fenotípica das CTM-TA

As CTM-TA foram caracterizadas por citometria de fluxo por meio da análise da expressão das moléculas CD29, CD44 e CD71, positivas para as CTMs, e das moléculas CD34 e CD45, marcadores específicos de células-tronco hematopoiéticas (Zuk *et al.*, 2002; Dominici *et al.*, 2006; Sung *et al.*, 2008).

Para a realização deste ensaio, as células-tronco foram soltas da garrafa de cultura com solução de tripsina/EDTA (Sigma) centrifugadas por 5 minutos, a 379 xg e ressuspendidas em PBS a 0,15 M. Alíquotas contendo 5×10^5 células foram incubadas com anticorpos monoclonais anti-CD45 conjugado com APC (BD Biosciences, San Jose, California, USA), anti-CD34 conjugado com PE (BD), anti-CD71 conjugado com FITC (BD), anti-CD44 conjugado com APC-Cy7 (BD) e anti-

CD29 conjugado com FITC (BD) por 30 minutos, a 4°C. A seguir, as células foram centrifugadas e lavadas uma vez com PBS 0,15 M e, posteriormente, fixadas com solução de formaldeído a 2%. Cerca de 30.000 eventos foram adquiridos no citômetro de fluxo FACScalibur (BD Biosciences, San Jose, California, USA) e os dados foram analisados utilizando o software FlowJo, versão 9.9.3 (FlowJo, Ashland, Oregon, USA).

3.6 Caracterização funcional das CTM-TA

3.6.1 Indução da diferenciação osteogênica

Para promover a diferenciação das CTM-TA em osteoblastos, 1×10^5 células por poço, após o término da terceira passagem, foram distribuídas em placa de seis poços (Falcon), sobre lamínulas previamente lavadas e autoclavadas. Após 24 horas, as CTM-TA foram estimuladas com o meio osteogênico, constituído de 5,67 M de ácido ascórbico (Vetec), 0,02 M de β -glicerofosfato (CRQ), 1,085 μ L de dexametasona (Teuto) a 4 mg/mL, 180 mL de DMEM alta glicose (Cultilab), 20 mL de SFB (Cultilab), 1% de antibiótico-antimicótico (Gibco) e 0,08% de gentamicina (Sigma) a 50 mg/mL. O meio osteogênico foi trocado três vezes por semana e as placas foram incubadas em ambiente umidificado, a 37°C e com 5% de CO₂ por sete, quatorze e vinte e um dias. Como controle foram utilizadas células cultivadas em meio de cultura DMEM suplementado com 10% SFB, sem os fatores indutores da osteogênese.

Após sete, quatorze e vinte e um dias de indução osteogênica, as células foram coradas pelo método de Von Kossa, técnica que possibilita a evidência de nódulos de mineralização, que são estruturas produzidas pelas células-tronco que se diferenciaram em osteoblastos.

Para isso, o meio foi aspirado, as células foram lavadas com PBS 0,15 M estéril e fixadas com álcool etílico 70% por 24 horas em temperatura ambiente. Ao término da fixação, as células foram lavadas com água destilada. Adicionou-se uma solução de nitrato de prata (Impex) a 5% em água destilada e as células foram expostas à luz ultravioleta por 1 hora. A seguir, as células foram lavadas em água destilada e deixadas por 5 minutos em tiosulfato de sódio (Quimex) a 5% em água

destilada. Após isto, as células foram lavadas com água destilada, e adicionou-se, por 40 segundos, Eosina de Putt composta por 2 g de eosina amarelada (Vetec); 1 g de bicromato de potássio; 20 mL de álcool absoluto (Proquimios); 20 mL de solução de ácido pícrico (Vetec) a 1,3% em água destilada e 160 mL de água destilada. Posteriormente a esse processo, as células foram imersas rapidamente em água destilada, álcool 95%, álcool absoluto e, por último, em xilol (Synth). Feito isso, as lamínulas foram montadas sobre lâminas de vidro com uma gota de bálsamo do Canadá e avaliadas ao microscópio óptico. Os nódulos de mineralização foram evidenciados como estruturas de coloração enegrecidas, de formato arredondado e com bordas irregulares.

3.6.2 Indução da diferenciação adipogênica

Para promover a diferenciação das CTM-TA em adipócitos, 1×10^5 células por poço, após o término da terceira passagem, foram distribuídas em placas de 6 poços (Falcon). Após 24 horas, as células foram estimuladas com o meio adipogênico, constituído do meio DMEM (Cultilab) suplementado com 10% de SFB (Sigma), 0,1 μM de dexametasona (Teuto), 50 μM de indometacina, 100 unidades/mL de insulina, 0,5 mM de isobutil-metilxantina. As placas foram incubadas a 37°C e 5% de CO_2 por sete, quatorze e vinte e um dias. Como controle, as células foram cultivadas no meio de cultura basal, sem os fatores indutores, nas mesmas condições. Ao final de cada período de incubação, as células foram coradas com Oil Red, um corante que permite evidenciar o acúmulo de lipídeos no interior das células-tronco que se diferenciaram em adipócitos. Os lipídeos foram identificados como estruturas arredondadas e avermelhadas no interior do citoplasma celular.

Para a realização dessa técnica, após cada período de incubação, o meio de cultura adipogênico foi removido, as células foram lavadas com PBS 0,15 M e fixadas com formalina 10% por 30 minutos à temperatura ambiente. Após esse período, as células foram lavadas com PBS 0,15 M e, em seguida, com álcool isopropílico a 60% em água destilada. Posteriormente, foram coradas por 15 minutos com uma solução de Oil Red O (Sigma) a 3 mg/mL em 60% de álcool isopropílico e 40% de água destilada. A seguir, as células foram coradas com

hematoxilina por 5 minutos para marcação do núcleo. Então, as células foram observadas em microscópio óptico e os corpúsculos lipídicos foram evidenciados como estruturas arredondadas, de tamanhos variados e coloração avermelhada no citoplasma das células-tronco que se diferenciaram em adipócitos.

3.7 Grupos de estudo

Utilizamos camundongos da linhagem C57BL/6, machos, com aproximadamente 4 a 6 semanas de idade, foram utilizados no estudo após a aprovação do protocolo utilizado nos experimentos pela Comissão em Ética no Uso de Animais da Fundação Oswaldo Cruz (Número da licença: LW-56/14, Anexo 1) num total 180 animais. Cerca de 60 camundongos foram utilizados para a extração de CTMs a partir do tecido adiposo inguinal e 120 animais para a avaliação do efeito das CTMs sobre a reação granulomatosa da esquistossomose experimental, que foram divididos nos seguintes grupos:

a) XTO (n=24): Camundongos infectados com *S. mansoni*, tratados com PBS 0,15 M, por via oral, em dose única. Após 30 dias do tratamento oral, foram tratados com PBS 0,15 M, por via intravenosa, em dose única. Grupos de 8 animais foram sacrificados após quinze, trinta e sessenta dias da injeção intravenosa contendo PBS.

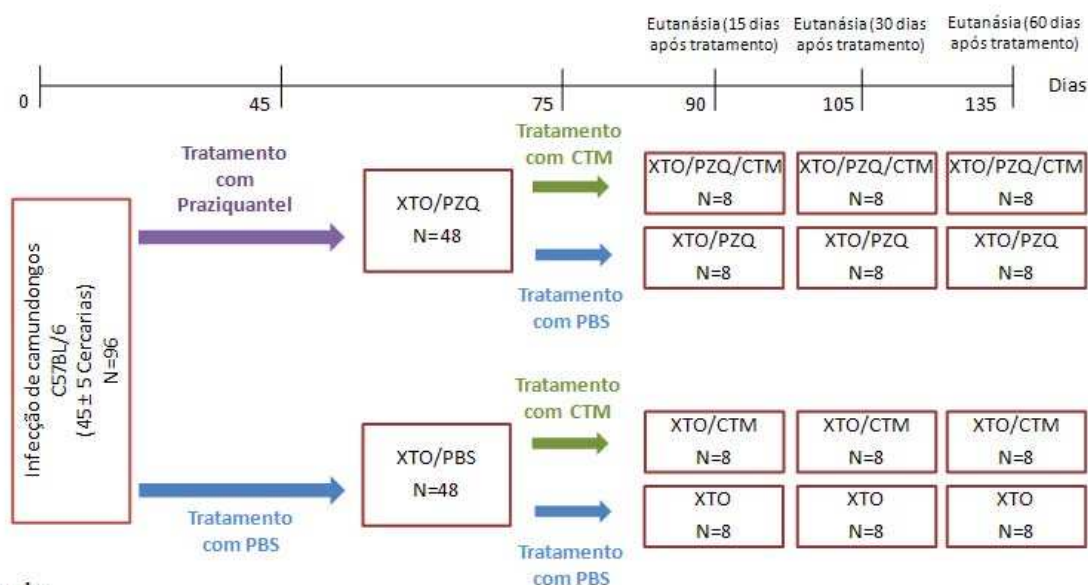
b) XTO/CTM (n=24): Camundongos infectados com *S. mansoni*, tratados com PBS 0,15 M por via oral, em dose única, e decorridos 30 dias do tratamento oral, foram tratados com 3×10^5 CTM-TA, por via intravenosa, em dose única. Grupos de 8 animais foram sacrificados após quinze, trinta e sessenta dias da injeção intravenosa contendo CTM-TA.

c) XTO/PZQ (n=24): Camundongos infectados com *S. mansoni*, tratados com PZQ (400mg/Kg) por via oral, em dose única, e decorridos 30 dias do tratamento oral, foram tratados com PBS 0,15 M, por injeção intravenosa, em dose única. Grupos de 8 animais foram sacrificados após quinze, trinta e sessenta dias da injeção intravenosa contendo PBS.

d) XTO/PZQ/CTM (n=24): Camundongos infectados com *S. mansoni* tratados com PZQ (400mg/Kg), por via oral, em dose única, e decorridos 30 dias do tratamento oral, foram tratados com 3×10^5 CTM-TA, por injeção intravenosa, em dose única. Grupos de 8 animais foram sacrificados após quinze, trinta e sessenta dias da injeção intravenosa contendo CTM-TA.

Para todos os grupos de camundongos infectados com *S. mansoni* (XTO), foram feitos controles com camundongos C57BL/6 não-infectados pelo *S. mansoni* (NI), que receberam todos os tratamentos nas mesmas condições descritas acima, com o mesmo número de animais em cada grupo. Dessa forma, formaram-se os seguintes grupos controles não-infectados: NI, NI/CTM, NI/PZQ, NI/PZQ/CTM.

O diagrama dos grupos descritos encontra-se representado na figura 7.



Legenda:

XTO: Animais infectados com *S. mansoni*

PZQ: Animais tratados com Praziquantel

CTM: Animais tratados com Células-tronco mesenquimais

Figura 7: Diagrama dos grupos de animais utilizados. Tratamentos de camundongos C57BL/6 infectados por *S. mansoni*. Além dos grupos de camundongos infectados, utilizamos como controle camundongos C57BL/6 não infectados seguindo os mesmos períodos e tratamentos do grupo infectado. Este grupo será utilizado como parâmetro de normalidade para os resultados obtidos nos grupos experimentais.

3.8 Infecção com *S. mansoni* e tratamentos

A infecção dos animais foi feita utilizando cercárias de *S. mansoni* (Cepa LE), gentilmente cedidas pelo moluscário “Lobato Paraense”, do Centro de Pesquisa René Rachou. As cercárias foram obtidas de caramujos da espécie *Biomphalaria glabrata* infectados há mais de trinta dias com miracídios de *S. mansoni* cepa LE, que foram colocados em um becker contendo água desclorada e expostos à luz artificial, durante duas horas. A contagem das cercárias foi realizada, retirando-se uma alíquota do becker, a qual foi distribuída em uma placa escavada. As cercárias foram mortas com lugol e contadas com auxílio de lupa. As alíquotas foram ajustadas, a fim de se obter uma concentração equivalente a 45 ± 5 cercárias, em um volume de 0,2 mL, volume que foi individualmente injetado no dorso dos camundongos, por via subcutânea, utilizando uma seringa de aço-inox com volume ajustável (Pellegrino & Katz, 1968).

O tratamento com PZQ foi realizado após 45 dias de infecção com *S. mansoni*. A dose de PZQ empregada de 400mg/kg foi baseada em ensaios prévios em modelo murino efetuados por Oliveira, FA. 2005. O medicamento foi macerado com auxílio de pistão de vidro e dissolvido em água Mili-Q, sendo administrado por via oral em um volume de 100 μ L com uma seringa e agulha para gavagem. Os animais controle, que não foram tratados com PZQ, receberam PBS 0,15 M, em um volume de 100 μ L, utilizando-se a mesma metodologia empregada para a administração do PZQ.

Para o tratamento com CTM-TA, as células previamente armazenadas a -80° C foram descongeladas e ressuspensas em meio DMEM suplementado com 10% SFB. A seguir, as CTM-TA foram lavadas três vezes com PBS 0,15 M para a remoção do soro fetal bovino e DMSO. Posteriormente, o número de CTM-TA viáveis, avaliadas em azul de tripan, foi quantificado em câmara de Neubauer, a seguir diluídas em PBS 0,15 M para que a suspensão de células contivesse 3×10^5 células viáveis por 0,1 mL de PBS. Este volume foi injetado, com o auxílio de uma seringa 13 x 0,45 mm, na veia lateral da cauda dos camundongos. Os grupos controles, que não foram tratados com CTM-TA, receberam PBS 0,15 M, em um volume de 0,1 mL, utilizando-se a mesma metodologia empregada para a administração das CTM-TA.

O peso corporal dos animais foi avaliado previamente à eutanásia, utilizando-se balança analítica (Sartorius).

Os animais utilizados nos ensaios, foram mantidos no biotério de experimentação do Centro de Pesquisas René Rachou/FIOCRUZ, alojados em caixas plásticas (oito camundongos por caixa), recebendo ração comercial (1,4% de cálcio, 0,60% de fósforo e 22% de proteína) e água *ad libitum*, sendo mantidos em um regime de 12 horas de luz e 12 horas de escuro, a 25°C.

3.9 Determinação do número de hemácias e leucócitos

A contagem das hemácias e dos leucócitos foi realizada no sangue total obtido do plexo braquial depositado em tubos com EDTA. O sangue foi coletado após a administração, por via intraperitoneal, dos anestésicos ketamina (Syntec) e xilazina (Syntec), na dose 100mg/kg e 5mg/kg, respectivamente. A quantificação do número de hemácias por μL de sangue foi realizada em câmara de Neubauer, utilizando-se sangue diluído em PBS 0,15 M (1:200). A determinação do número total de leucócitos por μL de sangue foi realizada em câmara de Neubauer, utilizando-se sangue diluído em líquido de Turk (1:20). O percentual de neutrófilos, eosinófilos, monócitos e linfócitos presentes no sangue foi quantificado por meio da contagem de 100 leucócitos, em esfregaços sanguíneos corados com kit de coloração panótico (RenyLab), analisados por microscopia óptica e em aumento de 1000X. O número de neutrófilos, eosinófilos, monócitos e linfócitos por μL de sangue foi determinado multiplicando-se o número total de leucócitos por μL de sangue pelo percentual de neutrófilos, eosinófilos, monócitos e linfócitos quantificados após a avaliação do esfregaço sanguíneo.

3.10 Dosagem da enzima alanina aminotransferase

Para monitorar o dano hepático causado pela infecção por *S. mansoni* nos diferentes grupos, a enzima alanina aminotransferase (ALT) foi quantificada no soro dos camundongos C57BL/6. Para a dosagem da enzima, utilizou-se o kit comercial Transaminase TGP (Bioclin), seguindo as recomendações do fabricante.

Resumidamente, em tubo tipo Falcon de 15 mL, foi adicionado o substrato da ALT e incubado a 37° por 3 minutos. Em seguida foi adicionada a amostra e a solução foi homogeneizada e incubada a 37° por 30 minutos. Decorrido o tempo de incubação, foi adicionado o reagente de cor e a solução homogeneizada e mantida em temperatura ambiente por 20 minutos. A reação catalisada pela ALT foi interrompida pela adição de hidróxido de sódio 0,4N. Posteriormente, a absorbância foi determinada em espectrofotômetro (SPECTRA MAX M5, Molecular Devices), utilizando o comprimento de onda de 505 nm Para determinação da concentração de ALT no soro, paralelamente, foi feita uma curva padrão contendo 150 U/mL, 97 U/mL, 57 U/mL, 28 U/mL e 0 U/mL de alanina aminotransferase.

3.11 Determinação da carga parasitária

A carga parasitária dos grupos infectados foi determinada pela contagem dos vermes adultos recuperados após a perfusão da circulação sanguínea com solução isotônica (Pellegrino & Siqueira, 1956). Para sua realização, foi feita a exposição das vísceras e a veia porta foi seccionada, próximo à penetração no fígado. Com o auxílio de uma agulha, acoplada a um pipetador automático, foi injetada solução salina 0,85% com heparina (0,016%) na aorta torácica, permitindo assim, a perfusão das veias mesentéricas e a recuperação dos vermes adultos existentes. Os parasitos foram coletados em copos de 200 mL e lavados com o auxílio de uma peneira em água corrente. A seguir, os vermes adultos foram transferidos para placas de petri contendo água para contagem com auxílio de uma lupa.

3.12 Análises histopatológicas

Após a eutanásia dos camundongos foi feita a coleta do baço e fígado utilizando tesoura e pinça estéreis em capela de fluxo laminar. Estes órgãos foram mantidos em tubos de centrifuga, tipo Falcon de 15 mL contendo formaldeído 4% (Isofar) em tampão fosfato pH 7,2 para a fixação dos órgãos. A seguir, fragmentos dos órgãos foram obtidos e processados utilizando o processador de tecidos (modelo PT 05, LUPETEC®, Brasil), de acordo com as instruções do fabricante.

Resumidamente, as amostras foram sequencialmente submetidas a dois banhos de formaldeído a 10%, um banho de etanol a 70%, dois banhos de etanol a 95% , um banho de etanol a 100%, um banho de acetato de butila, três banhos de xilol e dois banhos de parafina aquecida a 65 °C, com duração de 1 hora por banho. Posteriormente, os tecidos foram incluídos em blocos de parafina, que foram seccionados em micrótomo (RM2125RT, Leica) para a obtenção de cortes com 4 µm de espessura. Os cortes foram montados em lâminas de microscopia e a seguir desparafinados e rehidratados por meio de lavagem em xilol, por 20 minutos e em etanol, por 5 minutos, para coloração com hematoxilina de Harris e eosina (HE). Os parâmetros histopatológicos considerados para a análise do fígado e baço encontram-se na tabela 1. Todas as análises foram efetuadas sob a orientação do Dr. Marcelo Pascoal, médico patologista do Departamento de Patologia, da Faculdade de Medicina, da Universidade Federal de Minas Gerais.

Quadro 1: Parâmetros utilizados para análise histopatológica do fígado: Camundongos C57BL/6 infectados com *Schistosoma mansoni* tratados ou não com praziquantel e/ou CTM-TA

FÍGADO		
Variável	Descrição	Categorização
Estrutura do fígado	Totalmente preservada ou normal	1
	Parcialmente alterada	2
	Moderadamente alterada	3
	Muito alterada	4
	Totalmente alterada	5
Número adequado (> que 10) de tratos portais	Não	0
	Sim	1
Arquitetura do espaço portal	Totalmente preservado ou normal	1
	Alargados, mas sem septos	2
	Alargados e com septos incompletos	3
	Alargados e com septos completos ou pontes ou coalescente	4
	Cirrose	5
Infiltrado inflamatório portal	Ausente ou escasso (raras células inflamatórias)	1
	Discreto (média de 100 células nos tratos portais)	2
	Moderado (média de 1.000 células nos tratos portais)	3
	Acentuado (média de 3.000 células nos tratos portais)	4
	Muito acentuado (média de 5.000 células nos tratos portais)	5
Presença de granuloma portal	Não	0
	Sim	1
Quantidade de granulomas	Nenhum	0
	Rara ou escassa (média de 1 granuloma)	1
	Discreta (média de 10 granulomas)	2
	Moderada (média de 20 granulomas)	3
	Acentuada (média de 40 granulomas)	4
	Muito acentuada (média de 50 granulomas)	5
Constituição dos granulomas	Nenhum granuloma	0
	Somente linfócitos e macrófagos	1
	Linfócitos, macrófagos e eosinófilo	2
	Linfócitos, macrófagos, eosinófilos e plasmócito	3
	Linfócitos, macrófagos, eosinófilos, plasmócitos e cél. Gigantes	4
	Todas as anteriores e outras células (ex.: neutrófilos)	5
Fase do Granuloma	Exsudativa	1
	Precoce	2
	Avançado	3
	Fibrótico	4
Atividade inflamatória periportal	Nenhuma atividade periportal	1
	Extravasamento de linfócitos	2
	Necrose saca-bocado discreta	3
	Necrose saca-bocado moderada	4
	Necrose saca-bocado acentuada	5
Atividade inflamatória parênquima	Nenhuma atividade intralobular	1
	Atividade discreta e focal	2
	Necrose focal em vários sítios	3
	Necrose focal e confluyente	4
	Necrose focal extensa	5
Viabilidade dos ovos	Nenhum ovo	0
	Maioria viável	1
	Maioria inviável	2
Tamanho do granuloma	Maior granuloma (não exsudativo e/ou não coalescente)	mm

Quadro 2: Parâmetros utilizados para análise histopatológica do baço: Camundongos C57BL/6 infectados com *Schistosoma mansoni* tratados ou não com praziquantel e/ou CTM-TA

BAÇO		
Variável	Descrição	Categorização
Estrutura do baço	Totalmente preservada ou normal	1
	Parcialmente alterada	2
	Moderadamente alterada	3
	Muito alterada	4
	Totalmente alterada	5
Polpa Vermelha	Imaturo	1
	Discretamente congesta	2
	Moderadamente congesta	3
	Acentuadamente congesta	4
Polpa Branca	Sem alterações	1
	Discretamente hiperplásica	2
	Moderadamente hiperplásica	3
	Acentuadamente hiperplásica	4
Quantidade de granulomas esplênicos	Nenhum granuloma	0
	Rara ou escassa (média de 1 granuloma no baço)	1
	Discreta (média de 10 granulomas no baço)	2
	Moderada (média de 20 granulomas no baço)	3
	Acentuada (média de 40 granulomas no baço)	4
Constituição dos granulomas	Muito acentuado (média de 50 granulomas no baço)	5
	Nenhum granuloma	0
	Somente linfócitos e macrófagos	1
	Linfócitos, macrófagos e células gigantes multinucleadas	2
	Linfócitos, macrófagos, cél. gigantes e eosinófilos	3
	Linfócitos, macrófagos, cél. Gigantes, eosinófilos e plasmócitos	4
Viabilidade dos ovos	Todas as anteriores e outras células (ex.: neutrófilos)	5
	Nenhum ovo	0
	Maioria viável	1
	Maioria inviável	2

3.13 Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas empregando-se o software Prism 5.0 (Graphpad, La Jolla, California USA) e VassarStats: Website for Statistical Computation disponível em <http://vassarstats.net/>. Para as variáveis quantitativas, para comparação entre dois grupos independentes com distribuição normal foi utilizado o teste *t* não pareado e para aqueles que não apresentaram distribuição normal foi utilizado o teste de Mann-Whitney. Para comparação entre mais do que dois grupos com distribuição normal foi utilizado o ANOVA seguido do teste de Tukey e para aqueles que não apresentaram distribuição normal foi empregado o Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn. Para as variáveis qualitativas foi utilizado o teste exato de Fisher. As diferenças entre as variáveis foram consideradas

significativas quando a probabilidade bi-caudal da sua ocorrência devido ao acaso (erro tipo I) foi menor que 5% ($P < 0,05$).

4 RESULTADOS

4.1 Cultura e expansão das CTM-TA

A cultura de CTMs foi feita a partir do tecido adiposo inguinal de camundongos C57BL/6, como descrito em metodologia. Após a extração, foram feitas trocas sucessivas do meio de cultura por três passagens para a remoção das células não aderentes, permitindo a prevalência e expansão de células fusiformes semelhantes a fibroblastos, aderentes à superfície plástica e que formaram colônias (Figura 8).

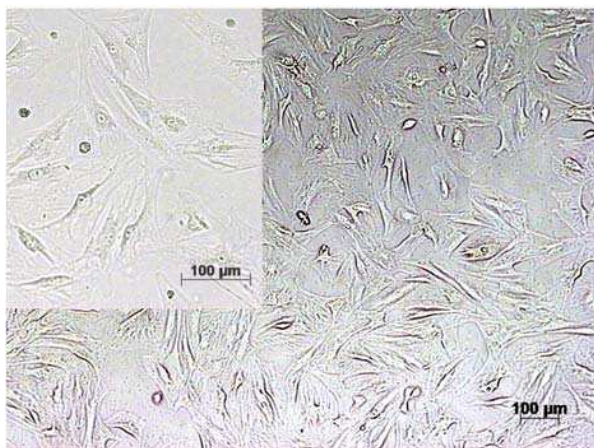


Figura 8. Cultura de CTM-TA derivadas do tecido adiposo apresentando morfologia semelhante a fibroblasto com formação de colônias. Imagem obtida por microscopia óptica nos aumentos de 10X e 35X.

4.2 Caracterização fenotípica das CTM-TA

A cultura de CTM a partir do tecido adiposo inguinal de camundongos C57BL-6 foi caracterizada fenotipicamente por meio da avaliação da expressão das moléculas CD29, CD34, CD44, CD45 e CD71. As células apresentaram mais de 80% de expressão das moléculas CD29 (100%), CD44 (87,3%) e CD71 (96,9%), que são características das CTMs (Figuras 9E a 9G). Em contrapartida, menos de 2% dos marcadores de células-tronco hematopoiéticas CD45 (1,82%) e CD34 (1,11%) foram expressos na população das células cultivadas (Figuras 9C a 9D), confirmando que as células isoladas a partir do tecido adiposo inguinal eram CTMs.

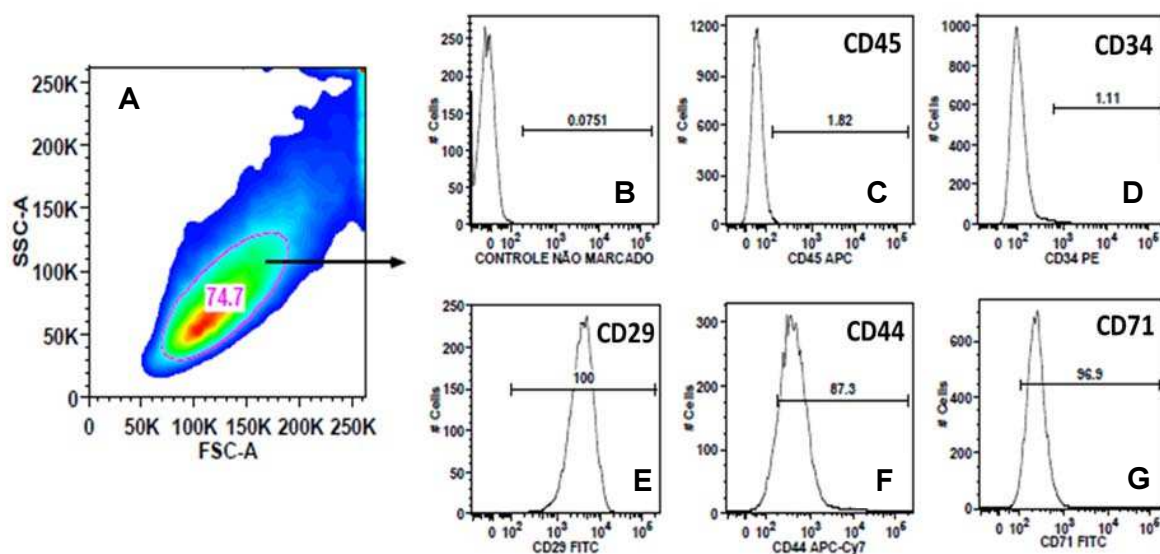


Figura 9. Análise fenotípica das CTM-TA por citometria de fluxo. Em A, gráfico de densidade contendo a seleção da população com base em seu tamanho (FSC-A) e granulosidade (SSC-A). Em B, histograma das células não marcadas. Em C e D: Histogramas das células marcadas com anti-CD45 e anti-CD34, marcadores característicos de células-tronco hematopoiéticas. Em E, F e G, histogramas das células marcadas com anti-CD29, anti-CD44 e anti-CD71, marcadores característicos de CTMs.

4.3 Caracterização funcional das CTM-TA

Além da caracterização fenotípica por meio da expressão de alguns marcadores como relatado no tópico anterior, as CTM-TA foram caracterizadas funcionalmente por meio de indução de sua diferenciação em osteoblasto e adipócito.

4.3.1 Diferenciação osteogênica

Como indutores da diferenciação osteogênica, foram utilizados meio DMEM 10% SFB acrescido de dexametasona, ácido ascórbico e β -glicerofosfato, as CTMs foram cultivadas por sete, quatorze e vinte e um dias. As primeiras mudanças decorrentes da diferenciação observada aos sete dias de indução osteogênica foi que a morfologia fusiforme apresentada pelas CTM-TA foi gradativamente substituída por células com formato cuboide. Aos quatorze e vinte e um dias além do formato cuboide apresentados pelas células foi possível observar o agrupamento

destas células formando colônias que secretavam uma matriz de coloração marrom. Após a coloração de Von Kossa, foram observadas estruturas arredondadas e negras, conhecidas como nódulos ósseos ou de mineralização. A medida em que o tempo de diferenciação progrediu, houve aumento do número de nódulos de mineralização, bem como do seu tamanho (Figura 10).

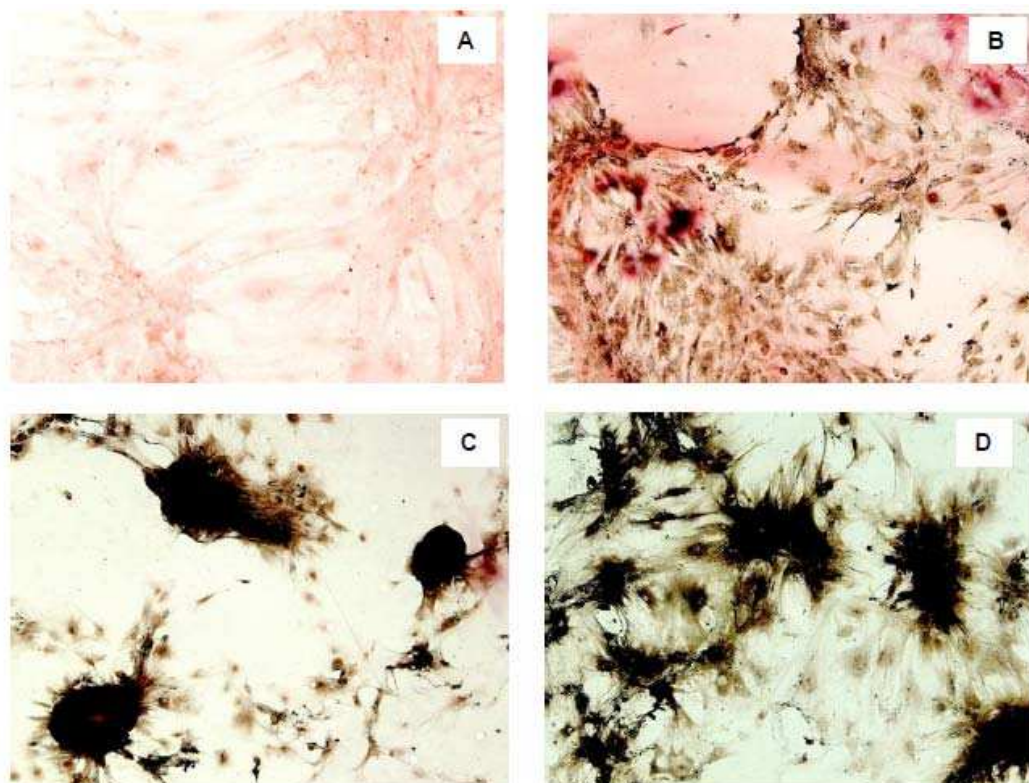


Figura 10. Diferenciação osteogênica. Coloração pelo método de Von Kossa evidenciando nódulos de mineralização após diferenciação das CTMs derivadas do tecido adiposo (CTM-TA) em osteoblastos. Em A: cultura de CTM-TA em meio DMEM. Em B: CTM-TA após 7 dias de cultura em meio de diferenciação osteogênica. Em C: CTM-TA após 14 dias de cultura em meio de diferenciação osteogênica. Em D: CTM-TA após 21 dias de cultura em meio de diferenciação osteogênica. Em negro, observam-se os nódulos de mineralização. Imagem obtida por microscopia óptica e em aumento de 10X.

4.3.2 Diferenciação adipogênica

Como indutores da diferenciação adipogênica, foi utilizado meio DMEM 10% SFB acrescido de dexametasona, indometacina, insulina e isobutil-metilxantina. As primeiras mudanças decorrentes da diferenciação foram observadas aos sete dias,

quando a morfologia fusiforme apresentada pelas CTM-TA foi gradativamente substituída por células com formato arredondado e a presença de pequenas gotículas presentes no citoplasma destas células. Aos quatorze e vinte e um dias foi possível observar um aumento no volume das células e do número de gotículas presentes em seu citoplasma. Após coloração com Oil Red, foram observadas várias estruturas intracitoplasmáticas redondas e avermelhadas, que representavam gotículas lipídicas acumuladas no citoplasma das CTM-TA que se diferenciaram em adipócitos (Figura 11).

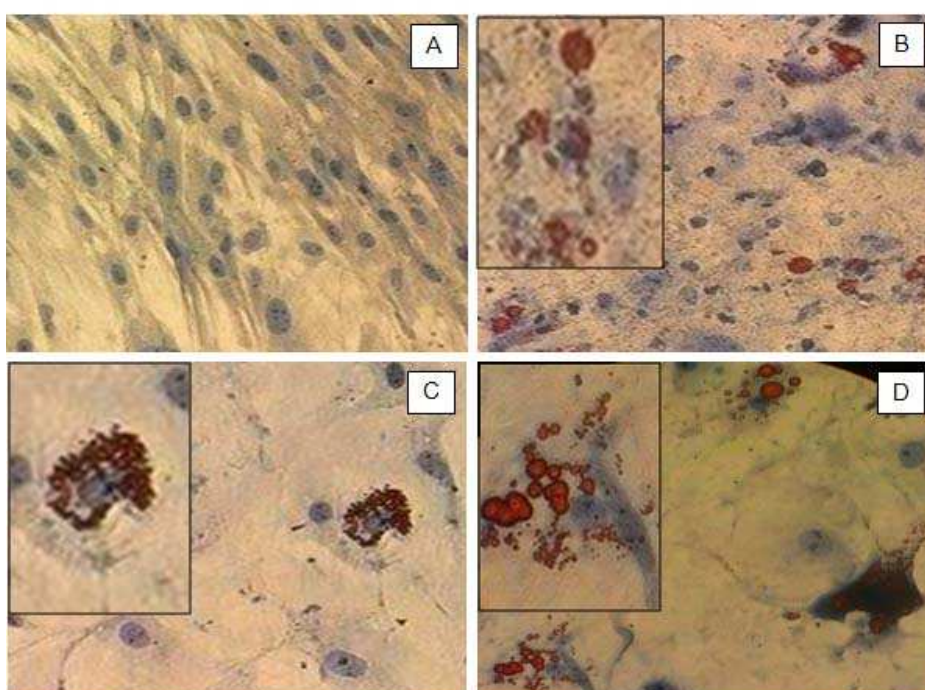


Figura 11. Diferenciação adipogênica. Coloração com Oil Red evidenciando gotículas lipídicas no citoplasma das células-tronco derivadas do tecido adiposo (CTM-TA) que se diferenciaram em adipócitos. Em A: cultura de CTM-TA em meio DMEM. Em B: CTM-TA após 7 dias de cultivo em meio de diferenciação adipogênica. Em C: CTM-TA após 14 dias de cultivo em meio de diferenciação adipogênica. Em D: CTM-TA após 21 dias de cultivo em meio de diferenciação adipogênica. Em vermelho, observam-se as gotículas lipídicas. Imagem obtida por microscopia óptica e em aumento de 20X.

4.4 Influência do tratamento com CTM-TA e/ou praziquantel sobre o peso corporal de camundongos C57BL/6 infectados pelo *Schistosoma mansoni*

Doenças infecciosas podem causar oscilação do peso corporal. Portanto, para avaliarmos a influência da infecção pelo *S. mansoni*, bem como do tratamento com CTMs e/ou PZQ sobre o peso corporal de camundongos C57BL/6 infectados

pelo *S. mansoni*, mensuramos o peso dos animais ao final de cada tempo de estudo. No tempo 15 dias, o peso do grupo não infectado foi maior do que o do grupo infectado ($P=0,03$, teste de Mann-Whitney; figura 11), indicando que a infecção pelo *S. mansoni* ocasionou redução do peso dos animais. Nesse tempo, os grupos infectados e tratados com PZQ ou com CTMs associada ao PZQ apresentaram peso superior ao do grupo infectado e não tratado, e similar ao do grupo não infectado ($P<0,05$, Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn, figura 11), indicando que, aos 15 dias, ambos os tratamentos colaboraram para a manutenção do peso dos camundongos infectados pelo *S. mansoni*. Em contrapartida, no tempo 15 dias, o peso dos camundongos infectados pelo *S. mansoni* não foi afetado pelo tratamento apenas com CTMs.

Já, no tempo 30 dias, o peso do grupo não infectado também foi superior ao do grupo infectado ($P=0,02$, teste de Mann-Whitney; figura 11), indicando que os camundongos infectados pelo *S. mansoni* continuaram a perder peso com o avanço da infecção. Nesse tempo, no entanto, não foi observada influência de qualquer tratamento sobre o peso dos camundongos infectados pelo *S. mansoni* ($P>0,05$, Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn, figura 11).

Diferentemente, no tempo 60 dias, o peso do grupo não infectado foi semelhante ao do grupo infectado ($P>0,05$, teste de Mann-Whitney; figura 11), indicando que os camundongos infectados pelo *S. mansoni* recuperaram o peso com o progresso da infecção. Nesse tempo, também não foi observada influência de qualquer tratamento sobre o peso dos camundongos infectados pelo *S. mansoni* ($P>0,05$, Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn, figura 12).

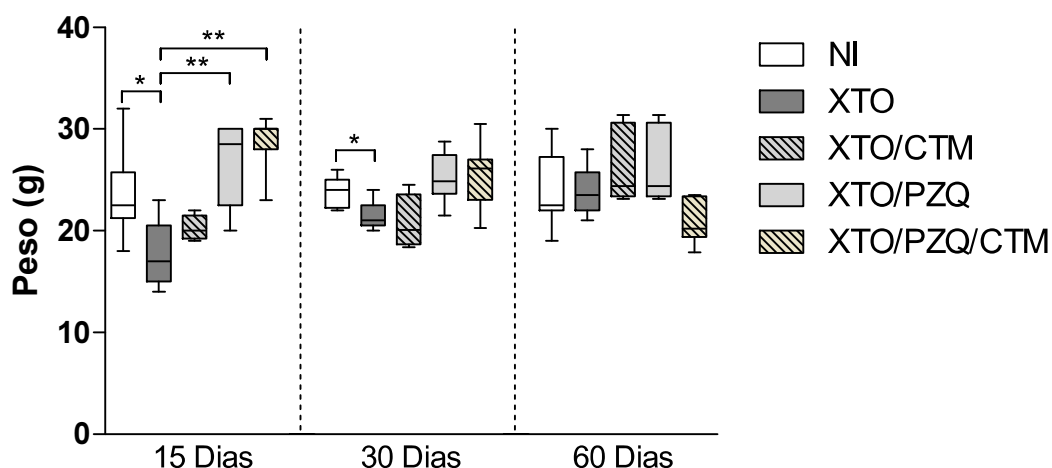


Figura 12: Peso corporal de camundongos C57BL/6 infectados ou não pelo *Schistosoma mansoni* e tratados ou não com CTM-TA e/ou praziquantel. Os dados estão apresentados como mediana, quartis e extremos. O grupo não infectado foi comparado com o grupo infectado utilizando-se o teste de Mann-Whitney. Os grupos infectados foram comparados entre si empregando-se o Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn. (*) $P < 0,05$, (**) $P < 0,01$.

4.5 Influência do tratamento com CTM-TA e/ou praziquantel sobre o número de hemácias na circulação sanguínea de camundongos C57BL/6 infectados pelo *Schistosoma mansoni*

Agentes infecciosos podem causar variação no número de hemácias no sangue. Portanto, para avaliarmos a influência da infecção pelo *S. mansoni*, bem como do tratamento com CTMs e/ou PZQ sobre o número de hemácias no sangue de camundongos C57BL/6 infectados pelo *S. mansoni*, quantificamos o número de hemácias ao final de cada tempo de estudo. Em todos os tempos analisados, o número de hemácias no sangue dos camundongos C57BL/6 não foi afetado pela infecção com *S. mansoni* ($P > 0,05$, teste de Mann-Whitney, figura 12), e nem pelo tratamento com PZQ e/ou CTMs ($P > 0,05$, Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn; figura 13).

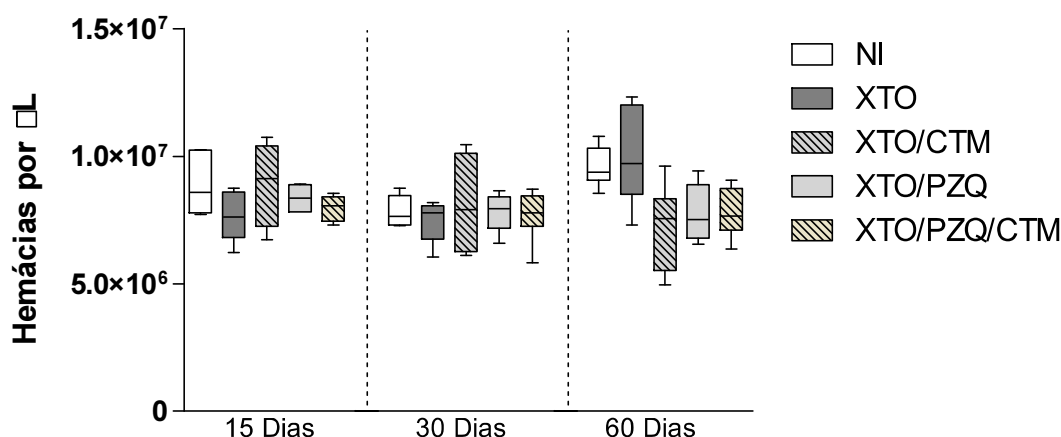


Figura 13: Número de hemácias por microlitro de sangue de camundongos C57BL/6 infectados ou não pelo *S. mansoni* e tratados ou não com CTM-TA e/ou praziquantel. Os dados estão apresentados como mediana, quartis e extremos. O grupo não infectado foi comparado com o grupo infectado utilizando-se o teste de Mann-Whitney. Os grupos infectados foram comparados entre si empregando-se o Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn.

4.6 Influência do tratamento com CTM-TA e/ou praziquantel sobre o número de leucócitos na circulação sanguínea de camundongos C57BL/6 infectados pelo *Schistosoma mansoni*

Agentes infecciosos podem modificar o perfil numérico dos leucócitos na circulação sanguínea. Portanto, para avaliarmos a influência da infecção pelo *S. mansoni*, bem como do tratamento com CTMs e/ou PZQ sobre o número dos leucócitos no sangue de camundongos C57BL/6 infectados pelo *S. mansoni*, quantificamos linfócitos, monócitos, neutrófilos e eosinófilos ao final de cada tempo de estudo. No tempo 15 dias, o número de linfócitos, monócitos, neutrófilos e eosinófilos no sangue dos camundongos C57BL/6 não foi afetado pela infecção com *S. mansoni* ($P > 0,05$, teste de Mann-Whitney, figura 14). Além disso, o tratamento com PZQ e/ou CTMs não afetou o número dessas populações de leucócitos no sangue dos camundongos infectados pelo *S. mansoni* ($P > 0,05$, Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn; figura 14). Da mesma forma, esses tratamentos não afetaram o número de hemácias dos camundongos não infectados.

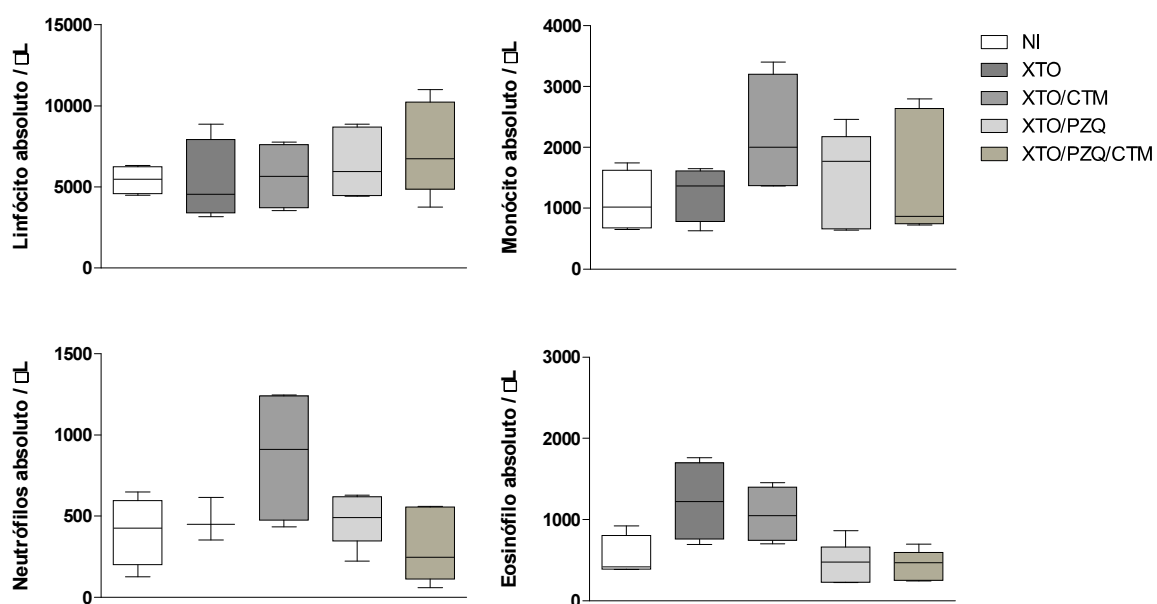


Figura 14. Número de leucócitos por microlitro de sangue de camundongos C57BL/6 infectados ou não pelo *S. mansoni* e tratados ou não com CTM-TA e/ou PZQ, no tempo de 15 dias. Os dados estão apresentados como mediana, quartis e extremos. O grupo não infectado foi comparado com o grupo infectado utilizando-se o teste de Mann-Whitney. Os grupos infectados foram comparados entre si empregando-se o Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn.

Já, no tempo 30 dias, o número de eosinófilos do grupo infectado foi superior ao do grupo não infectado ($P=0,01$, teste de Mann-Whitney; figura 15), indicando que, nesse tempo, a infecção pelo *S. mansoni* causou eosinofilia nos camundongos C57BL/6. Em contrapartida, a infecção não influenciou o número dos linfócitos, monócitos e neutrófilos no sangue dos camundongos C57BL/6 ($P>0,05$, teste de Mann-Whitney; figura 15). Além disso, aos 30 dias, o número de monócitos do grupo infectado e tratado com CTMs e do grupo infectado e tratado com CTMs associada ao PZQ foi superior ao do grupo infectado e não tratado ($P<0,05$, Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn, figura 15). Por outro lado, essa população não foi afetada pelo tratamento somente com PZQ. Nesse mesmo tempo, o número dos demais leucócitos analisados no sangue dos camundongos infectados pelo *S. mansoni* e não infectados não foi afetado pelo tratamento com CTMs e/ou PZQ ($P>0,05$, Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn, figura 15).

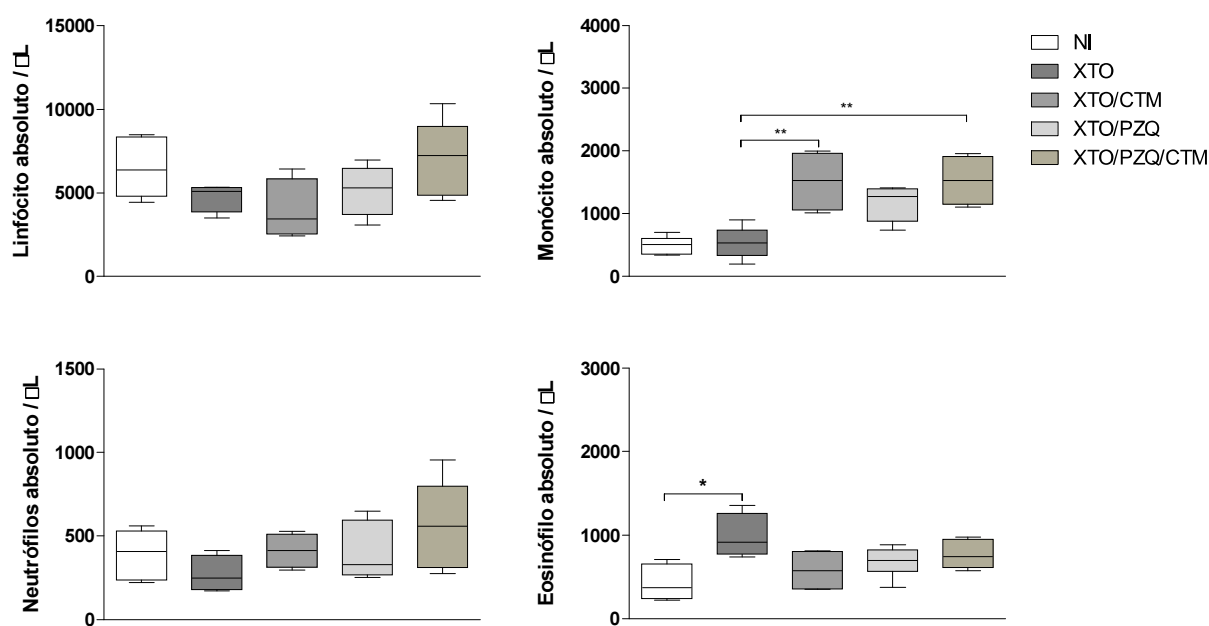


Figura 15. Número de leucócitos por microlitro de sangue de camundongos C57BL/6 infectados ou não pelo *S. mansoni* e tratados ou não com CTM-TA e/ou PZQ, no tempo de 30 dias. Os dados estão apresentados como mediana, quartis e extremos. O grupo não infectado foi comparado com o grupo infectado utilizando-se o teste de Mann-Whitney. Os grupos infectados foram comparados entre si empregando-se o Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn. (*) $P < 0,05$, (**) $P < 0,01$.

No tempo 60 dias, o número de eosinófilos ($P=0,01$, teste de Mann-Whitney; figura 16) e monócitos ($P=0,02$, teste de Mann-Whitney; figura 16) do grupo infectado foi superior ao do grupo não infectado, indicando que, nesse tempo, a infecção causou eosinofilia e monocitose nos camundongos C57BL/6. Contudo, o número de linfócitos e neutrófilos não foi afetado pela infecção com *S. mansoni* ($P > 0,05$; teste de Mann-Whitney; figura 16). Além disso, no tempo 60 dias, o número de linfócitos e monócitos no sangue dos camundongos infectados pelo *S. mansoni* foi reduzido pelo tratamento com CTMs isoladamente ou em associação com PZQ ($P < 0,05$, Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn, figura 16), porém não foi afetado pelo uso isolado do PZQ. Nesse mesmo tempo, o número de neutrófilos e eosinófilos foi reduzido pelo tratamento com CTMs associada ao PZQ ($P < 0,005$; Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn, figura 16), porém não foi afetado pelo uso isolado do PZQ e CTMs. Nos grupos não infectados não observamos alteração significativa no número de leucócitos, frente aos tratamentos avaliados.

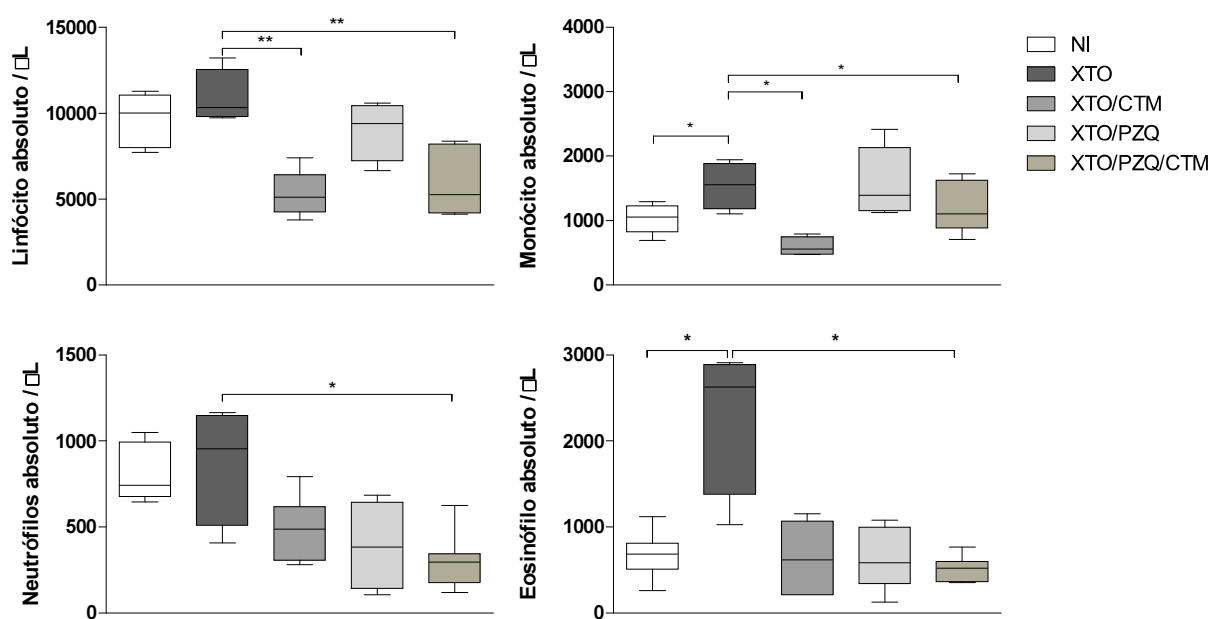


Figura 16. Número de leucócitos por microlitro de sangue de camundongos C57BL/6 infectados ou não pelo *S. mansoni* e tratados ou não com CTM-TA e/ou PZQ, aos 60 dias de tratamento. Os dados estão apresentados como mediana, quartis e extremos. O grupo não infectado foi comparado com o grupo infectado utilizando-se o teste de Mann-Whitney. Os grupos infectados foram comparados entre si empregando-se o Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn. (*) $P < 0,05$, (**) $P < 0,01$.

4.7 Influência do tratamento com CTM-TA e/ou PZQ sobre os níveis de alanina aminotransferase (ALT) no soro de camundongos C57BL/6 infectados pelo *Schistosoma mansoni*

Doenças que causam destruição dos hepatócitos, como as ocasionadas por agentes infecciosos, podem promover elevação da concentração de ALT no soro. Portanto, para avaliarmos a influência da infecção pelo *S. mansoni*, bem como do tratamento com CTMs e/ou PZQ sobre a concentração de ALT no soro de camundongos C57BL/6 infectados pelo *S. mansoni*, quantificamos a ALT no soro dos camundongos ao final de cada tempo de estudo. No tempo 15 dias, a infecção pelo *S. mansoni* ocasionou elevação da concentração de ALT no soro dos camundongos C57BL/6 ($P < 0,0001$, teste *t* não pareado; figura 17). Nesse tempo, a concentração de ALT no soro do grupo infectado e tratado com CTMs associada com PZQ foi inferior à do grupo infectado e não tratado e similar a do grupo não infectado ($P < 0,05$, Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn; figura 17), indicando

que, aos 15 dias, o tratamento associado restabeleceu a concentração de ALT no soro dos camundongos infectados pelo *S. mansoni*, um efeito que não foi observado com os demais tratamentos.

Nos tempos 30 e 60 dias, a concentração de ALT no soro do grupo não infectado também foi inferior à do grupo infectado ($P < 0,0001$, teste *t* não pareado; figura 17), indicando que o nível de ALT no soro dos camundongos infectados pelo *S. mansoni* permaneceu elevado. Entretanto, em ambos os tempos, o nível de ALT no soro dos camundongos infectados pelo *S. mansoni* não foram alterados pelos diferentes tratamentos analisados.

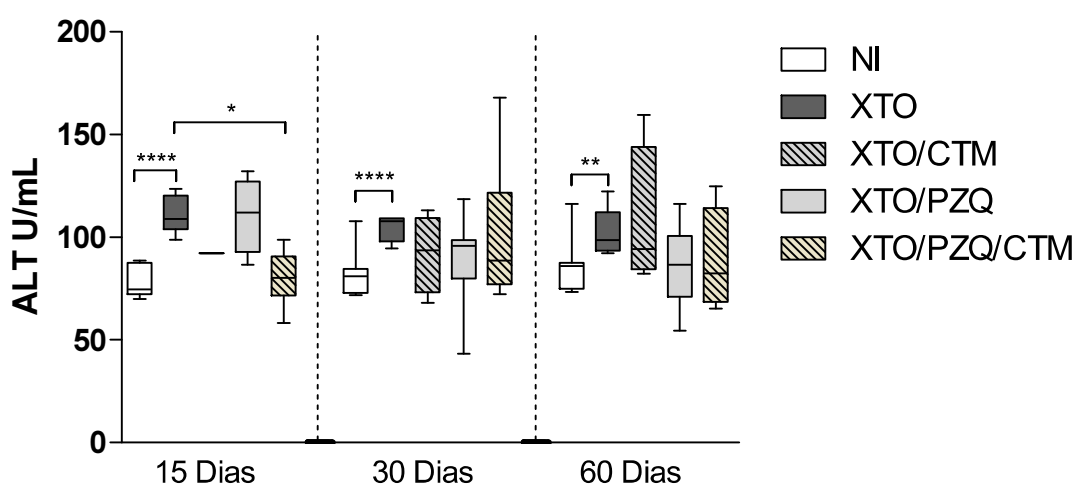


Figura 17. Concentração da enzima alanina aminotransferase por mL de soro de camundongos C57BL/6 infectados ou não pelo *S. mansoni* e tratados ou não com PZQ e/ou CTM-TA derivadas do tecido adiposo. Os dados estão apresentados como mediana, quartis e extremos. O grupo não infectado foi comparado com o grupo XTO utilizando-se o teste *t* não pareado. Os grupos infectados foram comparados entre si empregando-se o ANOVA seguido do teste de Tukey ou o Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn. (*) $P < 0,05$, (****) $P < 0,0001$.

4.8 Influência do tratamento com CTM-TA e/ou PZQ sobre a carga parasitária de camundongos C57BL/6 infectados pelo *Schistosoma mansoni*

Para avaliarmos a influência do tratamento com CTMs e/ou PZQ sobre a carga parasitária de camundongos C57BL/6 infectados pelo *S. mansoni*, quantificamos o número de vermes obtidos pela perfusão das veias mesentéricas ao final de cada tempo de estudo. Em todos os tempos analisados, o número de vermes recuperados do grupo infectado e não tratado foi superior ao número de vermes recuperados do grupo infectado e tratado com PZQ e com CTMs associada com PZQ, porém a diferença somente foi estatisticamente significativa aos 15 e 60 dias ($P < 0,05$, Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn; figura 18). Além disso, o número de vermes recuperados do grupo infectado e não tratado foi semelhante ao do grupo infectado e tratado com CTMs isoladamente ($P > 0,05$, Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn; figura 18).

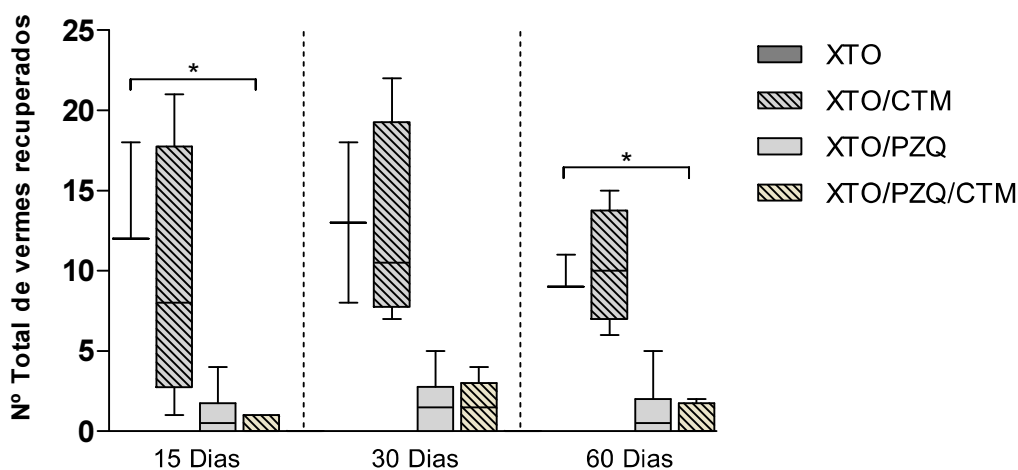


Figura 18. Número de vermes recuperados pela perfusão das veias mesentéricas de camundongos C57BL/6 infectados pelo *S. mansoni* e tratados ou não com PZQ e/ou CTM-TA. Os dados estão apresentados como mediana, quartis e extremos. Os grupos foram comparados entre si empregando-se o Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn. (*) $P < 0,05$.

4.9 Influência do tratamento com CTM-TA e/ou PZQ sobre a morfologia do fígado de camundongos C57BL/6 infectados pelo *Schistosoma mansoni*

4.9.1 Influência do tratamento com CTMs e/ou PZQ sobre a arquitetura do fígado de camundongos C57BL/6 infectados pelo *Schistosoma mansoni*

O fígado é constituído de diversos lóbulos hepáticos, que são unidos por uma massa de tecido conjuntivo, onde se encontram os espaços porta. Essa estrutura pode ser destruída por infecção por agentes hepatotrópicos, como o *S. mansoni*. Portanto, para avaliarmos a influência do tratamento com PZQ associado ou não a CTMs sobre a estrutura do fígado, analisamos a arquitetura hepática no final de cada tempo de estudo.

No tempo 15 dias, 71,4% e 80% dos animais dos grupos tratados com PZQ e com CTMs associada ao PZQ, respectivamente, apresentaram alteração leve da arquitetura hepática. Já os grupos não tratados e tratados com somente CTMs apresentaram 100% de alteração acentuada da arquitetura hepática ($P < 0,05$, teste exato de Fisher; tabela 1). Esses resultados evidenciam que o tratamento com PZQ sozinho ou em associação com CTMs preservou a arquitetura hepática.

Nos tempos 30 e 60 dias, não foram observadas diferenças significativas na arquitetura hepática entre os grupos, já que, em todos, com exceção do grupo tratado com PZQ, 100% ou a maioria dos camundongos apresentaram alteração acentuada da arquitetura hepática.

Os grupos de camundongos não infectados apresentaram 100% da arquitetura hepática normal após o tratamento com PZQ, CTM ou associados, em todos os tempos avaliados.

Tabela 1. Arquitetura hepática de camundongos C57BL/6 infectados pelo *S. mansoni* e tratados ou não com PZQ e/ou CTM-TA

Arquitetura hepática		Grupos de estudo			
		XTO (n=5)	XTO+CTM (n=4)	XTO+PZQ (n=7)	XTO+PZQ/CTM (n=5)
15 dias	<i>Normal</i>	0	0	0	0
	<i>Alteração parcial</i>	0	0	5 (71,4%)	4 (80%)
	<i>Alteração moderada</i>	0	0	2 (28,6%)	1 (20%)
	<i>Alteração extrema</i>	5 (100%)	4 (100%)	0	0
P=0,001, XTO vs XTO+PZQ; P=0,003, XTO vs XTO+PZQ/CTM					
30 dias	<i>Normal</i>	XTO (n=3) 0	XTO+CTM (n=4) 0	XTO+PZQ (n=6) 0	XTO+PZQ/CTM (n=7) 0
	<i>Alteração parcial</i>	0	0	2 (33,3%)	0
	<i>Alteração moderada</i>	0	0	2 (33,3%)	1 (14,3%)
	<i>Alteração extrema</i>	3 (100%)	4 (100%)	2 (33,3%)	6 (85,7%)
Não foram observadas diferenças entre os grupos					
60 dias	<i>Normal</i>	XTO (n=8) 0	XTO+CTM (n=3) 0	XTO+PZQ (n=6) 0	XTO+PZQ/CTM (n=7) 0
	<i>Alteração parcial</i>	0	0	0	0
	<i>Alteração moderada</i>	0	0	0	3 (42,9%)
	<i>Alteração extrema</i>	8 (100%)	3 (100%)	6 (100%)	4 (57,1%)
Não foram observadas diferenças entre os grupos					

4.9.2 Influência do tratamento com CTM-TA e/ou PZQ sobre o número de tratos portais no fígado de camundongos C57BL/6 infectados pelo *Schistosoma mansoni*

O fígado contém numerosos espaços porta, que podem ser destruídos durante a infecção pelo *S. mansoni*. Assim, quantificamos o número de tratos portais nos diferentes grupos de estudo. Em todos os tempos e tratamentos, não foram observadas diferenças no número de tratos portais entre os grupos não infectados e infectados, já que em todos 100% dos animais apresentaram número de tratos portais superior a 10 por amostra em objetiva de 10X (tabela 2).

Tabela 2. Número de tratos portais no fígado de camundongos C57BL/6 infectados pelo *S. mansoni* e tratados ou não com PZQ e/ou CTMs derivadas do tecido adiposo

	Nº Adequado de Tratos portais (>10)	Grupos de estudo			
		XTO (n=5)	XTO+CTM (n=4)	XTO+PZQ (n=7)	XTO+PZQ/CTM (n=5)
15 dias	<i>Sim</i>	5 (100%)	4 (100%)	7 (100%)	5 (100%)
	<i>Não</i>	0	0	0	0
30 dias	<i>Sim</i>	3 (100%)	4 (100%)	6 (100%)	7 (100%)
	<i>Não</i>	0	0	0	0
60 Dias	<i>Sim</i>	8 (100%)	3 (100%)	6 (100%)	7 (100%)
	<i>Não</i>	0	0	0	0

4.9.3 Influência do tratamento com CTM-TA e/ou PZQ sobre a arquitetura do espaço portal no fígado de camundongos C57BL/6 infectados pelo *Schistosoma mansoni*

O espaço porta hepático é uma massa de tecido conjuntivo contido entre os lóbulos hepáticos que alberga vasos, ductos e nervos biliares. O fígado contém numerosas dessas estruturas que durante a resposta contra agentes infecciosos,

como o *S. mansoni*, podem se tornar progressivamente infiltrados com células inflamatórias, o que pode causar seu alargamento, deformação e/ou destruição. Portanto, para avaliarmos a influência da infecção pelo *S. mansoni*, bem como do tratamento com CTMs e/ou PZQ sobre a arquitetura do espaço porta hepático, analisamos os cortes histológicos, de acordo com os critérios apresentados na figura 14. No tempo 15 dias, a arquitetura do espaço portal dos grupos XTO tratados com PZQ ou CTMs associadas com PZQ estava mais preservada, com 85,7% e 100% dos animais, respectivamente, apresentando espaço portal alargado e com septos incompletos, do que a dos grupos XTO não tratados ou tratados somente com CTMs, que teve 100% dos animais apresentando espaço portal alargado e com septos coalescentes ($P < 0,05$, teste exato de Fisher; tabela 3).

Nos tempos 30 e 60 dias, não foram observadas diferenças na arquitetura do espaço portal entre os grupos, já que em todos, com exceção do grupo tratado com PZQ, 100% ou a maioria dos camundongos apresentaram espaço portal alargado e com septos coalescentes. Os animais dos grupos NI apresentaram o espaço portal totalmente preservado ou normal, em todos os tempos e tratamentos avaliados.

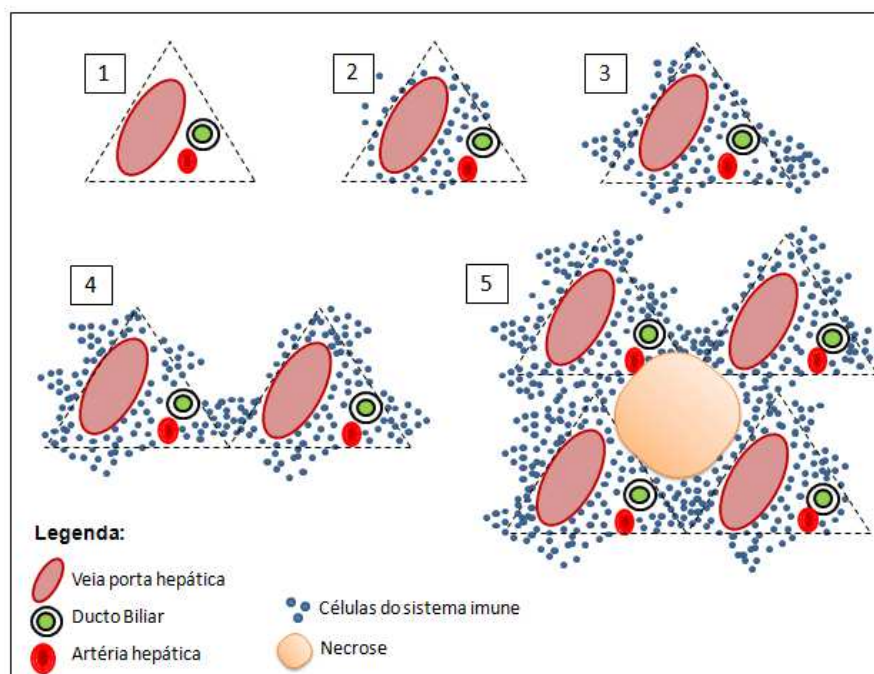


Figura 19. Esquema dos critérios utilizados para avaliação da arquitetura do espaço porta. 1: Trato portal totalmente preservado ou normal; 2: Trato portal alargado, mas sem septos; 3: Trato portal alargado e com septos incompletos; 4: Trato portal alargados e com septos completos ou pontes ou coalescente; 5: Cirrose.

Tabela 3. Arquitetura do espaço portal no fígado de camundongos C57BL/6 infectados pelo *S. mansoni* e tratados ou não com PZQ e/ou CTM-TA (Continua)

	Arquitetura do espaço portal	Grupos de estudo			
		XTO (n=5)	XTO+CTM (n=4)	XTO+PZQ (n=7)	XTO+PZQ/CTM (n=5)
15 dias	<i>Normal</i>	0	0	0	0
	<i>Alargados, mas sem septos</i>	0	0	0	0
	<i>Alargados e com septos incompletos</i>	0	0	6 (85,7%)	5 (100%)
	<i>Alargados e com septos completos ou pontes ou coalescente</i>	5 (100%)	4 (100%)	1 (14,3%)	0
<p>$P=0,007$, XTO vs XTO/PZQ; $P=0,003$, XTO vs XTO/PZQ/CTM $P=0,01$, XTO/CTM vs XTO/PZQ; $P=0,007$, XTO/CTM vs XTO/PZQ/CTM</p>					
30 dias	<i>Normal</i>	XTO (n=3) 0	XTO+CTM (n=4) 0	XTO+PZQ (n=6) 0	XTO+PZQ/CTM (n=7) 0
	<i>Alargados, mas sem septos</i>	0	0	0	0
	<i>Alargados e com septos incompletos</i>	0	0	3 (50%)	1 (14,3%)
	<i>Alargados e com septos completos ou pontes ou coalescente</i>	3 (100%)	4 (100%)	3 (50%)	6 (85,7%)
<p>Não foram observadas diferenças entre os grupos</p>					
60 dias	<i>Normal</i>	XTO (n=8) 0	XTO+CTM (n=3) 0	XTO+PZQ (n=6) 0	XTO+PZQ/CTM (n=7) 0
	<i>Alargados, mas sem septos</i>	0	0	0	0

□

□

Tabela 3. Arquitetura do espaço portal no fígado de camundongos C57BL/6 infectados pelo *S. mansoni* e tratados ou não com PZQ e/ou CTMs (Continuação)

	XTO (n=8)	XTO+CTM (n=3)	XTO+PZQ (n=6)	XTO+PZQ/CTM (n=7)
60 dias	<i>Alargados e com septos incompletos</i>	0	0	3 (42,9%)
	<i>Alargados e com septos completos ou pontes ou coalescente</i>	8 (100%)	3 (100%)	6 (100%)

Não foram observadas diferenças entre os grupos

(Conclusão).

4.9.4 Influência do tratamento com CTM-TA e/ou PZQ sobre quantidade de infiltrado inflamatório portal no fígado de camundongos C57BL/6 infectados pelo *Schistosoma mansoni*

Pelo fato da infecção com *S. mansoni* estimular a migração de numerosas células para o espaço porta hepático, analisamos a quantidade de infiltrado inflamatório portal, avaliando o grau mais elevado do infiltrado de células do sistema imune por amostra. No tempo 15 dias, a quantidade do infiltrado inflamatório portal dos grupos tratados com PZQ ou CTMs associadas com PZQ foi menor do que a dos grupos não tratado e tratado com CTMs, já que, respectivamente, nos grupos tratados com PZQ ou com CTMs associadas com PZQ, 0,0% e 40% dos camundongos apresentaram infiltrado inflamatório portal moderado e 28,6% e 0,0% infiltrado inflamatório portal acentuado, enquanto que, 100% dos animais dos grupos não tratado ou tratado com CTMs apresentaram infiltrado inflamatório portal acentuado ($P < 0,05$, teste exato de Fisher; tabela 4). Nos tempos 30 e 60 dias, não foram observadas diferenças na quantidade do infiltrado inflamatório entre os grupos, já que em todos, com exceção do grupo tratado com PZQ, 100% ou a maioria dos camundongos apresentaram infiltrado inflamatório portal acentuado.

Os animais não infectados não apresentaram infiltrado inflamatório portal após os tratamentos com PZQ, CTM ou associado, em todos os tempos analisados.

Tabela 4: Quantidade de infiltrado inflamatório portal no fígado de camundongos C57BL/6 infectados pelo *S. mansoni* e tratados ou não com PZQ e/ou CTM-TA

Infiltrado Inflamatório Portal	Grupos de estudo			
	XTO (n=5)	XTO+CTM (n=4)	XTO+PZQ (n=7)	XTO+PZQ/CTM (n=5)
15 dias	Ausente	0	0	0
	Discreto	0	0	2 (40%)
	Moderado	0	0	5 (71,4%)
	Acentuado	5 (100%)	4 (100%)	2 (28,6%)
P=0,02, XTO vs XTO/PZQ; P=0,003, XTO vs XTO/PZQ/CTM; P=0,007, XTO/CTM vs XTO/PZQ/CTM				
30 dias	Ausente	0	0	0
	Discreto	0	0	0
	Moderado	0	0	4 (66,7%)
	Acentuado	3 (100%)	4 (100%)	2 (33,3%)
Não foram observadas diferenças entre os grupos				
60 dias	Ausente	0	0	0
	Discreto	0	0	0
	Moderado	0	0	3 (42,9%)
	Acentuado	8 (100%)	3 (100%)	6 (100%)
Não foram observadas diferenças entre os grupos				

4.9.5 Influência do tratamento com CTM-TA e/ou PZQ sobre a presença de granulomas portais no fígado de camundongos C57BL/6 infectados pelo *Schistosoma mansoni*

Pelo fato dos granulomas estarem envolvidos na patogênese e resposta inflamatória na esquistossomose, quantificamos o percentual de animais apresentando granulomas portais. Em todos os tempos, 100% ou a maioria dos camundongos infectados de todos os grupos apresentaram granulomas portais no fígado (tabela 5). Os animais que não apresentaram granulomas ou qualquer evidência de infecção por *S. mansoni*, como a presença de vermes adultos foram excluídos de todas as análises para não interferirem negativamente nos resultados obtidos.

Tabela 5: Presença de granulomas portais no fígado de camundongos C57BL/6 infectados pelo *S. mansoni* e tratados ou não com PZQ e/ou CTM-TA

Presença de Granuloma Portal		Grupos de estudo			
		XTO (n=5)	XTO+CTM (n=4)	XTO+PZQ (n=7)	XTO+PZQ/CTM (n=7)
15 dias	<i>Sim</i>	5 (100%)	4 (100%)	7 (100%)	5 (71,4%)
	<i>Não</i>	0	0	0	2 (28,6%)
30 dias	<i>Sim</i>	3 (75%)	4 (100%)	6 (85,7%)	7 (87,5%)
	<i>Não</i>	1 (25%)	0	1 (14,3%)	1 (14,5%)
60 Dias	<i>Sim</i>	8 (100%)	3 (60%)	6 (100%)	7 (87,5%)
	<i>Não</i>	0	2 (40%)	0	1 (12,5%)

4.9.6 Influência do tratamento com CTM-TA e/ou PZQ sobre a quantidade de granulomas no fígado de camundongos C57BL/6 infectados pelo *Schistosoma mansoni*

Como o número de granulomas se relaciona com a intensidade do dano hepático na esquistossomose mansoni, quantificamos os granulomas no fígado, analisando o número máximo de granulomas por amostra. Em todos os tempos avaliados, 100% ou a maioria dos camundongos infectados de todos os grupos apresentaram quantidade muito acentuada de granulomas no fígado (tabela 6). Porém, após 15 dias do tratamento com PZQ associado à CTMs houve redução não significativa da quantidade de granulomas para o grau acentuado em 40% dos animais. Uma vez que o grupo não infectado não desenvolveu granulomas, esse parâmetro não foi avaliado no mesmo.

Tabela 6: Quantidade de granulomas no fígado de camundongos C57BL/6 infectados pelo *S. mansoni* e tratados ou não com PZQ e/ou CTM-TA

	Quantidade de Granulomas	Grupos de estudo			
		XTO (n=5)	XTO+CTM (n=4)	XTO+PZQ (n=7)	XTO+PZQ/CTM (n=5)
15 dias	<i>Discreto</i>	0	0	0	0
	<i>Moderado</i>	0	0	0	0
	<i>Acentuado</i>	0	0	0	2 (40%)
	<i>Muito Acentuado</i>	5 (100%)	4 (100%)	7 (100%)	3 (60%)
	Não foram observadas diferenças entre os grupos				
30 dias		XTO (n=3)	XTO+CTM (n=4)	XTO+PZQ (n=6)	XTO+PZQ/CTM (n=7)
	<i>Discreto</i>	0	0	1 (16,7%)	0
	<i>Moderado</i>	0	0	0	0
	<i>Acentuado</i>	0	0	0	0
	<i>Muito Acentuado</i>	3 (100%)	4 (100%)	5 (83,3%)	7 (100%)
Não foram observadas diferenças entre os grupos					
60 dias		XTO (n=8)	XTO+CTM (n=3)	XTO+PZQ (n=6)	XTO+PZQ/CTM (n=7)
	<i>Discreto</i>	0	0	0	0
	<i>Moderado</i>	0	0	0	0
	<i>Acentuado</i>	0	0	0	0
	<i>Muito Acentuado</i>	8 (100%)	3 (100%)	6 (100%)	7 (100%)
Não foram observadas diferenças entre os grupos					

4.9.7 Influência do tratamento com CTM-TA e/ou PZQ sobre a constituição dos granulomas no fígado de camundongos C57BL/6 infectados pelo *Schistosoma mansoni*

Como os tipos de células que compõem os granulomas estão relacionadas a patogênese da esquistossomose, analisamos a constituição dos granulomas no fígado. No tempo 15 dias, o grupo tratado com CTMs associadas ao PZQ apresentou menor heterogeneidade na constituição dos granulomas quando 60% dos camundongos tiveram granulomas constituídos de linfócitos, monócitos, plasmócitos e eosinófilos. Cerca de 71,4% dos animais tratados com PZQ apresentaram granulomas constituídos de linfócitos, monócitos, plasmócitos,

eosinófilos e células gigantes. A complexidade dos granulomas foi maior nos grupos infectados não tratados ou tratados somente com CTM. ($P < 0,05$, teste exato de Fisher; tabela 7), um efeito que não foi observado nos demais tempos analisados.

Mesmo que não significativos, os resultados após 30 dias dos tratamentos mostraram que o único grupo que apresentou granulomas com menor complexidade foi o tratado com PZQ. Os demais apresentaram 71,4% de camundongos com granulomas formados por linfócitos, macrófagos, eosinófilos, plasmócitos e células gigantes, quando tratados com PZQ e CTM, e 75% dos camundongos com granulomas contendo linfócitos, macrófagos, eosinófilos, plasmócitos, células gigantes e neutrófilos, quando tratados com CTM. Após 60 dias dos tratamentos, os grupos XTO, XTO/CTM e XTO/PZQ tiveram a maior parte dos camundongos com granulomas complexos, contendo todas as células analisadas. Somente o tratamento associado (XTO/PZQ/CTM) foi capaz de manter 57,1% dos camundongos com granulomas contendo linfócitos, macrófagos, eosinófilos, plasmócitos e células gigantes.

A análise da constituição dos granulomas não foi feita nos grupos não infectados porque os mesmos não apresentaram esta reação.

Tabela 7: Constituição dos granulomas no fígado de camundongos C57BL/6 infectados pelo *S. mansoni* e tratados ou não com PZQ e/ou CTM-TA

Constituição dos Granulomas		Grupos de estudo			
		XTO (n=5)	XTO+CTM (n=4)	XTO+PZQ (n=7)	XTO+PZQ/CTM (n=5)
15 dias	<i>Linfócito, Macrófago e Eosinófilo</i>	0	0	0	0
	<i>Linfócito, Macrófago, Eosinófilo e Plasmócito</i>	0	0	2 (28,6%)	3 (60%)
	<i>Linfócito, Macrófago, Eosinófilo, Plasmócito e Células Gigantes</i>	0	1 (25%)	5 (71,4%)	1 (20%)
	<i>Linfócito, Macrófago, Eosinófilo, Plasmócito, Células Gigantes e Neutrófilo</i>	5 (100%)	3 (75%)	0	1 (20%)
<i>P=0,001, XTO vs XTO/PZQ; P=0,02, XTO vs XTO/PZQ/CTM; P=0,03, XTO/CTM vs XTO/PZQ</i>					
30 dias	<i>Linfócito, Macrófago e Eosinófilo</i>	0	0	0	0
	<i>Linfócito, Macrófago, Eosinófilo e Plasmócito</i>	0	0	2 (33,3%)	0
	<i>Linfócito, Macrófago, Eosinófilo, Plasmócito e Células Gigantes</i>	0	1 (25%)	3 (50%)	5 (71,4%)
	<i>Linfócito, Macrófago, Eosinófilo, Plasmócito, Células Gigantes e Neutrófilo</i>	3 100%	3 (75%)	1 (16,7%)	2 (28,6%)
Não foram observadas diferenças entre os grupos					
60 dias	<i>Linfócito, Macrófago e Eosinófilo</i>	0	0	0	0
	<i>Linfócito, Macrófago, Eosinófilo e Plasmócito</i>	0	0	0	0
	<i>Linfócito, Macrófago, Eosinófilo, Plasmócito e Células Gigantes</i>	2 (25%)	0	2 (33,3%)	4 (57,1%)
	<i>Linfócito, Macrófago, Eosinófilo, Plasmócito, Células Gigantes e Neutrófilo</i>	6 (75%)	3 (100%)	4 (67,7%)	3 (42,9%)
Não foram observadas diferenças entre os grupos					

4.9.8 Influência do tratamento com CTM-TA e/ou PZQ sobre a fase dos granulomas no fígado de camundongos C57BL/6 infectados pelo *Schistosoma mansoni*

O granuloma esquistossomótico pode conter diferentes tipos de leucócitos, além de quantidade variada de tecido conjuntivo, dependendo da fase de desenvolvimento. Na fase exsudativa, os granulomas apresentam células mononucleares, neutrófilos e eosinófilos ao redor do ovo recém-depositado, além de áreas de destruição tecidual. Na fase precoce, os granulomas passam a apresentar histiócitos e células epitelióides, além de fibrócitos que iniciam a deposição de colágeno. Na fase avançada, o ovo se torna degenerado e fibrócitos e fibras colágenas se tornam mais proeminentes, enquanto que as células diminuem em número. Já na fase tardia, os granulomas encontram-se com tamanho reduzido e exibem hialuronização das fibras colágenas e o ovo se encontra desintegrado. Os critérios utilizados para analisar a influência do tratamento com CTMs e/ou PZQ sobre a fase dos granulomas no fígado de camundongos infectados pelo *S. mansoni* estão representados na figura 20.

No tempo 15 dias, no grupo tratado com PZQ, 28,6% dos camundongos apresentaram granulomas na fase exsudativa, 57,1% granulomas na fase avançada e 14,3% na fase fibrótica, enquanto que no grupo não tratado, 100% dos camundongos apresentaram granulomas na fase exsudativa ($P < 0,01$, teste exato de Fisher, tabela 8). Já aos 30 dias, no grupo tratado com CTMs, 57,1% dos camundongos apresentaram granulomas na fase exsudativa e 42,9% na fase precoce, enquanto que no grupo não tratado 66,7% apresentaram granulomas na fase precoce e 33,3% na fase avançada ($P < 0,05$, teste exato de Fisher, tabela 8).

No tempo 60 dias, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos estudados. Os grupos de camundongos não infectados não apresentaram essa análise uma vez que não desenvolveram granulomas.

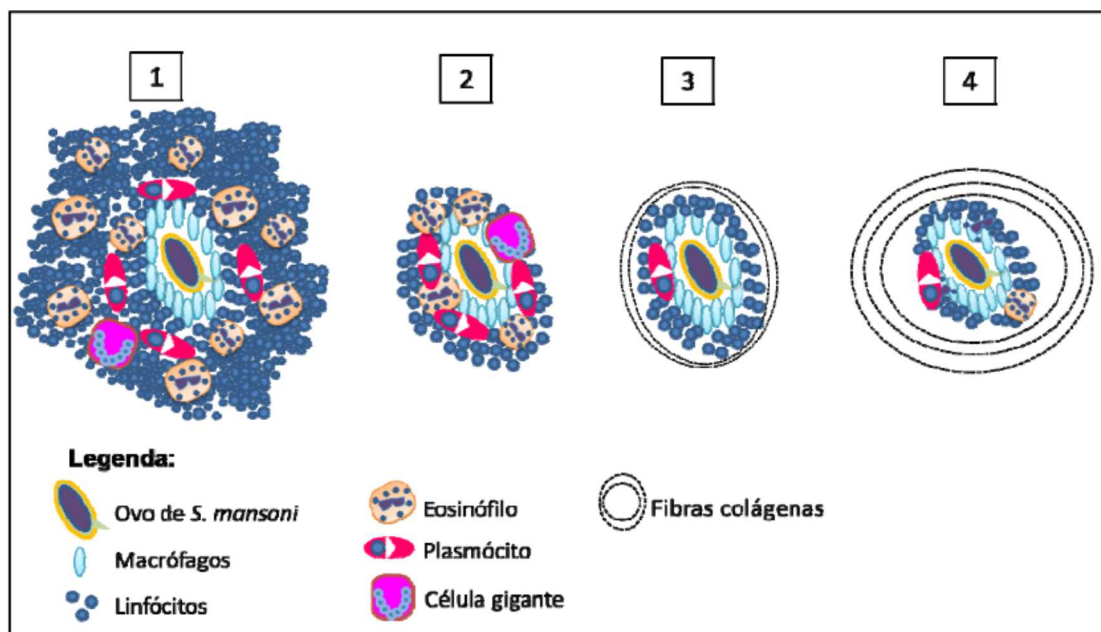


Figura 20. Esquema dos critérios utilizados para avaliação das diferentes fases do granuloma. Em 1: Granuloma exsudativo, tamanho maior e grande número de células inflamatórias. 2: Granuloma precoce, tamanho menor que o exsudativo e apresenta diversos tipos de células inflamatórias em sua constituição. 3: Granuloma avançado, apresenta diminuição do tamanho, número e tipos de células inflamatórias; nesta fase, inicia-se a deposição de fibras colágenas. 4: Granuloma fibrótico, tamanho e número de células inflamatórias reduzidos; aumento na deposição de fibras colágenas.

Tabela 8: Fase dos granulomas presentes no fígado de camundongos C57BL/6 infectados pelo *S. mansoni* e tratados ou não com PZQ e/ou CTM-TA

Fase do Granuloma	Grupos de estudo				
	XTO (n=5)	XTO+CTM (n=4)	XTO+PZQ (n=7)	XTO+PZQ/CTM (n=5)	
15 dias	Exsudativo	0	2 (50%)	2 (28,6%)	0
	Precoce	5 (100%)	2 (50%)	0	2 (40%)
	Avançado	0	0	4 (57,1%)	2 (40%)
	Fibrótico	0	0	1 (14,3%)	1 (20%)
<i>P</i> =0,001, XTO vs XTO/PZQ					
30 dias	Exsudativo	0	2 (50%)	2 (33%)	4 (57,1%)
	Precoce	2 (66,7%)	2 (50%)	3 (50%)	0
	Avançado	1 (33,3%)	0	1 (16,7%)	3 (42,9%)
	Fibrótico	0	0	0	0
<i>P</i> =0,03, XTO vs XTO/PZQ/CTM					
60 dias	Exsudativo	1 (12,5%)	2 (66,7%)	1 (16,7%)	4 (57,1%)
	Precoce	1 (12,5%)	1 (33,3%)	3 (50%)	0
	Avançado	6 (75%)	0	2 (33,3%)	3 (42,9%)
	Fibrótico	0	0	0	0
Não foram observadas diferenças entre os grupos					

4.9.9 Influência do tratamento com CTM-TA e/ou PZQ sobre o tamanho dos granulomas no fígado de camundongos C57BL/6 infectados pelo *Schistosoma mansoni*

Pelo fato do tamanho do granuloma esquistosomótico se relacionar com a reatividade do hospedeiro contra os ovos do parasito, quantificamos o tamanho dos granulomas nos diferentes grupos de estudo, analisando o maior granuloma não exsudativo e/ou não coalescente por amostra. No tempo 15 dias, o tamanho médio dos granulomas dos grupos não tratado (2,8 mm) e tratado com CTMs (3,3 mm) foi superior somente ao do grupo tratado com CTMs associada ao PZQ (1,3 mm) ($P < 0,05$, Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn, figura 21A). Este dado é muito interessante porque indica que nesse período o tratamento associado reduziu o tamanho dos granulomas dos camundongos infectados pelo *S. mansoni*. Nesse tempo, no entanto, não foi observada influência dos demais tratamentos sobre o tamanho médio dos granulomas ($P < 0,05$, Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn, figura 21A). Além disso, aos 30 e 60 dias, não houve diferenças no tamanho médio dos granulomas entre os grupos estudados. Imagens representativas dos granulomas de camundongos de diferentes grupos de tratamento, no tempo 15 dias, encontram-se na figura 21B.

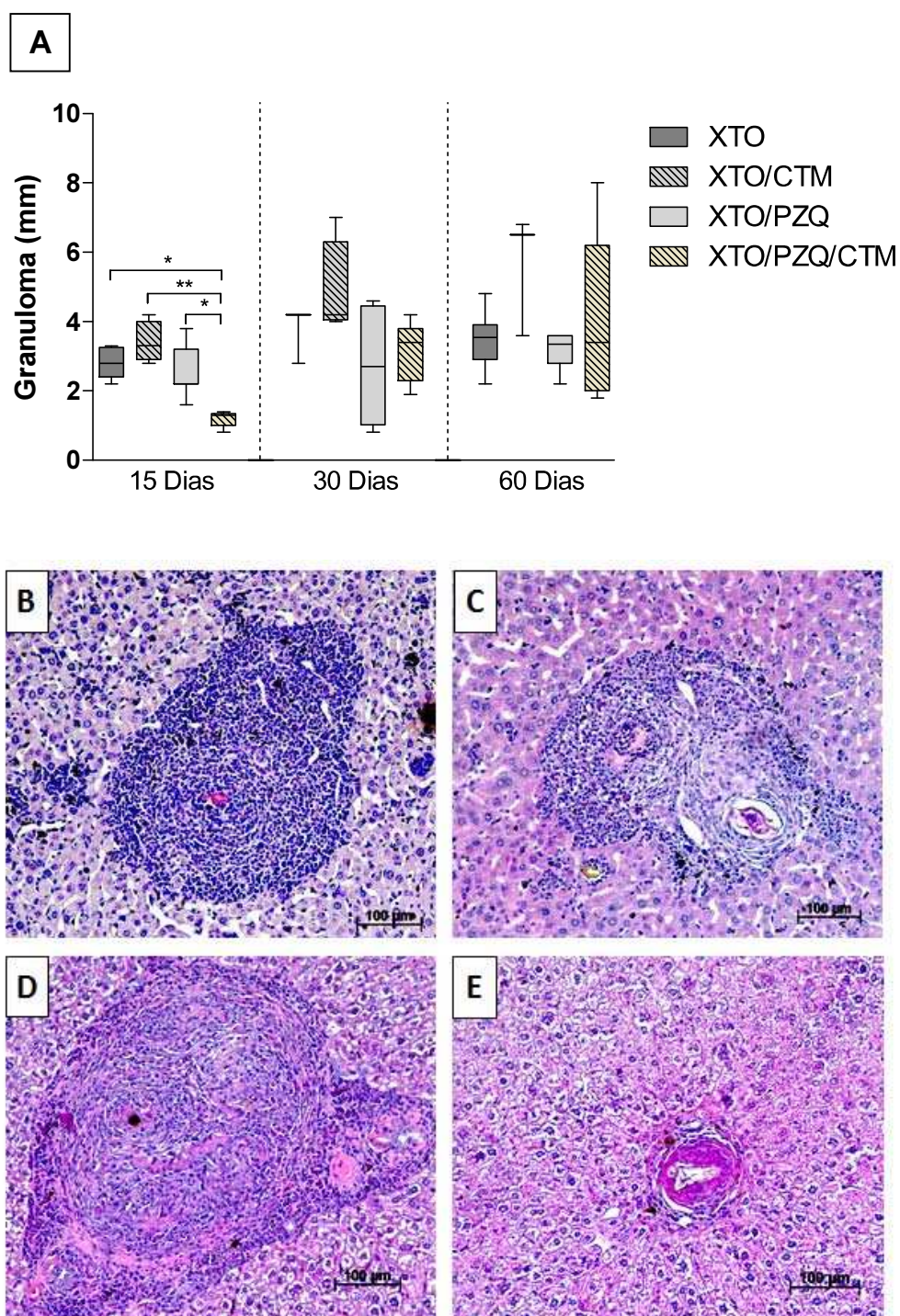


Figura 21. Tamanho dos granulomas no fígado de camundongos C57BL/6 infectados pelo *S. mansoni* e tratados ou não com PZQ e/ou CTM-TA. Em A: Tamanho dos granulomas em micrômetros. Os dados estão apresentados como mediana, quartis e extremos. Os grupos infectados foram comparados entre si empregando-se o Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn. (*) $P < 0,05$, (**) $P < 0,01$. Imagens representativas do tamanho dos granulomas dos diferentes grupos de tratamento, no tempo 15 dias. Em B: Grupo XTO. Em C: Grupo XTO/CTM. Em D: XTO/PZQ. Em E: Grupo XTO/PZQ/CTM. Coloração com hematoxilina e eosina. Imagens obtidas por microscopia óptica e em aumento de 20 X.

4.9.10 Influência do tratamento com CTM-TA e/ou PZQ sobre a atividade inflamatória periportal no fígado de camundongos C57BL/6 infectados pelo *Schistosoma mansoni*

Pelo fato da infecção pelo *S. mansoni* induzir inflamação nas regiões próximas ao espaço porta, quantificamos a atividade inflamatória periportal, analisando o maior grau de inflamação por amostra. No tempo 15 dias, os grupos tratados com PZQ e CTMs associadas ao PZQ apresentaram menor atividade inflamatória periportal do que os grupos não tratados e tratados com CTMs. ($P < 0,05$, teste exato de Fisher, tabela 9, Figura 21). Nos tempos 30 e 60 dias, não houveram diferenças significativas entre os grupos estudados, já que em todos os grupos ou a maioria apresentaram necrose saca-bocado discreta.

Os camundongos não infectados não apresentaram nenhuma atividade inflamatória periportal antes e após os tratamentos recebidos com PZQ, CTM ou associados.

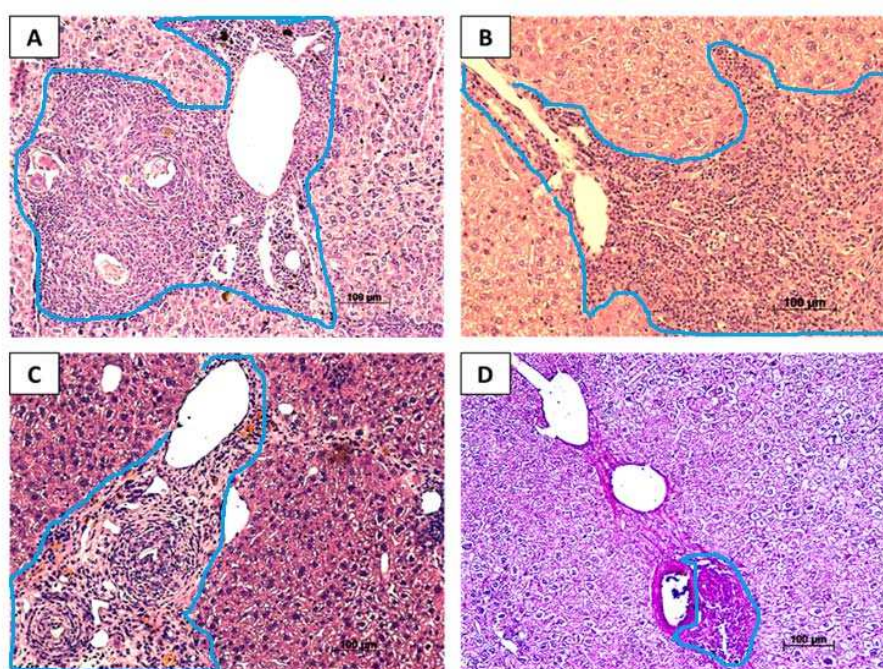


Figura 22. Atividade inflamatória periportal (contornado em azul) no fígado de camundongos C57BL/6 infectados pelo *S. mansoni* e tratados ou não com PZQ e/ou CTM-TA. Imagens representativas do infiltrado inflamatório portal, no tempo 15 dias. Em A: Grupo XTO. Em B: Grupo XTO/CTM. Em C: XTO/PZQ. Em D: Grupo XTO/PZQ/CTM. Coloração com hematoxilina e eosina. Imagens obtidas por microscopia óptica e em aumento de 20X.

Tabela 9. Atividade inflamatória periportal no fígado de camundongos C57BL/6 infectados pelo *S. mansoni* e tratados ou não com PZQ e/ou CTM-TA

	Atividade Inflamatória Periportal	Grupos de estudo			
		XTO (n=5)	XTO+CTM (n=4)	XTO+PZQ (n=7)	XTO+PZQ/CTM (n=5)
15 dias	<i>Nenhuma atividade periportal</i>	0	0	0	0
	<i>Extravasamento de linfócitos</i>	0	0	0	1 (20%)
	<i>Necrose sacabocado discreta</i>	0	0	5 (71,4%)	4 (80%)
	<i>Necrose sacabocado moderada</i>	5 (100%)	4 (100%)	2 (28,6%)	0
	<i>Necrose sacabocado Acetuada</i>	0	0	0	0
<i>P=0,02, XTO vs XTO/PZQ; P=0,003, XTO vs XTO/PZQ/CTM; P=0,007, XTO/CTM vs XTO/PZQ/CTM</i>					
30 dias	<i>Nenhuma atividade periportal</i>	XTO (n=3) 0	XTO+CTM (n=4) 0	XTO+PZQ (n=6) 0	XTO+PZQ/CTM (n=7) 0
	<i>Extravasamento de linfócitos</i>	0	0	3 (50%)	1 (14,3%)
	<i>Necrose sacabocado discreta</i>	3 (100%)	4 (100%)	3 (50%)	6 (85,7%)
	<i>Necrose sacabocado moderada</i>	0	0	0	0
Não foram observadas diferenças entre os grupos					
60 dias	<i>Nenhuma atividade periportal</i>	XTO (n=8) 0	XTO+CTM (n=3) 0	XTO+PZQ (n=6) 0	XTO+PZQ/CTM (n=7) 2 (28,6%)
	<i>Extravasamento de linfócitos</i>	0	0	0	0
	<i>Necrose sacabocado discreta</i>	8 (100%)	3 (100%)	6 (100%)	5 (71,4%)
	<i>Necrose sacabocado moderada</i>	0	0	0	0
Não foram observadas diferenças entre os grupos					

4.9.11 Influência do tratamento com CTM-TA e/ou PZQ sobre a atividade inflamatória no parênquima do fígado de camundongos C57BL/6 infectados pelo *Schistosoma mansoni*

Como a atividade inflamatória na infecção pelo *S. mansoni* pode avançar pelo lóbulo hepático, quantificamos a atividade inflamatória no parênquima, analisando o maior grau de inflamação por amostra. No tempo 15 dias, os grupos tratados com PZQ ou CTMs associadas ao PZQ apresentaram 71,4% e 60% dos camundongos, respectivamente, com menor atividade inflamatória no parênquima (necrose focal em vários sítios) do que os grupos não tratados ou tratados com CTMs. ($P < 0,05$, teste exato de Fisher, tabela 10). Nos tempos 30 e 60 dias, não houveram diferenças significativas entre os grupos estudados, já que em todos os grupos, ou a maioria dos camundongos apresentaram necrose focal e confluyente.

Tabela 10. Análise da atividade inflamatória no parênquima do fígado de camundongos C57BL/6 infectados pelo *S. mansoni* e tratados ou não com PZQ e/ou CTM-TA

Atividade Inflamatória no Parênquima		Grupos de estudo			
		XTO (n=5)	XTO+CTM (n=4)	XTO+PZQ (n=7)	XTO+PZQ/CTM (n=5)
15 dias	<i>Atividade discreta e focal</i>	0	0	0	2 40%
	<i>Necrose focal em vários sítios</i>	0	0	5 (71,4%)	3 60%
	<i>Necrose focal e confluyente</i>	5 (100%)	4 (100%)	2 (28,6%)	0
	<i>Necrose focal extensa</i>	0	0	0	0
<i>P=0,02, XTO vs XTO/PZQ; P=0,003, XTO vs XTO/PZQ/CTM; P=0,007, XTO/CTM vs XTO/PZQ/CTM</i>					
30 dias	<i>Atividade discreta e focal</i>	0	0	0	0
	<i>Necrose focal em vários sítios</i>	0	0	3 (50%)	1 (14,3%)
	<i>Necrose focal e confluyente</i>	3 (100%)	4 (100%)	3 (50%)	6 (85,7%)
	<i>Necrose focal extensa</i>	0	0	0	0
Não foram observadas diferenças entre os grupos					
60 dias	<i>Atividade discreta e focal</i>	0	0	0	0
	<i>Necrose focal em vários sítios</i>	0	0	0	2 (28,6%)
	<i>Necrose focal e confluyente</i>	8 (100%)	3 (100%)	6 (100%)	5 (71,4%)
	<i>Necrose focal extensa</i>	0	0	0	0
Não foram observadas diferenças entre os grupos					

4.9.12 Influência do tratamento com CTM-TA e/ou PZQ sobre a viabilidade dos ovos no fígado de camundongos C57BL/6 infectados pelo *Schistosoma mansoni*

Pelo fato dos ovos de *S. mansoni* perderem a viabilidade a medida em que os granulomas se desenvolvem, avaliamos a viabilidade dos ovos presentes no fígado, quantificando os ovos viáveis e inviáveis por amostra. Os ovos foram considerados viáveis quando continham miracídios com núcleo hipercrômico e inviáveis quando continham miracídios com núcleos com múltiplas áreas claras (figura 23). Em todos os tempos analisados, nos grupos tratados com PZQ somente ou em associação com CTMs, a maioria dos camundongos apresentaram granulomas contendo ovos inviáveis, enquanto que nos grupos não tratado ou tratado com CTM, 100% dos camundongos apresentaram granulomas contendo ovos viáveis ($P < 0,05$, teste exato de Fisher, tabela 11).

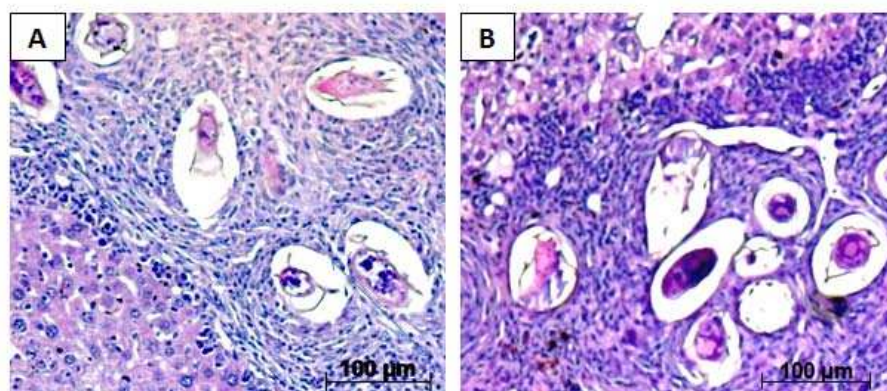


Figura 23. Imagens representativas de ovos de *S. mansoni* com diferentes graus de viabilidade. Em A: Ovos inviáveis, apresentando poucos núcleos corados com hematoxilina. Em B: Ovos viáveis, apresentando núcleos hipercrômicos. Coloração com hematoxilina e eosina. Imagens obtidas por microscopia óptica e em aumento de 20 X.

Tabela 11: Viabilidade dos ovos de *S. mansoni* no fígado de camundongos C57BL/6 infectados pelo *S. mansoni* e tratados ou não com PZQ e/ou CTM-TA

Viabilidade dos Ovos		Grupos de estudo			
		XTO (n=5)	XTO+CTM (n=4)	XTO+PZQ (n=7)	XTO+PZQ/CTM (n=7)
15 dias	Maioria Inviável	0	0	6 (85,7%)	7 (100%)
	Maioria Viável	5 (100%)	4 (100%)	1 (14,3%)	0
$P=0,007$, XTO vs XTO/PZQ; $P=0,001$, XTO vs XTO/PZQ/CTM; $P=0,007$, XTO/CTM vs XTO/PZQ; $P=0,01$, XTO/CTM vs XTO/PZQ/CTM					
		XTO (n=4)	XTO+CTM (n=4)	XTO+PZQ (n=7)	XTO+PZQ/CTM (n=8)
30 dias	Maioria Inviável	0	0	6 (83,3%)	7 (85,7%)
	Maioria Viável	4 (100%)	4 (100%)	1 (16,7%)	1 (14,4%)
$P=0,01$, XTO vs XTO/PZQ; $P=0,01$, XTO vs XTO/PZQ/CTM; $P=0,01$, XTO/CTM vs XTO/PZQ; $P=0,01$, XTO/CTM vs XTO/PZQ/CTM					
		XTO (n=8)	XTO+CTM (n=5)	XTO+PZQ (n=6)	XTO+PZQ/CTM (n=8)
60 Dias	Maioria Inviável	0	0	5 (83,3%)	8 (100%)
	Maioria Viável	8 (100%)	5 (100%)	1 (16,7%)	0
$P=0,002$, XTO vs XTO/PZQ; $P=0,0001$, XTO vs XTO/PZQ/CTM; $P=0,01$, XTO/CTM vs XTO/PZQ; $P=0,0007$, XTO/CTM vs XTO/PZQ/CTM					

4.10 Influência do tratamento com CTM-TA e/ou PZQ sobre a morfologia do baço de camundongos C57BL/6 infectados pelo *Schistosoma mansoni*

4.10.1 Influência do tratamento com CTM-TA e/ou PZQ sobre a estrutura do baço de camundongos C57BL/6 infectados pelo *Schistosoma mansoni*

O baço é um órgão que possui um componente linfóide, conhecido como polpa branca, e um componente vascular, conhecido como polpa vermelha, que ocupam proporções equivalentes do parênquima do órgão. No entanto, ao longo de infecções, a estrutura normal do baço pode ser alterada, devido a diminuição ou aumento de um ou ambos os componentes. Devido a isso, analisamos a influência do tratamento com PZQ e/ou CTMs sobre a estrutura histológica do baço de

camundongos infectados pelo *S. mansoni*, levando em consideração a proporção entre a polpa branca e polpa vermelha para categorizar os animais.

No tempo 15 dias, no grupo tratado com PZQ, 100% dos camundongos apresentaram estrutura moderadamente alterada. A associação de CTMs ao tratamento levou a 40% dos camundongos apresentarem estrutura muito alterada do baço. No grupo não tratado, 60% dos camundongos apresentaram estrutura extremamente alterada e 40% apresentaram estrutura moderadamente alterada ($P < 0,01$, teste exato de Fisher, tabela 12). Metade do grupo de camundongos tratados somente com CTMs apresentaram parcial ou moderadamente alterada. Com avanço do tempo de tratamento, a porcentagem de camundongos com a estrutura muito alterada do baço aumentou (75% e 66,7%) no tratamento com CTMs, enquanto que na ausência de tratamento todos os camundongos tiveram a estrutura moderadamente alterada. Não foi observada melhora significativa da estrutura do baço ao longo dos períodos de 30 e 60 dias, com o tratamento com PZQ somente ou associado as CTMs. ($P < 0,05$, teste exato de Fisher, tabela 12).

O grupo não infectado apresentou na maioria de seus animais estrutura do baço moderadamente alterada, antes e após os tratamentos recebidos.

Tabela 12: Estrutura do baço de camundongos C57BL/6 infectados pelo *S. mansoni* e tratados ou não com PZQ e/ou CTM-TA

Estrutura do Baço		Grupos de estudo			
		XTO (n=5)	XTO+CTM (n=4)	XTO+PZQ (n=7)	XTO+PZQ/CTM (n=5)
15 dias	Totalmente preservada ou normal	0	0	0	0
	Parcialmente alterada	0	2 (50%)	0	0
	Moderadamente alterada	2 (40%)	2 (50%)	7 (100%)	3 (60%)
	Muito alterada	3 (60%)	0	0	2 (40%)
<i>P</i> =0,04, XTO vs XTO/PZQ					
30 dias	Totalmente preservada ou normal	XTO (n=3) 0	XTO+CTM (n=4) 0	XTO+PZQ (n=6) 0	XTO+PZQ/CTM (n=7) 0
	Parcialmente alterada	0	0	0	0
	Moderadamente alterada	3 (100%)	1 (25%)	6 (100%)	5 (71,4%)
	Muito alterada	0	3 (75%)	0	2 (28,6%)
<i>P</i> =0,03, XTO/CTM vs XTO/PZQ					
60 dias	Totalmente preservada ou normal	XTO (n=8) 0	XTO+CTM (n=3) 0	XTO+PZQ (n=7) 0	XTO+PZQ/CTM (n=7) 0
	Parcialmente alterada	0	0	1 (14,3%)	2 (28,6%)
	Moderadamente alterada	8 (100%)	1 (33,3%)	5 (71,4%)	5 (71,4%)
	Muito alterada	0	2 (66,7%)	1 (14,3%)	0
<i>P</i> =0,05, XTO vs XTO/CTM					

4.10.2 Influência do tratamento com CTM-TA e/ou PZQ sobre a polpa vermelha do baço de camundongos C57BL/6 infectados pelo *Schistosoma mansoni*

A polpa vermelha do baço é um local que contém precursores das células sanguíneas, cuja atividade pode estar aumentada ou diminuída durante as infecções, causando, assim, mudança no padrão de coloração do baço. Assim, analisamos a influência do tratamento com CTMs e/ou PZQ sobre a polpa vermelha do baço de camundongos infectados pelo *S. mansoni*, levando em consideração os critérios apresentados na figura 24. Em todos os tempos, não foram observadas diferenças entre os grupos estudados, já que grande parte dos animais apresentaram polpa vermelha com congestão discreta a moderada. (Tabela 13). Todos os camundongos dos grupos não infectados e tratados com PZQ, CTM ou associados, apresentaram polpa vermelha moderadamente congestionada.

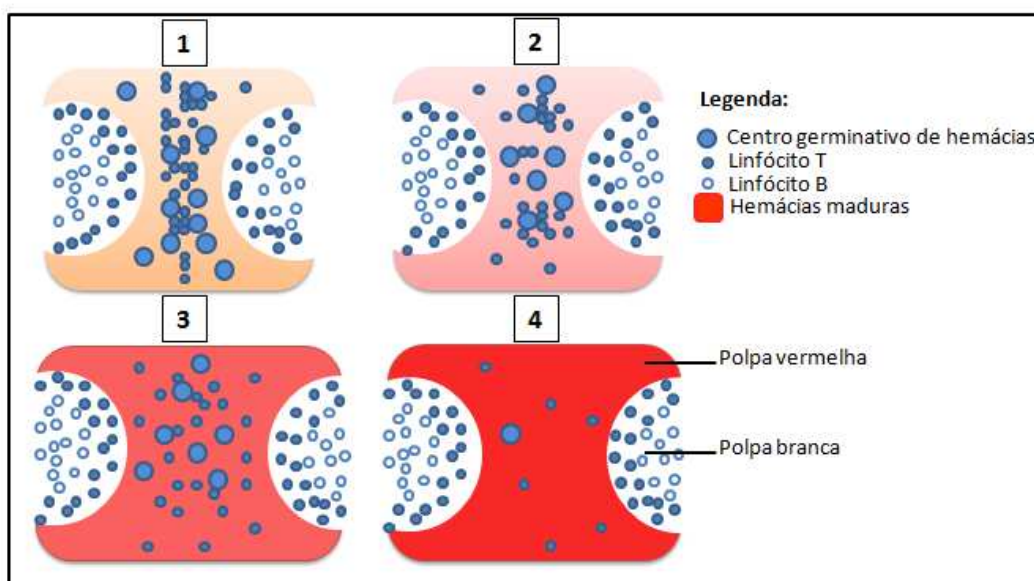


Figura 24. Esquema dos critérios utilizados para avaliação da polpa vermelha. Em 1: Polpa vermelha imatura, pobre em eritrócitos maduros, rica em centros germinativos de eritrócitos. Em 2: Polpa vermelha discretamente congestionada, apresenta baixa quantidade de eritrócitos maduros, é rica em centros germinativos de eritrócitos. Em 3: Polpa vermelha moderadamente congestionada, possui número considerável de eritrócitos maduros e alguns centros germinativos de eritrócitos. Em 4: Polpa vermelha acentuadamente congestionada, rica em eritrócitos maduros, possui poucos ou nenhum centro germinativo de eritrócitos.

Tabela 13: Polpa vermelha do baço de camundongos C57BL/6 infectados pelo *S. mansoni* e tratados ou não com PZQ e/ou CTM-TA

Polpa Vermelha		Grupos de estudo			
		XTO (n=5)	XTO+CTM (n=4)	XTO+PZQ (n=7)	XTO+PZQ/CTM (n=5)
15 dias	<i>Imaturo</i>	2 (40%)	0	0	0
	<i>Discretamente Congesta</i>	1 (20%)	2 (50%)	3 (42,9%)	1 (20%)
	<i>Moderadamente Congesta</i>	2 (40%)	2 (50%)	3 (42,9%)	4 (80%)
	<i>Acentuadamente Congesta</i>	0	0	1 (14,3%)	0
Não foram observadas diferenças entre os grupos					
30 dias		XTO (n=3)	XTO+CTM (n=4)	XTO+PZQ (n=6)	XTO+PZQ/CTM (n=7)
	<i>Imaturo</i>	0	0	0	0
	<i>Discretamente Congesta</i>	1 (33,3%)	4 (100%)	3 (50%)	4 (57,1%)
	<i>Moderadamente Congesta</i>	2 (66,7%)	0	3 (50%)	3 (42,9%)
	<i>Acentuadamente Congesta</i>	0	0	0	0
Não foram observadas diferenças entre os grupos					
60 dias		XTO (n=8)	XTO+CTM (n=3)	XTO+PZQ (n=7)	XTO+PZQ/CTM (n=7)
	<i>Imaturo</i>	0	0	0	0
	<i>Discretamente Congesta</i>	3 (37,5%)	1 (33,3%)	0	1 (14,3%)
	<i>Moderadamente Congesta</i>	5 (62,5%)	1 (33,3%)	7 (100%)	6 (85,7%)
	<i>Acentuadamente Congesta</i>	0	1 (33,3%)	0	0
Não foram observadas diferenças entre os grupos					

4.10.3 Influência do tratamento com CTM-TA e/ou PZQ sobre a polpa branca do baço de camundongos C57BL/6 infectados pelo *Schistosoma mansoni*

A polpa branca do baço é constituída predominantemente por linfócitos, cuja proliferação pode encontrar-se aumentada ou diminuída em resposta aos patógenos, causando, assim, mudança no padrão de coloração do baço. Assim, analisamos a influência do tratamento com CTMs e/ou PZQ sobre a polpa branca do

baço de camundongos infectados pelo *S. mansoni*, levando em consideração os critérios apresentados na figura 18.

No tempo 15 dias, os grupos infectados tratados com PZQ ou CTMs associadas com PZQ apresentaram maior proliferação de células na polpa branca (71,4% e 100%, respectivamente) do que os grupos não tratados ou tratados com CTMs ($P < 0,05$, teste exato de Fisher, tabela 14). Nos demais tempos, não houveram diferenças entre os grupos estudados, já que em todos os grupos, a grande maioria dos camundongos apresentaram hiperplasia moderada.

Os camundongos dos grupos não infectados apresentaram polpa branca discretamente hiperplásica, após os tratamentos com PZQ, CTMs ou associados.

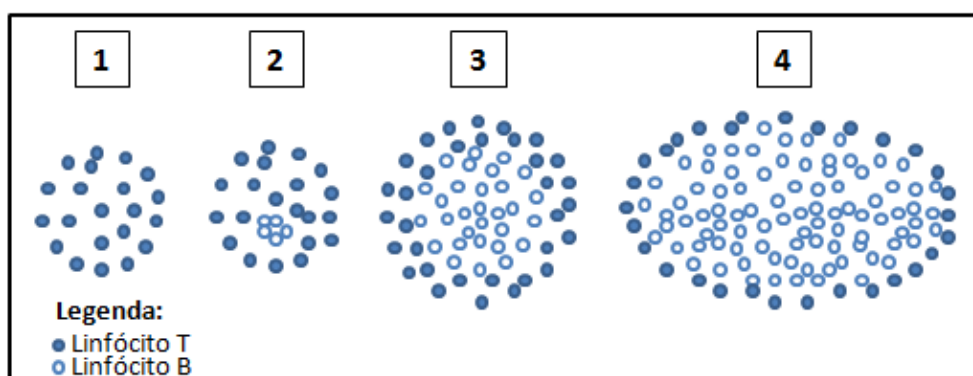


Figura 25. Esquema dos critérios utilizados para avaliação da polpa branca. Em 1: Polpa branca sem alterações, não apresenta centro germinativo de linfócitos B, apenas folículo linfático periarterial. 2: Polpa branca discretamente hiperplásica, com centro germinativo central e pequeno, envolvido pelo folículo linfático periarterial. 3: Polpa branca moderadamente hiperplásica, centro germinativo maior ou com a mesma proporção que o folículo linfático periarterial 4: Polpa branca acentuadamente hiperplásica, caracterizada pela formação de um centro germinativo de linfócitos B grande, com fino folículo linfático periarterial.

Tabela 14: Polpa branca do baço de camundongos C57BL/6 infectados pelo *S. mansoni* e tratados ou não com PZQ e/ou CTM-TA

	Polpa Branca	Grupos de estudo			
		XTO (n=5)	XTO+CTM (n=4)	XTO+PZQ (n=7)	XTO+PZQ/CTM (n=5)
15 dias	Sem alterações	1 (20%)	0	0	0
	Discretamente hiperplásica	3 (60%)	0	0	0
	Moderadamente hiperplásica	1 (20%)	4 (100%)	2 (28,6%)	0
	Acentuadamente hiperplásica	0	0	5 (71,4%)	5 (100%)
$P=0,04$, XTO vs XTO/CTM; $P=0,005$, XTO vs XTO/PZQ; $P=0,003$, XTO vs XTO/PZQ/CTM; $P=0,007$, XTO/CTM vs XTO/PZQ/CTM					
30 dias		XTO (n=3)	XTO+CTM (n=4)	XTO+PZQ (n=6)	XTO+PZQ/CTM (n=7)
	Sem alterações	0	0	0	0
	Discretamente hiperplásica	1 (33,3%)	0	0	0
	Moderadamente hiperplásica	2 (66,7%)	2 (50%)	6 (100%)	5 (71,4%)
	Acentuadamente hiperplásica	0	2 (50%)	0	2 (28,6%)
Não foram observadas diferenças entre os grupos					
60 dias		XTO (n=8)	XTO+CTM (n=3)	XTO+PZQ (n=7)	XTO+PZQ/CTM (n=7)
	Sem alterações	0	0	0	0
	Discretamente hiperplásica	1 (12,5%)	0	0	3 (42,9%)
	Moderadamente hiperplásica	5 (62,5%)	2 (66,7%)	6 (85,7%)	4 (57,1%)
	Acentuadamente hiperplásica	2 (25%)	1 (33,3%)	1 (14,3%)	0
Não foram observadas diferenças entre os grupos					

4.10.4 Influência do tratamento com CTM-TA e/ou PZQ sobre a quantidade de granuloma no baço de camundongos C57BL/6 infectados pelo *Schistosoma mansoni*

Pelo fato de que ovos de *S. mansoni* liberados na circulação mesentérica podem chegar ao baço e desencadear o desenvolvimento de granulomas, quantificamos o número de granulomas no baço dos camundongos infectados e tratados ou não com PZQ e/ou CTMs, analisando o maior número de granulomas por amostra.

No tempo 15 dias, os grupos infectados tratados com PZQ ou com CTMs associadas ao PZQ, não apresentaram animais contendo granulomas no baço, enquanto que nos grupos não tratado ou tratado com CTMs, 60% e 75% dos camundongos apresentaram quantidade moderada ($P < 0,05$, teste exato de Fisher, tabela 15). Nos demais tempos, não houveram diferenças entre os grupos estudados, já que em todos os grupos, com exceção do grupo não tratado, a grande maioria dos camundongos não apresentou granulomas no baço.

Os grupos de camundongos não infectados não apresentaram granulomas antes e após os tratamentos recebidos.

Tabela 15: Quantidade de granuloma no baço de camundongos C57BL/6 infectados pelo *S. mansoni* e tratados ou não com PZQ e/ou CTM-TA

		Grupos de estudo			
		XTO (n=5)	XTO+CTM (n=4)	XTO+PZQ (n=7)	XTO+PZQ/CTM (n=5)
15 dias	Ausente	2 (40%)	1 (25%)	7 (100%)	5 (100%)
	Discreto	3 (60%)	3 (75%)	0	0
	Moderado	0	0	0	0
	Acentuado	0	0	0	0
P=0,04, XTO vs XTO/PZQ; P=0,02, XTO/CTM vs XTO/PZQ; P=0,04, XTO/CTM vs XTO/PZQ/CTM					
		XTO (n=3)	XTO+CTM (n=4)	XTO+PZQ (n=6)	XTO+PZQ/CTM (n=7)
30 dias	Ausente	1 (33,3%)	3 (75%)	6 (100%)	7 (100%)
	Discreto	2 (66,7%)	0	0	0
	Moderado	0	1 (25%)	0	0
	Acentuado	0	0	0	0
Não foram observadas diferenças entre os grupos					
		XTO (n=8)	XTO+CTM (n=3)	XTO+PZQ (n=7)	XTO+PZQ/CTM (n=7)
60 dias	Ausente	8 (100%)	2 (66,7%)	7 (100%)	7 (100%)
	Discreto	0	1 (33,3%)	0	0
	Moderado	0	0	0	0
	Acentuado	0	0	0	0
Não foram observadas diferenças entre os grupos					

4.10.5 Influência do tratamento com CTM-TA e/ou PZQ sobre a constituição dos granulomas no baço de camundongos C57BL/6 infectados pelo *Schistosoma mansoni*

Ao avaliarmos a constituição dos granulomas no baço observamos que em todos os tempos analisados não foram observadas diferenças significativas na constituição dos granulomas entre os grupos de camundongos infectados (tabela 16).

Tabela 16: Constituição dos granulomas no baço de camundongos C57BL/6 infectados pelo *S. mansoni* e tratados ou não com PZQ e/ou CTM-TA (Continua)

	Constituição dos Granulomas	Grupos de estudo			
		XTO (n=5)	XTO+CTM (n=4)	XTO+PZQ (n=7)	XTO+PZQ/CTM (n=5)
15 dias	<i>Ausente</i>	2 (40%)	1 (25%)	7 (100%)	5 (100%)
	<i>Linfócito e Macrófago</i>	0	0	0	0
	<i>Linfócito, Macrófago e Eosinófilo</i>	3 (60%)	1 (25%)	0	0
	<i>Linfócito, Macrófago, Eosinófilo e Plasmócito</i>	0	0	0	0
	<i>Linfócito, Macrófago, Eosinófilo, Plasmócito e Células Gigantes</i>	0	2 (50%)	0	0
	<i>Linfócito, Macrófago, Eosinófilo, Plasmócito, Células Gigantes e Neutrófilo</i>	0	0	0	0
Não foram observadas diferenças entre os grupos					
30 dias		XTO (n=3)	XTO+CTM (n=4)	XTO+PZQ (n=6)	XTO+PZQ/CTM (n=7)
	<i>Ausente</i>	1 (33,3%)	3 (75%)	6 (100%)	7 (100%)
	<i>Linfócito e Macrófago</i>	0	0	0	0
	<i>Linfócito, Macrófago e Eosinófilo</i>	1 (33,3%)	0	0	0
	<i>Linfócito, Macrófago, Eosinófilo e Plasmócito</i>	0	0	0	0
	<i>Linfócito, Macrófago, Eosinófilo, Plasmócito e Células Gigantes</i>	0	1 (25%)	0	0
<i>Linfócito, Macrófago, Eosinófilo, Plasmócito, Células Gigantes e Neutrófilo</i>	1 (33,3%)	0	0	0	
Não foram observadas diferenças entre os grupos					
60 dias		XTO (n=8)	XTO+CTM (n=3)	XTO+PZQ (n=7)	XTO+PZQ/CTM (n=7)
	<i>Ausente</i>	8 (100%)	3 (100%)	7 (100%)	7 (100%)
	<i>Linfócito e Macrófago</i>	0	0	0	0
	<i>Linfócito, Macrófago e Eosinófilo</i>	0	0	0	0

□

Tabela 16: Constituição dos granulomas no baço de camundongos C57BL/6 infectados pelo *S. mansoni* e tratados ou não com PZQ e/ou CTM-TA (Continuação)

	XTO (n=8)	XTO+CTM (n=3)	XTO+PZQ (n=7)	XTO+PZQ/CTM (n=7)
60 dias	Linfócito, Macrófago, Eosinófilo e Plasmócito	0	0	0
	Linfócito, Macrófago, Eosinófilo, Plasmócito e Células Gigantes	0	0	0
	Linfócito, Macrófago, Eosinófilo, Plasmócito, Células Gigantes e Neutrófilo	0	0	0

Não foram observadas diferenças entre os grupos

(Conclusão).

4.10.6 Influência do tratamento com CTM-TA e/ou PZQ sobre a viabilidade dos ovos no baço de camundongos C57BL/6 infectados pelo *Schistosoma mansoni*

Ao avaliarmos a viabilidade dos ovos de *S. mansoni* presentes no baço notamos que os grupos de animais infectados não tratados ou tratados apenas com CTMs apresentaram 100% de seu ovos viáveis em quase todos os tempos. Já os grupos infectados tratados apenas com PZQ, ou associado as CTMs não apresentaram ovos de *S. mansoni* no baço (tabela 17).

Tabela 17: Viabilidade dos ovos no baço de camundongos C57BL/6 infectados pelo *S. mansoni* e tratados ou não com PZQ e/ou CTM-TA

Viabilidade dos Ovos		Grupos de estudo			
		XTO (n=2)	XTO+CTM (n=3)	XTO+PZQ (n=0)	XTO+PZQ/CTM (n=0)
15 dias	Maioria Inviável	0	0	0	0
	Maioria Viável	2 (100%)	3 (100%)	0	0
P=0,02, XTO/CTM vs XTO/PZQ; P=0,02, XTO/CTM vs XTO/PZQ/CTM					
		XTO (n=2)	XTO+CTM (n=1)	XTO+PZQ (n=0)	XTO+PZQ/CTM (n=0)
30 dias	Maioria Inviável	0	0	0	0
	Maioria Viável	2 (100%)	1 (100%)	0	0
P=0,05, XTO vs XTO/PZQ/CTM					
		XTO (n=0)	XTO+CTM (n=1)	XTO+PZQ (n=0)	XTO+PZQ/CTM (n=0)
60 dias	Maioria Inviável	0	1 (100%)	0	0
	Maioria Viável	0	0	0	0
Não foram observadas diferenças entre os grupos					

4.10.7 Influência do tratamento com CTM-TA e PZQ sobre camundongos C57BL/6 não infectados pelo *Schistosoma mansoni*

Em todos os parâmetros e tempos analisados não foram observadas diferenças entre os grupos não infectado e não infectado tratados com PZQ, CTMs ou em associação (Figura 26). As análises histológicas do fígado e baço de camundongos não infectados que receberam o tratamento associado de CTM-TA e PZQ descartam a presença de efeitos imunogênicos e tumorigênicos nestes órgãos.

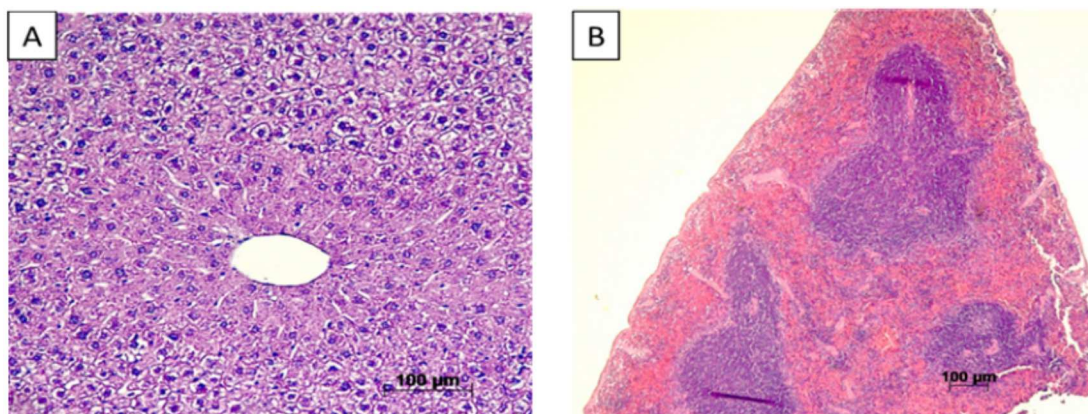


Figura 26. Imagens representativas de cortes histológicos de camundongos C57BL/6 não infectados. Os painéis A e B representam, respectivamente, o fígado e baço de camundongos não infectados tratados com CTM-TA, associado ao PZQ. Coloração com hematoxilina e eosina. Imagens obtidas por microscopia óptica e em aumento de 20X e 5X, respectivamente.

5 DISCUSSÃO

A cultura de células-tronco a partir do tecido adiposo foi realizada com sucesso, uma vez que se obteve uma população de células com características morfológicas semelhantes a fibroblastos, aderentes à superfície plástica e formação de colônias, como descrito na literatura (Caplan *et al.*, 1991; Pittenger *et al.*, 1999; Arrieta *et al.*, 2011). Além disso, as CTMs se mostraram resistentes ao processo de criopreservação e mantiveram um fenótipo estável quando cultivadas até a terceira passagem *in vitro*, como observado por Basciano. e colaboradores, (2011).

Para confirmação da população celular obtida, realizamos ensaios de caracterização fenotípica e funcional, seguindo a maioria dos critérios padronizados pela Sociedade Internacional de Terapia Celular (Dominici *et al.*, 2006). Com base nos resultados encontrados foi possível confirmar que as células deste estudo são CTMs. Após expansão celular verificamos a expressão de marcadores característicos de CTMs como o CD29, CD71 e CD44, bem como, marcadores característicos de células-tronco hematopoiéticas, como o CD34 e o CD45. As células estudadas apresentaram maior percentual (>80%) de expressão de marcadores de CTMs e apenas 2% de expressão de marcadores de células-tronco hematopoiéticas, indicando, assim, que a cultura em questão era mesmo de CTMs (Zuk *et al.*, 2002; Dominici *et al.*, 2006; Sung *et al.*, 2008).

Os resultados dos ensaios de caracterização funcional mostraram que as células em cultura foram capazes de se diferenciarem em linhagens celulares especializadas, osteogênica e adipogênica, confirmando sua multipotencialidade, característica de CTMs, como descrito na literatura (Pittenger *et al.*, 1999; Zuk *et al.*, 2002; Dominici *et al.*, 2006; Da Silva M *et al.*, 2009).

A diferenciação osteogênica foi obtida por meio dos indutores osteogênicos dexametasona, ácido ascórbico e β -glicerofosfato acrescidos ao meio de cultura. As CTMs foram cultivadas por sete, quatorze e vinte e um dias. Após cada período de estímulo observamos mudanças progressivas da morfologia fusiforme para cubóide, característica do processo de diferenciação osteogênica, além do depósito de estruturas mineralizadas evidenciadas pela coloração de Von Kossa. A produção de matriz mineralizada é considerada como um marcador de diferenciação das CTMs em linhagem osteoblástica, como descrito por Ogawa e colaboradores (2004).

As células em nosso estudo também foram submetidas à diferenciação adipogênica por meio dos indutores adipogênicos dexametasona, indometacina, insulina e isobutil-metilxantina acrescidos ao meio de cultura. As CTMs foram cultivadas por sete, quatorze e vinte e um dias. Após cada período de estímulo a diferenciação foi confirmada através da mudança progressiva da morfologia fusiforme das CTMs para uma forma arredondada, além da aquisição de lipídios intracelulares, os quais foram evidenciados pela coloração com Oil Red O. Esses achados são consistentes com outros estudos (Zuk *et al.*, 2002) e reforçam a multipotencialidade das CTMs utilizadas em nosso estudo.

Uma vez caracterizada a cultura de células extraídas do tecido adiposo e expandidas *in vitro*, seguiu-se para a avaliação dessas células no controle da inflamação na esquistossomose experimental.

Com relação ao número de hemácias, não foram observadas diferenças significativas nos diferentes grupos estudados. Isto talvez porque o período de infecção utilizado neste estudo foi de 135 dias e alguns trabalhos mostram que a anemia é frequentemente encontrada em uma fase mais avançada da infecção por *S. mansoni* (Borojevic *et al.*, 1983; Santos-Da-Silva *et al.*, 1988).

Ao analisarmos o perfil dos leucócitos sanguíneos, observamos que o tratamento com PZQ e/ou CTMs não alterou o número de leucócitos no sangue dos camundongos não infectados. Nos grupos infectados, também não observamos diferenças no perfil leucocitário após 15 dias dos tratamentos. Porém, no tempo de 30 dias, foi evidenciado um aumento de eosinófilos na infecção não tratada, sendo esse número restabelecido pelo tratamento apenas com PZQ isolado ou em associação com CTMs. A literatura mostra que a eosinofilia é comumente encontrada na esquistossomose (de Jesus, *et al.*, 2002; Atta, A. *et al.* 1981). Os eosinófilos têm a função primordial na neutralização das hepatotoxinas liberadas pelos ovos de *S. mansoni* (Olds & Mahmoud, 1980). Portanto, a diminuição do número de eosinófilos nos grupos tratados com PZQ ou em associação com CTMs pode estar relacionada com a maior proporção de ovos inviáveis observados nesses grupos (Tabela 11).

Ainda aos 30 dias, o tratamento isolado com CTMs ou em associação ao PZQ, levou a um aumento significativo do número de monócitos. Uma possível explicação para isto é de que às CTMs podem ter aumentado o recrutamento de

monócitos/macrófagos como foi demonstrado por Guangwen e colaboradores, (2012). O interessante é que após 60 dias do tratamento somente com CTMs, ou CTMs associado ao PZQ, o número de monócitos foi normalizou quando comparado aos animais do grupo não infectado. Isto pode ser um efeito das CTMs ou a ausência delas no sistema, nesse período avaliado. Da mesma forma, não observamos aumento no número das outras populações de leucócitos no tratamento com CTMs, no tempo de 60 dias. Ao contrário, houve um restabelecimento do número de neutrófilos e eosinófilos no tratamento com PZQ, CTMs ou em associação em comparação ao grupo não tratado. Isto mostra que as CTMs mais uma vez não influenciaram na ação do PZQ.

A diminuição do peso corporal e os altos níveis de ALT no soro dos animais portadores da infecção pelo *S. mansoni* ocorre após a oviposição do parasito, coincidindo com a observação de granulomas hepáticos. Isto sugere que o comprometimento do fígado nesta fase da infecção afetaria as funções relacionadas com o processamento e distribuição de nutrientes realizadas neste órgão, originando uma alteração no metabolismo dos camundongos infectados (Atta, A. *et al.*, 1981). Tendo em vista que a resposta aos ovos de *S. mansoni* é a principal causa da patogenia e sinais clínicos da doença, avaliar a carga parasitária antes de analisarmos os demais resultados é de extrema relevância. Os resultados mostram (Figura 18) que os camundongos infectados por *S. mansoni* neste estudo apresentaram uma tendência de maior número de vermes adultos quando não tratados com PZQ, o que desencadeia um processo de acumulação de lesões devido a oviposição continua. Os grupos tratados com PZQ na dosagem de 400mg/Kg demonstraram eficácia na eliminação dos vermes adultos como foi demonstrado por Oliveira, F. A., 2005, o que conseqüentemente cessa ou diminui o número de ovos colocados na circulação mesentérica. Além disso, nossas observações através das análises histopatológicas do fígado e baço mostraram que os camundongos tratados com PZQ apresentaram a maioria dos ovos de *S. mansoni* inviáveis ou ausentes nos tecidos do hospedeiro (Tabelas 11 e 17). Estudos mostram que isto é comum quando administrado em doses mais elevadas (Richards *et al.* 1989). Com a morte dos ovos, sua imunogenicidade é diminuída, o que contribui para diminuição da inflamação granulomatosa (DeFranco *et al.*, 2007; Hams E. *et al.* 2013). Não observamos redução do número de vermes adultos no

grupo de camundongos infectados com *S. mansoni* e tratados somente com CTMs. Isso era esperado uma vez que as CTMs não apresentam atividade vermífuga. Porém, o uso dessas células em tratamento associado com o PZQ não alterou a ação vermífuga do mesmo.

Em nossos resultados vimos uma redução do peso corporal dos camundongos infectados por *S. mansoni* nos tempos de 15 e 30 dias, na ausência de tratamento ou quando tratados somente com CTMs. Aos 15 dias, o grupo infectado e tratado com PZQ e o grupo infectado e tratado com CTMs associado ao PZQ demonstraram recuperação do peso em comparação aos camundongos infectados pelo *S. mansoni* (Figura 12) não tratados ou tratados somente com CTMs. Isto evidencia que, neste tempo avaliado, o ganho de peso dos camundongos infectados é devido a ação do PZQ e que a associação do mesmo às CTMs não prejudicou a sua ação. No tempo de 60 dias notamos que houve estabilidade do peso corporal entre os grupos estudados, não sendo observada influência de qualquer tratamento sobre o peso dos camundongos infectados pelo *S. mansoni*, submetidos ou não aos tratamentos. Não se pode relacionar essa estabilidade no peso com a melhora da saúde dos animais. Apesar de não termos medido o peso do baço e fígado destes animais, podemos supor através observações feitas por Atta e colaboradores, (1981) que o peso destes órgãos apresenta aumento ao decorrer do tempo de infecção devido a hepatoesplenomegalia. Sendo assim, o que pode ter ocorrido no tempo de 60 dias é o equilíbrio entre a desnutrição dos animais infectados e o aumento do peso destes órgãos, não sendo possível assim observar diferenças significativas entre os grupos.

A principal patologia da infecção esquistossomótica encontra-se no fígado. As transaminases são amplamente utilizadas para avaliar o comprometimento deste órgão, pois são indicadores sensíveis de dano hepático. A ALT é uma enzima que está presente em grande quantidade no citoplasma dos hepatócitos. Quando há danos nos hepatócitos ocorre o refluxo da enzima para o plasma com elevação dos níveis na corrente sanguínea. Através da dosagem de ALT é possível analisar a extensão do dano hepático (Nunes PP. & Moreira AL, 2007). Nossos resultados relacionados à dosagem de ALT demonstraram que houve aumento nos níveis séricos desta enzima no grupo infectado quando comparado aos animais não infectados, em todos os tempos analisados. Mostrou, também, que apenas os

animais do grupo que receberam o tratamento com CTMs associado ao PZQ no tempo de 15 dias apresentou baixo nível desta enzima no soro, sendo similar aos níveis encontrados no grupo de animais não infectados (Figura 17). Outros estudos também mostraram redução significativa dos níveis de ALT de animais infectados por *S. mansoni* após infusão de CTMs derivadas da medula óssea (Aziz *et al.*, 2012; El-Mahdi *et al.*, 2014). Nossos resultados somados ao da literatura reforçam a função de reparo das CTMs no fígado comprometido pela esquistossomose podemos supor que os benefícios do tratamento com PZQ associado às CTMs sejam imunomodulação, hepatoproteção reforçada, proliferação celular hepática podem ter contribuído para a redução das lesões no fígado destes animais. (Usunier, B. *et al.*, 2014; Cui, L *et al.*, 2014; Fiore, EJ *et al.*, 2014; Li, P *et al.*, 2013; Jung, J *et al.*, 2013; Yen, BL. *et al.*, 2013; Meier, RP *et al.*, 2013; Nasir, GA. *et al.*, 2013; Gomez-Aristizabal, A., *et al* 2012; Prockop, DJ *et al.*, 2012; Chagoya de Sanchez V. *et al.*, 2012; Cho, KA *et al.*, 2012; Zhang D, *et al.*, 2011; Di Nicola, M. *et al.*, 2002). Porém, o uso de somente PZQ no tratamento não diminuiu o nível de ALT presente no soro sanguíneo dos camundongos, reforçando que a estratégia da associação do PZQ com as CTMs poderia ser muito importante no tratamento da esquistossomose. O fato pelo qual não foi possível observar a mesma recuperação morfofisiológica nos tempos de 30 e 60 dias pode estar relacionado com o tempo de ação das CTMs. Berardis e colaboradores (2015) discorrem sobre a necessidade de mais estudos sobre a eficácia das CTMs em longo prazo, além da dose, via e frequência de injeção destas células.

A fase do granuloma está intimamente ligada aos tipos de células presentes em sua constituição. A proporção das populações celulares pode oscilar de acordo com o hospedeiro, com a localização do granuloma e com o tempo pós-infecção estudado (Moore *et al.*, 1977; Weinstock & Boros, 1983). Na reação granulomatosa esquistossomótica as primeiras células a chegarem ao foco inflamatório são os macrófagos, que frequentemente formam células epitelióides e gigantócitos. Logo após a chegada dessas células surgem os linfócitos, eosinófilos, plasmócitos e neutrófilos, sendo que os macrófagos e eosinófilos são as células mais abundantes do infiltrado inflamatório. Nossos resultados mostraram que no tempo de 15 dias houve uma proporção maior de granulomas na fase avançada e fibrótica nos grupos que receberam tratamento quimioterápico, quando comparados aos grupos que não

receberam o tratamento com PZQ, que apresentaram uma proporção maior de granulomas na fase exsudativa e precoce. Ao analisarmos os tipos de células que constituíam estes granulomas neste mesmo período de 15 dias, conseguimos encontrar uma relação dos tipos celulares com a fase do granuloma. Os grupos tratados com PZQ apresentaram granulomas constituídos principalmente por linfócito, macrófago, eosinófilo, plasmócito e células gigantes. Já os grupos que não receberam tratamento quimioterápico além de apresentarem todas as células descritas acima, também apresentaram neutrófilos em sua constituição. Hirata e Fukuma em 2003 demonstraram que na infecção por *S. japonicum* a formação dos granulomas, em respostas ao SEA, ocorre tanto por processos dependentes de células T quanto por neutrófilos. Os dados sugerem que a quimioterapia foi eficaz na redução da resposta inflamatória exacerbada aos ovos no tempo de 15 dias, levando a um processo de cicatrização das lesões com a presença de granulomas de fase avançada e fibrosa, o que contribui com a diminuição da morbidade da doença.

Ao observar o panorama dos resultados histológicos do fígado relacionados à intensidade da inflamação como estrutura do fígado, arquitetura do espaço portal, infiltrado inflamatório portal, constituição dos granulomas, fase dos granulomas, atividade inflamatória periportal e do parênquima, podemos inferir que o tratamento com PZQ, no tempo de 15 dias, levou a uma melhora de vários desses parâmetros. Essa melhora pode estar relacionada aos benefícios do tratamento com PZQ, como discutido anteriormente. Entretanto, foi possível observar em algumas análises que a recuperação do grupo tratado com CTMs associado ao PZQ foi superior ao do grupo tratado apenas com PZQ, como foi mostrado nos resultados de dosagem da enzima ALT, além dos resultados que demonstraram que os granulomas diminuíram em tamanho, tornando-se menos celular (Figura 21). De forma geral, observou-se que as CTMs quando avaliadas sem o tratamento com PZQ não apresentaram um efeito notável na modulação da resposta imune. Porém, em associação com o PZQ, essas células potencializaram seus efeitos benéficos ou não interferiram.

As análises histológicas do baço não apresentaram resultados significativos na melhora dos parâmetros avaliados nos tratamentos apenas com CTMs ou associadas ao tratamento com o PZQ. Isto pode ser explicado pela resposta inflamatória estar mais ativa no fígado do que no baço, na esquistossomose. Provavelmente, essas células podem ter sido recrutadas em sua maioria para o

fígado. Apesar de não termos avaliado fatores solúveis que poderiam contribuir para essa migração sítio específica das CTMs estudos mostram que estas células migram preferencialmente para os sítios inflamatórios atraídas por quimiocinas, além destas células possuírem alta regulação de receptores de quimiocinas (Hossein R. *et al.*, 2015; El-Mahdi M *et al.*, 2014; Wei X *et al.*, 2013; Abdel A *et al.*, 2012). E por este motivo, exerceram mais a sua função imunomoduladora no fígado do que no baço.

Apesar não ter sido avaliado o mecanismo de ação do tratamento associado entre PZQ e CTMs neste trabalho, algumas hipóteses podem ser levantadas para discussão. O aumento da citocina IL-10 no ambiente inflamatório pode estar relacionado com essas observações, pois esta citocina está vinculada com um curso mais ameno da infecção, uma vez que tem importante papel regulatório sobre os perfis Th1 e Th2 (Boros & Whitfield, 1998; Hoffmann *et al.*, 2000). Além disso, a IL-10 também tem sido vinculada com a diminuição do tamanho do granuloma hepático (Flores Villanueva *et al.*, 1996). Apesar de não termos dosado esta citocina, é possível que este aumento deva estar ocorrendo nesse modelo experimental. Estudos mostraram em análises *in vitro* em humanos na fase aguda da doença que em um mês após o tratamento com PZQ há um aumento na produção das citocinas IL-4 e IL-10 após estimulação de linfócitos do sangue de pacientes infectados com o antígeno SEA (Lemos D. S. *et al.*, 2013). Além disso, as CTMs são conhecidas por produzirem níveis elevados de IL-10 (Oh JY *et al.*, 2008; Zymek P *et al.*, 2007). Através de contato célula a célula e da produção de fatores solúveis, as CTMs são capazes de induzir um ambiente imunossupressor por meio da geração de células T reguladoras (Tregs). Esta habilidade das CTMs para induzir Tregs foi observado tanto *in vitro* (Ye Z. *et al.*, 2008; Di Ianni M. *et al.*, 2008) e *in vivo* em vários modelos experimentais (Joo SY *et al.*, 2010; Madec AM. *et al.*, 2009). Além disso, as CTMs podem induzir as células dendríticas plasmocitoides a produzirem IL-10 (Choi YS. *et al.*, 2012), o que também pode apoiar o desenvolvimento de Tregs *in vivo*. Estas observações sugerem que, em nosso modelo de estudo, as CTMs podem atuar como reguladores-chave no processo de modulação imune por supressão direta das células imunitárias ativadas e indiretamente através do recrutamento de Tregs, o que pode ter contribuído para uma recuperação dos animais tratados com PZQ associado às CTMs. Provavelmente esta imunomodulação não seja decorrente de um fenômeno isolado, mas sim de um somatório de mecanismos decorrentes do

tratamento com PZQ e CTMs. Esse tratamento contribuiu para a diminuição do tamanho do granuloma e evitou os efeitos deletérios do SEA, uma vez que não se teve um aumento das concentrações séricas da enzima hepática ALT.

Ao longo dos últimos anos, preocupações têm sido levantadas sobre a eficácia a longo prazo da terapia baseada em CTMs e o potencial risco tumorigênico. Várias linhas de evidências sugeriram que as CTMs podem promover o crescimento de tumor *in vivo* (Zhu W. *et al.*, 2006; Yu JM. *et al.*, 2008). Por outro lado, devido às suas propriedades imunomoduladoras, as CTMs podem ter um efeito anti-tumoral, em relação a modulação do ambiente inflamatório que caracteriza muitos tumores (Khakoo AY. *et al.*, 2006; Lu YR. *et al.*, 2008). As CTMs também podem interagir com células cancerosas e inibir vias associadas com o crescimento tumoral e a divisão celular (Gao P. *et al.*, 2010; Abdel MT. *et al.*, 2011). Nossas análises histológicas do fígado e baço de camundongos não infectados por *S. mansoni* mostraram que o tratamento associado de CTMs e PZQ não demonstrou potencial tumorigênico nestes órgãos (figura 26), mostrando-se com isso ser uma fonte relativamente segura de células para serem utilizadas em terapia celular.

Tomados em conjunto, os resultados encontrados neste estudo são consistentes com outras pesquisas e reforçam a ação das CTMs no controle da inflamação. Essa função das CTMs é importante para estabelecer um equilíbrio entre os processos de reparo e frear a destruição tecidual causada por atividades inflamatórias. Dessa forma, as CTMs poderiam contribuir para prevenir falência de órgãos e preservar a homeostase do tecido.

6 CONCLUSÃO

Com base nos resultados do presente estudo, foi possível concluir que:

O uso das CTMs foi benéfico ao tratamento quando associado ao PZQ no tempo de 15 dias uma vez que observamos diversas melhorias na estrutura histológica do fígado.

As CTMs contribuíram para a diminuição do tamanho dos granulomas e reduziu os efeitos deletérios da infecção por *S. mansoni*, uma vez que não se teve um aumento das concentrações séricas da enzima hepática ALT.

Portanto, os nossos dados sugerem, no modelo da esquistossomose, o uso das CTM-TA na terapêutica celular para o controle da resposta inflamatória, principalmente quando associadas ao praziquantel.

7 PERSPECTIVAS

Avaliar a biodistribuição das CTMs após injeção intravenosa;

Avaliar parâmetros da resposta imune celular e humoral por meio de marcadores de ativação celular, dosagem de citocinas e anticorpos;

Avaliar mais detalhadamente a fibrose hepática por colorações específicas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abath FG, Morais CN, Montenegro CE. *et al.* Immunopathogenic mechanisms in schistosomiasis: what can be learnt from human studies? **Trends Parasitology**. v. 22, n. 2, p. 85-91, 2006.

Abdel aziz MT, El Asmar MF, Atta HM, Mahfouz S, Fouad HH, Roshdy NK, Rashed LA, Sabry D, Hassouna AA, Taha FM. Efficacy of mesenchymal stem cells in suppression of hepatocarcinogenesis in rats: possible role of Wnt signaling. **J Exp Clin. Cancer Res**. v. 30 p. 49, 2011.

Aquino, JB, Bolontrade, MF, Garcia, MG, *et al.* Mesenchymal stem cells as therapeutic tools and carriers of the gene in liver fibrosis and hepatocellular carcinoma. **Gene therapy**. v. 17, p. 692-708, 2010.

Arthur MJP. **Fibrogenesis II**. Metalloproteinases and their inhibitors in liver fibrosis. **Am J. Physiol Gastrointest Liver Physiol**. 279, 2000.

Arrieta CN, Ritz J, Silberstein. The elusive nature and function of mesenchymal stem cells. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**. v. 12. p. 126-131, 2011.

Atta, AM. *et al.* Esquistossomose mansônica. Evolução do quadro patológico: análise parasitológica, hematológica e histopatológica. **Rev. Saúde públ.**, S. Paulo, v. 15, p. 72-92, 1981.

Aziz MT, Atta HM , Roshdy NK , *et al.* Amelioration of Murine *Schistosoma mansoni* Induced Liver Fibrosis by Mesenchymal Stem Cells. **J. Stem Cells Regen med**. v. 8 (1), p. 28-34, 2012.

Banas RA, Trumpower C, Bentejewski C, Marshall V, Sing G, Zeevi A. Immunogenicity and immunomodulatory effects of amnion-derived multipotent progenitor cells. **Hum Immunol**. v. 69(6), p. 321–328, 2008.

Basciano L, Nemos C, Foliguet B, de Isla N, de Carvalho M, Tran N, Dalloul A. Long term culture of mesenchymal stem cells in hypoxia promotes a genetic program maintaining their undifferentiated and multipotent status. **BMC Cell Biol**. v. 12, 2011.

Bianco P; Robey PG; Simmons PJ. Mesenchymal stem cells: revisiting history, concepts, and assays. **Cell Stem Cell**, v. 2, p. 313-319, 2008.

Borojevic, R, Santos-Da-Silva, C e Carvalho, EA. Chronic schistosomiasis mansoni: splenic myelopoiesis and inhibition of neutrophil granulocytogenesis mediated by the sera of patients. **J Infect Dis**, v. 148, n.3, p. 422-426, 1983.

Berardis S, Dwisthi SP, Najimi M, and Sokal EM. Use of mesenchymal stem cells to treat liver fibrosis: Current situation and future prospects. **World J Gastroenterol**. v. Jan, 21(3), p. 742–758, 2015.

Boros, DL & Whitfield, JR. Endogenous IL-10 regulates IFN-gamma and IL-5 cytokine production and the granulomatous response in *Schistosomiasis mansoni*-infected mice. **Immunology**. v. 94, n.4, p. 481-487, 1998.

Boros, DL Immunopathology of *Schistosoma mansoni* infection. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 2, p. 250-269, 1989.

Burke ML, Jones MK, Gobert GN, Li YS, Ellis MK, McManus DP. Immunopathogenesis of human schistosomiasis. **Parasite Immunol**. v. Apr; 31(4), p. 163-76, 2009.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. **Vigilância da esquistossomose mansoni diretrizes técnicas**. 4. ed. Brasília: MS; 2014.

Caldas IR; Campi-Azevedo AC; Oliveira LFA. *et al.* Human Schistosomiasis mansoni: Immune responses during acute and chronic phases of the infection. **Acta Tropica**, v. 108, p. 109-117, 2008.

Caplan, AI. Mesenchymal stem cells. **Journal of Orthopaedic**, v. 9, ed. 5, p. 641-650, 1991.

Caplan AL. Why are MSCs therapeutic? New data: new insight. **Journal of Pathology**, v. 217, n. 2, p. 318-324, 2009.

Carvalho, OS; Coelho PMZ; Lenzi HL. (Org.). *Schistosoma mansoni*: uma visão multidisciplinar. Rio de Janeiro: Fiocruz; p.1123, 2008.

Chagoya de Sanchez, V, Martinez-Perez, L, Hernandez-Munoz, R, & Velasco-Loyden, G. Recovery of the Cell cycle inhibition of recovery in CCl4 induced cirrhosis by adenosine IFC-305 derivative. **International Journal of Hepatology**. v. 2012; Article ID 212530 (2012).

Chang CJ, Yen ML, Chen YC, *et al.* Placenta-derived multipotent cells exhibit immunosuppressive properties that are enhanced in the presence of interferon-gamma. **Stem Cells**. v. 24(11), p. 2466–2477, 2006.

Chen FH, Tuan RS. Mesenchymal stem cells in arthritic diseases. **Arthritis Res Ther**. v. 10, p. 223, 2008.

Choi YS, Jeong JA, Lim DS. Mesenchymal stem cell-mediated immature dendritic cells induce regulatory T cell-based immunosuppressive effect. **Immunol Invest**. v.41, p.214-229, 2012.

Cho, KA, Woo, SY, Seoh, JY, Han, HS, e Ryu, KH. Mesenchymal stem cells restore CCl4-induced liver injury by an antioxidant process. **Cell Biology International**, v. 36, p. 1267-1274, 2012.

Coutinho & Domingues. Specific treatment of advanced schistosomiasis liver disease in man: favourable results. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** 82 (Suppl. iv): 335-340, 1987.

Cooke A, Zaccane P, Raine T, Phillips JM, Dunne DW. Infection and autoimmunity: are we winning the war, only to lose the peace? **Trends Parasitol.** v. 20, p.316-21, 2004.

Corcione A, Benvenuto F, Ferretti E, *et al.* Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions. **Blood.** v.107, p.367-372, 2006.

Cui, L, Shi, Y, Han, Y, e Fan, D. Immune-based therapy with stem cells in liver disease. **Expert Review of Clinical Immunology**, v. 10, p.1185-1196, 2014.

Da Silva Meirelles L. S.; Fontes A. M.; Covas D. T. *et al.* Mechanisms involved in the therapeutic properties of mesenchymal stem cells. **Cytokine Growth Factor Reviews.** v.20, p. 419-427, 2009.

Dayan AD. Albendazole, mebendazole and praziquantel. Review of non-clinical toxicity and pharmacokinetics. **Acta Trop.** v. 86, p. 141-159, 2003.

DeFranco A, Locksley R, and Robert-son M. Immunity: The Immune Response in Infectious and Inflammatory Disease. Northants, UK: **New Sciences Press Ltd.** 277, 2007.

De Jesus AR, Silva A, Santana LB, Magalhães A, de Jesus AA, de Almeida RP, *et al.* Clinical and immunologic evaluation of 31 patients with acute schistosomiasis mansoni. **J Infect Dis.** v. Jan 1;185(1), p. 98-105, 2002.

Dietzer & Prata, A. Rate of reversion of hepatosplenic schistosomiasis after specific therapy. **Rev. Soc. Bras. Med Trop.** v. 19, p. 69-73, 1986.

Di Ianni M, Del Papa B, De Ioanni M, *et al.* Mesenchymal cells recruit and regulate T regulatory cells. **Exp Hematol.** v. 36, p. 309-318, 2008.

Di Nicola M, Carlo-Stella C, Magni M, *et al.* Stromal cells from human bone marrow suppress T lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. **blood**, v.99, p.3838-3843, 2002.

Doenhoff MJ, Kusel JR, Coles GC, Cioli D. Resistance of *Schistosoma mansoni* to praziquantel: is there are problem? **Trans R Soc Trop Med Hyg.** v. 96, p. 465-469, 2002.

Dominici MD, K Le Blanc, Mueller, Slaper-Cortenbach, Fc Marini, Ds Krause, Rj Deans, A Keating, Dj Prockop & Em Horwitz. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy.** Volume 8, Issue 4, p. 315-317, 2006.

El-Mahdi MM, Mansour WA, Hammam O. *et al.* Ameliorative effect of bone marrow-derived stem cells on injured liver of mice infected with *Schistosoma mansoni*. *Korean J. Parasitol*, v. 52, p. 151-162, 2014.

Engels D, Chitsulo L, Montresor A, Savioli L. The global epidemiological situation of schistosomiasis and new approaches to control and research. *Acta Trop.* v. 82; p.139-146, 2002.

Erokhin VV, Vasil'eva IA, Konopliannikov AG, *et al.* Systemic transplantation of autologous mesenchymal stem cells of the bone marrow in the treatment of patients with multidrugresistant pulmonary tuberculosis. *Probl Tuberk Bolezn Legk.* 3-6, 2008.

Fiore, EJ, Bayo, J, Garcia, MG, *et al.* Mesenchymal stromal cells modified to produce IGF-I by recombinant adenovirus improving hepatic fibrosis in rats. *Stem Cells and Development.* v. 3;24(6), p. 791-801, 2014.

Fiore EJ, Mazzolini G, Aquino J B. Mesenchymal Stem/Stromal Cells in Liver Fibrosis: Recent Findings, Old/New Caveats and Future Perspectives. *Stem Cell Reviews and Reports.* August, v. 11, Issue 4, p. 586-597, 2015.

Fischbach, GD; Fischbach, RL. Stem cells: science, policy and ethics. *The Journal of Clinical Investigation*, v. 114, p. 1364-1370, 2004.

Garcia-Olmo D, Garcia-Arranz M, Herreros D, *et al.* A phase I clinical trial of the treatment of Crohn's fistula by adipose mesenchymal stem cell transplantation. *Dis Colon Rectum.* v. 48, p. 1416-1423, 2005.

Gomez-Aristizabal, A, Ng & Davies, JE. Effects of two populations of mesenchymal cells into hepatocytes and lymphocytes. *Liver Transplantation.* v. 18, p. 1384-1394, 2012.

Gryseels, B. Schistosomiasis. *Infectious Disease Clinics of North America*, v. 26, p. 383-397, 2012.

Guangwen Ren, Xin Zhao, Ying Wang, *et al.* CCR2-Dependent Recruitment of Macrophages by Tumor-Educated Mesenchymal Stromal Cells Promotes Tumor Development and Is Mimicked by TNF α . *Cell Stem Cell.* v. 11, p. 812–824, 2012.

Emily Hams, Gabriella Aviello e Padraic G. Fallon. The *Schistosoma* granuloma: friend or foe? *Frontiers in immunology*, April, v. 4, Article 89, 2013.

Flores Villanueva, PO, Zheng, XX, Strom, TB, E Stadecker, MJ. Recombinant IL-10 and IL-10/Fc treatment down-regulate egg antigen-specific delayed hypersensitivity reactions and egg granuloma formation in schistosomiasis. *J Immunol*, v.156, n.9, p.3315-3320, 1996.

Gao P, Ding Q, Wu Z, Jiang H, Fang Z. Therapeutic potential of human mesenchymal stem cells producing IL-12 in a mouse xenograft model of renal cell carcinoma. **Cancer Lett.** v. 290, p. 157–166, 2010.

Hayashi Y, Tsuji S, Tsujii M, *et al.* Topical implantation of mesenchymal stem cells has beneficial effects on healing of experimental colitis in rats. **J Pharmacol Exp Ther.** v. 326, p. 523-531, 2008.

Hirata, ME Fukuma, T. Cytokine regulation in experimentally-induced *Schistosoma japonicum* egg granuloma formation. **Parasitol Int**, v.52, n.4, p.341- 349, 2003.

Hoffmann, K.F, Cheever, A.W. E 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, n.12, p.6406-6416, 2000.

Horwitz EM, Prockop DJ, Fitzpatrick LA, *et al.* Transplant ability and therapeutic effects of bone marrow-derived mesenchymal cells in children with osteogenesis imperfecta. **Nat Med.** v. 5, p. 309-313, 1999.

Hossein R, Seyed MH, Masoud S, Jamal M, and Nader T. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells exert *in vitro* immunomodulatory and beta cell protective functions in streptozotocin induced diabetic mice model. **Journal of Diabetes Research.** Volume 2015 Article ID 878535.

Janeway CA Jr. How the immune system protects the host from infection. **Microbes Infect.** v. 3, p. 1167-71, 2001.

Joo SY, Cho KA, Jung YJ, *et al.* Mesenchymal stromal cells inhibit graft-versus-host disease of mice in a dose-dependent manner. **Cytotherapy.** v.12, p.361-370, 2010.

Jung, J., Choi, JH, Lee, Y., *et al.* Human mesenchymal stem cells derived from the placenta promote liver regeneration CCl4 in rat liver model -injured by increasing autophagic mechanism. **Stem Cells.** v.31, p.1584-1596, 2013.

Karaaltin MV, Akpınar AC, Baghaki S, Akpınar F. Treatment of "En Coup de Sabre" deformity with adipose-derived regenerative cell-enriched fat graft. **J Craniofac Surg.** v. 23, E103–E105, 2012.

Karp J. M.; Leng T. G. S. Mesenchymal stem cell homing: the devil is in the details. **Cell Stem Cell**, v. 4, p. 206-216, 2009.

Katz N. & Almeida K. Esquistossomose, xistosa, barriga d'água. **Ciência e Cultura.** Campinas, SP. v. 55, n.1, p. 38-43, 2003.

Khakoo AY, Pati S, Anderson SA, Reid W, Elshal MF, Rovira II, Nguyen AT, Malide D, Combs CA, Hall G, *et al.* Human mesenchymal stem cells exert potent

antitumorigenic effects in a model of Kaposi's sarcoma. **J Exp Med.** v. 203, p.1235–1247, 2006.

Le Blanc K, Rasmusson I, Sundberg B, *et al.* Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells. **Lancet.** v. 363, p. 1439-1441, 2004.

Lee JW, Fang X, Gupta N, *et al.* Allogeneic human mesenchymal stem cells for treatment of *E. coli* endotoxin-induced acute lung injury in the *ex vivo* perfused human lung. **Proc Natl Acad Sci USA.** v.106, p.16357-16362, 2009.

Lemos DS, Costa-Silva MF, Silveira ACO, Batista MA, Oliveira-Fraga LA, Silveira AMS, Alvarez MCB, Martins-Filho OA, Gazzinelli G, Corrêa-Oliveira R, e Teixeira-Carvalho A. Cytokine Pattern of T Lymphocytes in Acute Schistosomiasis mansoni Patients following Treated Praziquantel Therapy. **Jornal of Parasitology Research.** v. 2013, 909134, 2013.

Lenzi HL, Kimmel E, Schechtman H, Pelajo-Machado M, Romanha WS, Pacheco RG, *et al.* Histoarchitecture of schistosomal granuloma development and involution: morphogenetic and biomechanical approaches. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** 93 Suppl 1:141-51, 1998.

Li, P, Zhou, X, Shi, Y, *et al.* *In vivo* screening and comparison of the therapeutic effects of music and HSCs for liver damage. **PLoS One**, 8, 2013.

Lu YR, Yuan Y, Wang XJ, Wei LL, Chen YN, Cong C, Li SF, Long D, Tan WD, Mao YQ, *et al.* The growth inhibitory effect of mesenchymal stem cells on tumor cells *in vitro* and *in vivo*. **Cancer Biol Ther.** v. 7, p. 245–251, 2008.

Nasir, GA, Moshin, S., Khan, M., *et al.* Mesenchymal Stem Cells and Interleukin-6 attenuate liver fibrosis in rats. **Journal of Translational Medicine**, v.11, p.78, 2013.

Nunes PP & Moreira AL. Fisiologia hepática. Faculdade de Medicina da Universidade do Porto, Porto, 2007.

Marchenkoe S, Flanagan L. Counting Human Neural Stem Cells. **Journal of Visualized Experiments.** v. 7, 2007.

Madec AM, Mallone R, Afonso G, *et al.* Mesenchymal stem cells protect NOD mice from diabetes by inducing regulatory T cells. **Diabetologia.** v.52, p.1391-1399, 2009.

McCrudden R, Iredale JP. Hepatic fibrosis, hepatic estreladas cells and tissue inhibitors of metalloproteinases. **Histol Histopathol.** v.15 p.1159-1168, 2000.

Meier, RP, Muller, YD, Morel, P, Gonelle-Gispert, C, & Buhler, LH. The mesenchymal stem cell transplantation for the treatment of liver diseases, there is enough evidence? **Stem Cell Research**, v.11, p.1348-1364, 2013.

Moore, DL, Grove, DI E Warren, KS. The *Schistosoma mansoni* egg granuloma: quantitation of cell populations. **J Pathol**, v.121, n.1, p.41-50, 1977.

Mosmann TR & Moore KW "The role of IL-10 in crossregulation of TH1 and TH2 responses," **Immunology Today**. vol. 12, n. 3, p. A49–A53, 1991.

Ogawa R, Mizuno H, Atsushi W, Migita M, Shimada T, Hyakusoku H. Osteogenic and chondrogenic differentiation by adipose-derived stem cells harvested from GFP transgenic mice. **Biochemical and Biophysical Research Communications** v.313. p. 877, 2004.

Oh JY, Kim MK, Shin MS, Lee HJ, Ko JH, Wee WR, Lee JH. The anti-inflammatory and anti-angiogenic role of mesenchymal stem cells in wound healing of the cornea following chemical injury. **Stem Cells**. v.26, p.1047-1055, 2008.

Olds, G.R. & Mahmoud, A.A. Role of host granulomatous response in murine schistosomiasis mansoni eosinophil-mediated destruction of eggs. **J Clin Invest**, v.66, n.6, p.1191-1199, 1980.

Oliveira, FA. Avaliação do efeito do praziquantel, da oxamniquina e da associação destas drogas sobre o verme adulto de *Schistosoma mansoni*. Belo Horizonte: Fundação Oswaldo Cruz / Centro de Pesquisas René Rachou, 2005.

Parekkadan B, Van Poll D, Suganuma K, *et al.* Mesenchymal stem cell derived molecules reverse fulminant hepatic failure. **PLoS One**. v. 2:e941, 2007.

Parolini O, Alviano F, Bagnara GP, *et al.* Concise review: isolation and characterization of cells from human term placenta: outcome of the first international Workshop on Placenta Derived Stem Cells. **Stem Cells**. v. 26(2), p. 300–311, 2008.

Pearce EJ & MacDonald AS. The immunobiology of schistosomiasis. **Nat Rev Immunol**. Jul;2(7); p. 499-511, 2002.

Pellegrino JE. & Katz N. Experimental chemotherapy of *Schistosoma mansoni*. **Advances in Parasitology**. v. 6, 1968; p. 233–291, 1968.

Pellegrino J E, Siqueira A. F. Técnica de perfusão para colheita de *Schistosoma mansoni* em cobaias experimentalmente infestadas. **Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais**. v. 8, p. 589–597, 1956.

Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, *et al.* Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. **Science**. v.284, p.143-147, 1999.

Prata A & Bina JC. Development of the hepatosplenic form of schistosomiasis (A study of 20 patients observed during a 5 years period). **Gaz. Med. Bahia**. v. 68, p. 49–60, 1968.

Prockop, DJ, & Oh, JY. The mesenchymal stem cells / stroma (MSCs): role of inflammation guardians. **Molecular Therapy**. v. 20, p. 14-20, 2012.

Rey, L. Parasitologia: parasitos e doenças parasitárias do homem nos trópicos ocidentais. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan p.883, 2008.

Richards F, Sullivan J, Ruiz-Tiben E, Eberhard M, Bishop H. Effect of praziquantel on the eggs of *Schistosoma mansoni*, with a note on the implications for managing central nervous system schistosomiasis. **Ann Trop Med Parasitol.** v.83(5), p.465-72, 1989.

Santos-Da-Silva, C., Carvalho, E.A., Goncalvez, M.S. E Borojevic, R. Experimental murine schistosomiasis mansoni: inhibition of neutrophil granulocyte inflammatory reaction. **Braz J Med Biol Res.** v.21, n.2, p.273-279, 1988.

Schubert T, Xhema D, Vériter S, Schubert M. *et al.* The enhanced performance of bone allografts using osteogenic-differentiated adipose-derived mesenchymal stem cells. **Biomaterials.** v.32, p. 8880–8891, 2011.

Shi Y, Hu G, Su J, Li W, Chen Q, Shou P, Xu C, Chen X, Huang Y, Zhu Z, Huang X, Xie N, Ren G. Mesenchymal stem cells: a new strategy for immunosuppression and tissue repair. **Cell Research.** v. 20, p. 510-518, 2010.

Sung, JH.; Yang HM; Parque JB. *et al.* Isolation and characterization of mouse mesenchymal stem cells. **Transplantation Proceedings.** v.40, p.2649-2654, 2008.

Tzaribachev N, Vaegler M, Schaefer J, *et al.* Mesenchymal stromal cells: a novel treatment option for steroid-induced avascular osteonecrosis. **Isr Med Assoc J.** v.10, p.232-234, 2008.

Uccelli A, Moretta L, Pistoia V. Mesenchymal stem cells in health and disease. **Nature Reviews Immunology.** v.8, p.726-736, 2008.

Usunier, B., Benderitter, M., Tamarat, R., & Chapel, A. Fibrosis management: The mesenchymal stromal cells advance. **Stem Cells International,** v. 2014, 340257, 2014.

Wagers AJ & Weissman IL. Plasticity of adult stem cells. **Cell.** Mar 5;116(5), p. 639-48, 2004.

Yu J & Thomson JA. Pluripotent stem cell lines. **Genes Dev.** v. Aug 1;22(15), p. 1987-97, 2008.

Wang Y, Liu DH, Liu KY, Xu LP, Zhang XH, Han W, Chen H, Chen YH, Wang FR, Wang JZ, Sun YQ, Huang XJ. Long-term follow-up of haploidentical hematopoietic stem cell transplantation without *in vitro* T cell depletion for the treatment of leukemia: nine years of experience at a single center. **Cancer.** v. Mar 1;119(5), p. 978-85, 2013.

Weinstock, J.V. E Boros, D.L. Organ-dependent differences in composition and function observed in hepatic and intestinal granulomas isolated from mice with Schistosomiasis mansoni. **J Immunol.** v.130, n.1, p.418-422, 1983.

Wei. X, Yang X., Han Z. *et al.* Mesenchymal stem cells: a new trend for cell therapy. **Acta Pharmacologica Sinica**. v.34, p.747-754, 2013.

Who. **Schistosomiasis**. Fact sheet: 115, 2015. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs115/en/>>. Acesso em: 10 out. 2015.

Xin W.; Yang X.; Han z. *et al.* Mesenchymal stem cells: a new trend for cell therapy. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 34, p. 747-754, 2013.

Yen, BL, Yen, ML, Hsu, PJ, *et al.* Human multipotent mesenchymal stromal cells mediate the expansion of myeloid derived suppressor cells via hepatocyte growth factor / c-Met and STAT3. **Stem Cell Reports**. v.1, p.139-151, 2013.

Ye Z, Wang Y, Xie HY, Zheng SS. Immunosuppressive effects of rat mesenchymal stem cells: involvement of CD4+CD25+ regulatory T cells. **Hepatobiliary Pancreat Dis Int**. v.7, p.608-614, 2008.

Yu JM, Jun ES, Bae YC, Jung JS. Mesenchymal stem cells derived from human adipose tissues favor tumor cell growth *in vivo*. **Stem Cells Dev**. v. 17, p. 463–473, 2008.

Zhang, D, Jiang, M, & Miao, D. Stem cells transplanted human amniotic membrane-derived mesenchymal improve liver cirrhosis induced by carbon tetrachloride in rats. **PLoS One**. 6,e16789, 2011.

Zuk Pa, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz A, *et al.* Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. **Tissue Eng**. v. 7(2), p. 211-28, 2001.

Zuk, P. A.; Zhu, M.; Ashjian, P. *et al.* Human adipose tissue is a source of multipotent stem cell. **Molecular Biology of the Cell**. v.13, p.4279-4295, 2002.

Zhu W, Xu W, Jiang R, Qian H, Chen M, Hu J, Cao W, Han C, Chen Y. Mesenchymal stem cells derived from bone marrow favor tumor cell growth *in vivo*. **Exp Mol Pathol**. v. 80, p. 267–274, 2006.

Zymek P, Nah DY, Bujak M, Ren G, Koerting A, Leucker T, Huebener P, Taffet G, Entman M, Frangogiannis NG. Interleukin-10 is not a critical regulator of healing of myocardial infarction and left ventricular remodeling. **Cardiovasc Res**.v. 74, p.313 - 322, 2007.

ANEXOS

Anexo I - Licença da CEUA

	Ministério da Saúde FIOCRUZ Fundação Oswaldo Cruz Vice-presidência de Pesquisa e Laboratórios de Referência		Comissão de Ética no Uso de Animais
LICENÇA		LW-56/14	
<p>Certificamos que o protocolo (P-20/14-2), intitulado "Estudo de terapia celular associada ao praziquantel para o tratamento da esquistossomose mansoni", sob a responsabilidade de RODRIGO CORREA DE OLIVEIRA, atende ao disposto na Lei 11794/08, que dispõe sobre o uso científico no uso de animais, inclusive aos princípios da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL). A referida licença não exige a observância das Leis e demais exigências legais na vasta legislação nacional.</p>			
<p>Esta licença tem validade até 20/10/2016 e inclui o uso total de :</p>			
<p>Mus musculus - 400 Machos de C57BL/6, Idade: 6 Semana(s), Peso: 25,0000 Grama(s).</p>			
<p>Rio de Janeiro, 20 de outubro de</p>			
<p>Octavio Augusto França Presgrave Coordenador da CEUA</p>			
<p>Comissão de Ética no Uso de Animais Vice-presidência de Pesquisa e Laboratórios de Referência - Fundação Oswaldo Cruz Av. Brasil, 4036 - Prédio de Expansão - sala 200 - Manguinhos - Rio de Janeiro / RJ Telefone: (21) 3862.9121 e-mail: ceua@fiocruz.br</p>			

