



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FUNDAÇÃO OSVALDO CRUZ**



UFBA

Curso de Pós-Graduação em Patologia

FIOCRUZ

Dissertação de Mestrado

**MODULAÇÃO DO GRANULOMA PERIOVULAR
ESQUISTOSSOMÓTICO: MORFOMETRIA E
COMPORTAMENTO DA MATRIZ EXTRACELULAR**

LUCIANA MENEZES DA SILVA

**Salvador - Bahia - Brasil
1998**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ**

Curso de Pós-Graduação em Patologia

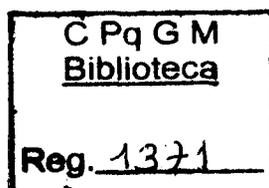
**MODULAÇÃO DO GRANULOMA PERIOVULAR
ESQUISTOSSOMÓTICO: MORFOMETRIA E
COMPORTAMENTO DA MATRIZ EXTRACELULAR.**

LUCIANA MENEZES DA SILVA

Professor-orientador: ZILTON DE ARAÚJO ANDRADE

Dissertação apresentada para
obtenção do grau de Mestre
em Patologia Experimental.

Salvador - Bahia - Brasil
1998



Ficha Catalográfica elaborada pela
Biblioteca do CPqGM/FIOCRUZ - Salvador - Bahia.

Silva, Luciana Menezes da
S586m Modulação do granuloma periovular esquistossomótico: morfometria
e comportamento da matriz extracelular / Luciana Menezes da Silva. —
Salvador: UFBA / CPqGM, 1998.
98p.: il.

Dissertação (Mestrado em Patologia) – Universidade Federal da
Bahia, 1998.

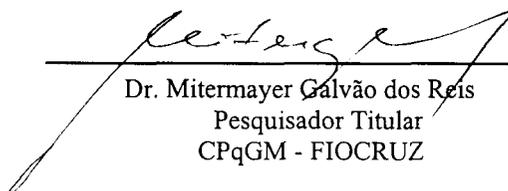
1.Esquistossomose Mansonii. 2.Granuloma. 3.Matriz Extracelular. 4.
Modulação Antigênica. I. Título.

CDU 616.995.122-006.44

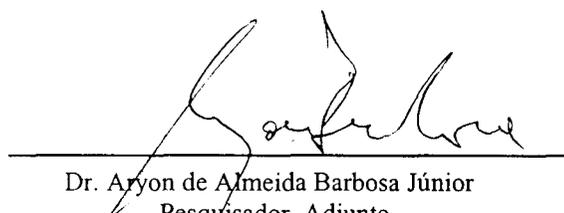
616.995.122-006.44
S586m

FOLHA DE APROVAÇÃO

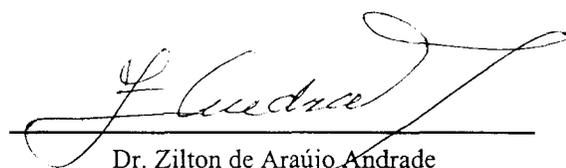
COMISSÃO EXAMINADORA



Dr. Mitermayer Galvão dos Reis
Pesquisador Titular
CPqGM - FIOCRUZ



Dr. Aryon de Almeida Barbosa Júnior
Pesquisador Adjunto
CPqGM - FIOCRUZ



Dr. Zilton de Araújo Andrade
Pesquisador Titular
CPqGM - FIOCRUZ

“Feliz é o homem que acha sabedoria, e o homem que adquire entendimento; pois melhor é o lucro que ela dá do que o lucro da prata, e a sua renda do que o ouro. Mais preciosa é do que as jóias, e nada do que possas desejar é comparável a ela.”

Provérbios, 3:13-15.

*A DEUS, por direcionar os meus caminhos,
a meus pais Lourival e Lúcia
por me ensinarem as melhores lições
e a minha família por me acompanhar
nesta caminhada.*

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Dr. Zilton de Araújo Andrade por ser o meu exemplo mais próximo de sabedoria, entendimento e humildade.

Ao Dr. Aryon de Almeida Barbosa Júnior, pela orientação na coleta e análise de dados morfométricos bem como pela orientação recebida durante todo esse período.

À Dra. Sonia Gumes Andrade pelo agradável convívio e por ser um exemplo de uma grande cientista.

Ao Dr. Jean-Alexis Grimaud pela doação dos anticorpos com os quais foram realizadas as reações de imunofluorescência.

Ao Dr. Eduardo Ramos pela disponibilidade do microscópio de fluorescência e pela atenção a mim dispensada.

Ao Dr. Allen Cheever pelo treinamento recebido para utilização da técnica de hidroxiprolina, doação de referências bibliográficas e pelo agradável convívio durante esse período.

Ao Diretor do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Dr Mitermayer Galvão dos Reis, pelo apoio institucional fornecido para realização desta tese.

Aos amigos do Laboratório de Patologia Experimental por estarem sempre disponíveis em todos os momentos necessários: Sr. Antonio Carlos dos Santos, Queli Teixeira, Andréa Cavalcanti, Jorge Ribas, Antonio Benigno, Lídia e Alena.

À Sra. Teresa Almeida por me ensinar todas as técnicas experimentais da esquistossomose que permitiram o desenvolvimento dessa tese

Ao Dr. Irismar de Oliveira Reis e a Theolis Barbosa pelo importante auxílio dado durante a análise estatística dos dados e pela elaboração dos gráficos aqui apresentados.

Ao Sr. Hans Joseph Maria Leusen por proporcionar o meu desenvolvimento profissional.

A André Magalhães pela inspiração com a qual conseguiu transformar imunofluorescência em obra de arte.

À Bióloga Márcia Maria de Souza pela cumplicidade, amizade e auxílios prestados durante todo o nosso convívio.

À Bióloga Cláudia Maria da Cunha Borges e Hélio Do Val Júnior pela amizade de séculos e por todos os momentos compartilhados.

À Ana Cristina Gonzalez pelos primeiros momentos de convivência no CPqGM com quem obtive meu primeiro treinamento científico e pela forte amizade que construímos.

À Rosália Meires Silva, pelo excelente trabalho desenvolvido na secretaria do curso de pós-graduação e pelo carinho e atenção com os quais pude contar.

Aos amigos do Laboratório de Doença de Chagas pelo auxílio e companheirismo sempre presentes: Elianita Suzart, Edson Camandaroba, Juracy e Maria de Fátima Magalhães, Dinalva França de Jesus, Ariane Pimentel e Andréa Magalhães.

Ao Dr. Moysés Sadigursky pelas primeiras orientações laboratoriais e pela amizade constante desde então.

Aos amigos do mestrado por compartilharmos os mesmos sonhos.

Às técnicas do Laboratório de Histopatologia que prepararam as lâminas histológicas: Creuza dos Santos Vasconcelos, Cristina dos Santos Vasconcelos Mota e Cátia Ferreira Magalhães.

Aos companheiros do Biotério do CPqGM que cuidaram dos animais utilizados nesse experimento: Presciano da Silva Correa, Antonia Salustiana da Silva, Oswaldo Gomez, Luiz Augusto A. dos Santos e Everaldo Neves dos Santos.

À Márcia Lázara, Edvana Ferreira, Rita Rosa, Zulmira e Maria José pela amizade e

apoio nos momentos difíceis.

Às bibliotecárias do CPqGM pelo auxílio e orientações recebidas durante a execução do manuscrito desse tese: Ana Maria Fiscina V. Sampaio e Edelvania de Araújo.

À Sra. Edite Silva Santos pelos constantes incentivos e pela ajuda técnica recebida com a utilização da fotocopadora.

À Kátia Mota pelo grande auxílio dado na obtenção de referências bibliográficas.

Aos colegas dos diversos laboratórios com os quais pude contar: LPBM, LPBC e LIMI.

A Brendan Flannery que me auxiliou na tabulação de dados e cálculos morfométricos.

Aos colegas dos setores de audio visual e de informática: Tânia de Farias, Itamar Crispim, Pedro Vivas e Marcos Mota, pela disponibilidade e auxílios imediatos.

A todos do CPqGM e amigos que direta ou indiretamente contribuíram para a execução desse, meus sinceros agradecimentos.

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

1	INTRODUÇÃO	01
1.1	O GRANULOMA ESQUISTOSSOMÓTICO	01
1.2	O FENÔMENO DA MODULAÇÃO	06
1.3	A MODULAÇÃO EM DIFERENTES ÓRGÃOS	08
1.4	FATORES IMUNOLÓGICOS LIGADOS À MODULAÇÃO	12
2	OBJETIVOS	17
3	JUSTIFICATIVA	18
4	MATERIAIS E MÉTODOS	19
4.1	ANIMAIS EXPERIMENTAIS	19
4.2	INFECÇÃO	19
4.3	GRUPOS EXPERIMENTAIS E TEMPO DE SACRIFÍCIO	20
4.4	MICROSCOPIA ÓPTICA	21
4.5	DADOS PARASITOLÓGICOS	21
4.5.1	Contagem do número de vermes	21
4.5.2	Contagem do número de ovos nos tecidos	22
4.6	IMUNOFLUORESCÊNCIA	22
4.7	DOSAGEM DE HIDROXIPROLINA	22
4.8	MORFOMETRIA	23
4.9	ANÁLISE ESTATÍSTICA	25
5	RESULTADOS	26
5.1	DADOS PARASITOLÓGICOS	26
5.1.1	Recuperação de Vermes	26
5.1.2	Contagem do Número de Ovos por Grama de Tecido	26
5.2	ACHADOS HISTOLÓGICOS	27
5.2.1	Animais do Grupo I - Fase Aguda	27
5.2.2	Animais do Grupo II - Fase Intermediária	30
5.2.3	Animais do Grupo III - Fase Crônica	32
5.3	HIDROXIPROLINA	33
5.4	IMUNOFLUORESCÊNCIA	35
5.5	MORFOMETRIA	37
5.5.1	Fibrose	37
5.5.2	Medidas Morfométricas de Granulomas Totais	38
5.5.3	Granulomas Isolados do Fígado	58
	PRANCHAS	60
6	DISCUSSÃO	68
7	COMENTÁRIOS FINAIS	78
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	79

RESUMO

MODULAÇÃO DO GRANULOMA ESQUISTOSSOMÓTICO: MORFOMETRIA E COMPORTAMENTO DA MATRIZ EXTRACELULAR. LUCIANA MENEZES DA SILVA. O granuloma formado em torno de ovo maduro do *Schistosoma mansoni* no fígado se modifica no seu tamanho, forma e composição com o passar do tempo. Este fenômeno, denominado “modulação imunológica”, tem sido atribuído fundamentalmente a fatores imunes. Como a “modulação” ocorre apenas no fígado, e não em outros órgãos, a participação de fatores locais parece ser decisiva para que o fenômeno ocorra. Estes últimos têm sido pouco estudados e agora, numa tentativa de contribuir para o seu entendimento, foram particularmente considerados. A presente investigação foi feita em camundongos infectados com 50 e 100 cercárias do *S. mansoni*. Os granulomas formados em torno de ovos maduros foram estudados e comparados em três órgãos (pulmão, fígado e intestino) e em três fases distintas da infecção: aguda (8 semanas), intermediária (16 semanas) e crônica (22 semanas), com técnicas histológicas, morfométricas, bioquímicas e de imuno-fluorescência. Os resultados confirmaram que o fenômeno da modulação é exclusivamente hepático, não sendo observadas modificações semelhantes no pulmão e intestino. Os elementos da matriz extracelular pesquisados (colágenos de tipo I, III e IV, fibronectina, laminina, proteoglicanos e elastina) estiveram presentes em todos os locais, mas eram muito mais proeminentes no fígado. Exceto a elastina, que apareceu apenas no fígado, exclusivamente em casos crônicos. A avaliação morfométrica indicou redução no volume, área e densidade de volume apenas nos granulomas hepáticos ao longo das três fases estudadas. A abundância de elementos da matriz extracelular presente nos granulomas hepáticos foi a principal alteração responsável pelos aspectos morfológicos da modulação. Esse aspecto foi correlacionado com particularidades da estrutura celular não parenquimatosa do fígado, onde as células perinusoidais e as células de Kupffer participam de um eixo “sui generis” relacionado com a formação e degradação da matriz. No estudo do fenômeno da “modulação” do granuloma esquistossomótico fica evidente que é o comportamento destes elementos celulares que determina as modificações da matriz extra-celular em torno dos granulomas hepáticos, representando, na sua essência, o fenômeno da “modulação”.

ABSTRACT

MODULATION OF SCHISTOSOMAL PERIOVULAR GRANULOMA: MORPHOMETRY AND THE BEHAVIOR OF EXTRACELLULAR MATRIX.

LUCIANA MENEZES DA SILVA. The granuloma formed around mature eggs of *Schistosoma mansoni* in the liver undergoes changes in its size, appearance and constitution with time. This phenomenon became known as “immunological modulation” and has been attributed solely to immunologic factors. However, as modulation occurs only in the liver and not in other organs, the participation of local factors seems to be decisive. As these factors have been little considered in previous studies, present investigation was planned to particularly examine them. Outbred mice infected with either 50 and 100 *S. mansoni* cercariae were utilized. Periovular granulomas formed around mature eggs were comparatively studied in three organs (liver, lung, intestine) and during three different phases of the infection: acute (8-weeks), intermediate (16-weeks) and chronic (22-weeks). Histological, morphometric, biochemical and immunofluorescence techniques were employed to investigate extracellular matrix components, besides size, aspect and cellular composition of granulomas. Results confirmed the modulation as a exclusively hepatic phenomenon, since pulmonary and intestinal granulomas did not change with time. The matricial components which were investigated (Type I, III and IV collagens, fibronectin, laminin, proteoglycans and elastin) were found in all granulomas and in all organs examined. However, their presence was much more prominent in the liver. As a matter of fact, elastin was found only in hepatic granulomas and exclusively in chronic cases. The large amount of extracellular matrix components found in hepatic granulomas was the main change responsible for the morphologic aspects of modulation. This finding was correlated with the presence of cellular elements which are characteristic of the liver, such as, perisinusoidal cells and Kupffer cells, which are the main sources for the formation and degradation of extracellular matrix in the liver. On studying the subject of “immunological modulation” of periovular granulomas, it appears that it is the behavior of the extra-parenchymatous cellular elements peculiar to the liver, that ultimately determines the changes we identify as “modulation”.

1 INTRODUÇÃO

As transformações que ocorrem com o passar do tempo nas lesões que se formam em torno do ovo maduro do *Schistosoma mansoni*, nos vários tecidos do hospedeiro, são interessantes e complexas. Estas alterações representam processos aos quais tem-se dado a designação de “modulação” dependem de muitos fatores e estes têm sido intensamente estudados, sobretudo no que se refere a imunologia. Aqui faz-se uma abordagem da influência do local onde a lesão periovular se situa, das peculiaridades da matriz extracelular e de seus elementos celulares, numa tentativa de contribuir para o entendimento do fenômeno da modulação do granuloma esquistossomótico, sob um ângulo que tem sido até aqui pouco considerado.

1.1 O GRANULOMA ESQUISTOSSOMÓTICO

Ao se agregar, o infiltrado celular por vezes forma no tecido cronicamente inflamado uma estrutura focal, pequena, isolada, circundada por macrófagos, podendo ou não haver a junção de outros tipos celulares. Essa estrutura assim organizada é denominada granuloma. Esse elemento especial se desenvolve em torno de materiais particulados de difícil eliminação, pouco solúveis ou dificilmente degradados (MAJNO & JORIS, 1996). São os chamados granulomas de corpo estranho. Outros, são granulomas imunes, também chamados granulomas de hipersensibilidade. São causados por partículas insolúveis, que funcionam como antígenos, capazes de induzir uma resposta imune denominada reação de hipersensibilidade do tipo tardio. Essas estruturas são os elementos que contribuem para a patogênese de muitas doenças infecciosas, dentre elas a esquistossomose. Nesta doença, as alterações imunopatológicas consistem na formação de granulomas em torno de ovos depositados pelas fêmeas do *S. mansoni* e que resulta numa reação de hipersensibilidade,

mediada por antígenos específicos.

O granuloma esquistosomótico foi visto inicialmente como um elemento importante para a proteção do hospedeiro contra elevada concentração de materiais estranhos ou “não próprios” de origem endógena ou exógena, por limitar a difusão de antígenos no sistema vascular e reduzir a capacidade disseminação de alguns agentes infecciosos (LENZI et al., 1991). Atualmente ele também é entendido como um elemento auxiliar na manipulação do sistema imunológico do hospedeiro pelo parasita, por facilitar o seu processo de replicação e transmissão (McKERROW, 1997). Essa nova visão baseou-se em trabalhos onde se verificou que camundongos imunodeprimidos apresentaram deficiência na formação da reação granulomatosa, com redução da excreção de ovos nas fezes, sendo que a injeção de soro de animais imunologicamente competentes, nestes camundongos, restaura a formação da reação granulomatosa e restabelece parcialmente a excreção dos ovos nas fezes (DOENHOFF et al., 1978).

Durante a infecção, os ovos depositados pelo *S. mansoni* logo após a postura, são imaturos, levando cerca de 6 dias para o seu amadurecimento; a partir daí, estes podem viver cerca de 12 dias nos tecidos do hospedeiro (PRATA, 1957). Com o desenvolvimento do embrião são eliminados materiais glicoprotéicos, que desencadeiam no hospedeiro uma reação tecidual em torno dos ovos depositados. À medida que o embrião amadurece as glândulas cefálicas do miracídio começam a excretar antígenos solúveis através de pequenos poros da casca do ovo (STENGER et al., 1967). Esses antígenos contêm múltiplas proteínas, glicoproteínas, carboidratos e glicolípídeos que são capazes de induzir o desenvolvimento da formação granulomatosa e sua regulação (reação do tipo hipersensibilidade tardia) (LICHTENBERG, 1962; WARREN et al., 1974). Esta resposta foi de início interpretada como uma reação destinada a matar o miracídio. Todavia, estudos desenvolvidos por ANDRADE & REIS (1984), ao acompanharem o processo evolutivo dos ovos de *S. mansoni* depositados no fígado, pulmão e intestino de camundongos após tratamento curativo, demonstraram que a resposta granulomatosa desenvolvida em torno desses ovos não foi capaz de destruir o ovo e matar o miracídio. A destruição do miracídio se deve à exaustão das

reservas energéticas do embrião ao fim do seu ciclo vital no interior do hospedeiro. Sua desintegração pelas células do hospedeiro ocorre em seguida. Os autores supracitados concluíram que a reação tecidual se faz para seqüestrar antígenos de baixa difusibilidade e assim proteger os tecidos do hospedeiro, mais do que para matar diretamente o miracídio.

O granuloma esquistossomótico periovular tem sido estudado em vários modelos experimentais, como o desenvolvido por LICHTENBERG (1962), baseando-se na injeção de ovos viáveis de *S. mansoni* na veia caudal de camundongos. Estes ovos ganham o sistema da veia cava inferior e vão diretamente para a circulação arterial pulmonar, ultrapassando o filtro hepático. No pulmão, o tamanho dos granulomas foi medido em diferentes intervalos de tempo. Este modelo permitiu um melhor entendimento da resposta inflamatória induzida por ovos de *S. mansoni*, servindo como base para vários experimentos.

WARREN et al. (1967) demonstraram que o granuloma esquistossomótico no fígado é uma resposta imunológica específica mediada por células e esta capacidade de resposta pode ser transferida através de células, mas não através do soro. Tal modelo também foi utilizado em muitos experimentos que tentaram suprimir a resposta granulomatosa através de drogas imunossupressoras (DOMINGO et al., 1967), timectomia neonatal (DOMINGO & WARREN, 1967) soro heterólogo anti-linfócito (DOMINGO & WARREN, 1968) e altas doses de irradiação (PERROTO & WARREN, 1969). Essas medidas no entanto não foram eficazes em evitar a formação granulomatosa em camundongos infectados.

Posteriormente, com o uso de camundongos sem resposta imune timo-dependente (“*nude mice*”), foi demonstrada a incapacidade de tais animais para desenvolver eosinofilia periférica em granulomas hepáticos (PHILLIPS et al., 1977). BRYRAN & LICHTENBERG (1977) constataram que tais granulomas, em camundongos congenitamente atímicos (nu/nu), eram menores que os do grupo controle heterozigoto (nu/+), não apresentando células epitelióides e sim monócitos e macrófagos com pigmentos no citoplasma, alguns neutrófilos e

raramente eosinófilos e células gigantes. Confirmando assim, mais uma vez, que a formação do granuloma em resposta aos ovos do *S. mansoni* é uma reação imunológica dependente de linfócitos T.

A população celular do granuloma esquistossomótico foi bem caracterizada por MOORE et al. (1977) que, utilizando camundongos não sensibilizados, sensibilizados e previamente infectados, demonstraram uma predominância inicial de células mononucleares pequenas, as quais logo após a infecção tornaram-se subrepujadas pelos eosinófilos, que passaram a ser o tipo celular mais freqüente, representando 71% das células presentes nos animais sensibilizados. As grandes células mononucleares, tais como os macrófagos (células epitelióides), permaneceram relativamente constantes, perfazendo cerca de 30% do total dessas células. A sensibilização prévia por injeção intraperitoneal de ovos do *S. mansoni*, levou à aceleração da formação do granuloma, influenciando também o tipo celular encontrado e sua mobilização para o local da inflamação. Estudos realizados por SILVA et al. (1993), sugerem a participação de células gigantes no mecanismo imunorregulatório da reação granulomatosa aos ovos de *S. mansoni*; entretanto, novos estudos são necessários para confirmação dessa hipótese, pois, pouco se conhece a respeito da função biológica de tais células. Estudos realizados por PAPADIMITRIOU et al. (1975), relatam que as células gigantes são menos fagocíticas e se movem mais lentamente que seus precursores celulares, sendo geralmente representadas como uma forma de eliminação de macrófagos velhos. Em relatos posteriores PAPADIMITRIOU & BRUGGEN (1986), determinaram que estas células também são metabolicamente menos ativas que os macrófagos originários.

A evolução da resposta granulomatosa do hospedeiro aos os ovos do *S. mansoni*, pode ser dividida em cinco estágios segundo HSÜ et al. (1972); a) Não-reativo ou estágio pouco-reativo, quando os ovos estão imaturos atraindo células mononucleares neutrófilos e eosinófilos; b) Estágio exudativo, quando os ovos maduros são margeados por microabcessos,

com muitos neutrófilos e alguns eosinófilos; c) Estágio exudativo-produtivo, quando histiócitos e células epitelióides circundam os ovos e os microabcessos, sendo por sua vez envolvidos por fibroblastos; d) Estágio produtivo, quando o granuloma em torno dos ovos consiste de três zonas, uma zona interna de células epitelióides, histiócitos e ocasionalmente células gigantes, uma zona média de fibroblastos e uma zona externa de linfócitos, plasmócitos e alguns histiócitos. O miracídio pode estar vivo ou morto durante este estágio; e) Estágio involutivo quando os ovos estão de tamanho reduzido e a casca é circundada por algumas fibras colágenas. O ovo é freqüentemente desintegrado, podendo aparecer calcificado. Devemos notar que estas alterações representam o ciclo evolutivo pelo qual passam os ovos nos tecidos desde a sua deposição até sua involução. A modulação encerra um conceito diferente. É representada pelas alterações que se formam em torno do ovo maduro em diferentes fases evolutivas da infecção.

O desenvolvimento de um modelo *in vitro* obtido por DOUGHTY & PHILLIPS (1982), foi preconizado para a análise dos eventos imunológicos na formação e modulação do granuloma e se mostrou de grande importância para o estudo da dinâmica dessa resposta celular. O sistema *in vitro* assim desenvolvido foi denominado "formação do granuloma *in vitro*", sendo uma adaptação do modelo *in vivo* desenvolvido por LICHTENBERG (1962) e adaptado por BOROS & WARREN (1973). Neste último modelo, os ovos do *S. mansoni* ou partículas cobertas com antígeno ovular solúvel (SEA) foram injetados na vascularização pulmonar de camundongos visando seu aprisionamento e indução da formação granulomatosa. Todavia, no sistema *in vitro* os ovos intactos ou "beads" contendo SEA foram co-cultivados com células de camundongos sensibilizados ou de pacientes. A reação observada foi quantificada, observando-se o número e tipos celulares que foram atraídos e aderidos aos ovos e "beads". (PHILLIPS et al., 1980; BENTLEY et al., 1982; DOUGHTY & PHILLIPS, 1982, 1982a; BENTLEY et al., 1985; LAMMIE et al., 1985). Essas reações

envolveram o recrutamento de subtipos de células antígeno-específicas, tais como macrófagos, linfócitos, eosinófilos e fibroblastos, estabelecendo uma seqüência de eventos que compreende aderência de células mononucleares ao ovo, linfócitos e macrófagos, transformação blástica subsequente, recrutamento adicional de populações de células mononucleares, eosinófilos e fibroblastos, sendo estes últimos capazes de sintetizar o colágeno. A reatividade aos antígenos ovulares solúveis, sua regulação e imunorregulação anti-idiotípica também puderam ser demonstradas no sistema descrito acima (DOUGHTY et al., 1989; PARRA et al., 1991).

Há também uma dinâmica na composição da matriz extracelular durante o desenvolvimento do granuloma hepático. A lesão inicial em torno dos ovos é subsequente circundada por proliferação do tecido conjuntivo nos estágios tardios da infecção. Sendo visto o processo da formação do granuloma periovular esquistossomótico como uma série de reações dinâmicas caracterizadas por evolução e involução de lesões individuais, alterações no tamanho pelo acúmulo de lesões em diferentes estágios do desenvolvimento, mudanças na resposta granulomatosa durante o curso da doença e surgimento da fibrose residual com alterações nas taxas de reabsorção da fibrose (WARREN, 1968).

1.2 O FENÔMENO DA MODULAÇÃO

O processo da imunomodulação no granuloma periovular esquistossomótico foi descrito inicialmente por ANDRADE & WARREN (1964) ao observarem a evolução do granuloma hepático em torno de ovos maduros, em camundongos em diferentes fases da infecção pelo *S. mansoni*. Estes autores verificaram que a intensidade da resposta inflamatória é máxima na fase aguda da infecção, declinando subsequente, tornando a reação aos

ovos recentemente chegados ao fígado nitidamente menor, mais circunscrita, mais proliferativa e menos exsudativa. Este fenômeno foi descrito por DOMINGO & WARREN (1968) como dessensibilização endógena ou modulação.

Na fase aguda da doença (8-10 semanas após a exposição cercariana), a resposta inflamatória em torno dos ovos é intensa, por vezes com presença de um halo necrótico periovar, com muitos polimorfonucleares eosinófilos, de limites imprecisos. Com o progresso da infecção, o pico da resposta inflamatória é refreado por processos imunorregulatórios a ovos recém depositados, o que torna os granulomas mais delimitados, com muitos macrófagos e proliferação fibroblástica e diminuição progressiva do número de eosinófilos. Numa interpretação teleológica pode-se dizer que o processo imunomodulatório leva à proteção do hospedeiro. (COLLEY, 1976; CHENSUE & BOROS 1979; COLLEY et al., 1979; COLLEY, 1981). Não se deve confundir este processo evolutivo, que causa diminuição do tamanho dos granulomas formados em torno de ovos recentemente depositados, com aquela evolução que sofre o granuloma depois que o miracídio se desintegrou. Neste último caso, há uma fibrose progressiva, um reparo, que culmina com a reabsorção total ou parcial da lesão que se formou focalmente.

Para compreender os elementos responsáveis pelo processo de modulação vários estudos têm sido realizados no intuito de elucidar seus mecanismos efetores. As linfocinas MIF (fator inibidor da migração de macrófagos) e ESP (promotor da estimulação de eosinófilos) foram isolados da cultura de granulomas hepáticos de camundongos infectados (BOROS et al., 1973; JAMES & COLLEY, 1975). Estes são mediadores considerados responsáveis pela iniciação e manutenção da resposta granulomatosa. MIF e MAF (fator ativador de macrófagos), ESP e interleucina 2 (IL2) também foram produzidos por clones de células T reativos ao SEA (LAMMIE et al., 1985). BOROS et al. (1975) observaram que o pico da modulação do granuloma foi acompanhado por uma diminuição na produção de MIF

por células esplênicas estimuladas pelo SEA. CHENSUE et al. (1980) verificaram que os linfócitos T produtores de MIF, encontrados na oitava semana de infecção no baço de camundongos, pertenciam a subclasse de células Lyt 1+ e não expressavam antígeno Ia. Entretanto, células T detectáveis na vigésima semana pós-infecção pertenciam à subclasse Lyt 2+ e expressavam determinantes I-J e I-C. Estes autores observaram posteriormente que a regulação poderia ser resultante da interação de células T-T, responsáveis pela produção de linfocinas ou ainda estar sobre um equilíbrio dinâmico entre células efetoras e reguladoras (CHENSUE et al., 1981). Logo, na dinâmica do processo inflamatório a manutenção estaria na dependência de células Lyt 1+ , Ia, enquanto a intensidade da resposta inflamatória seria regulada por subtipos Lyt 1+, Ia e Lyt 2+. Ia+.

Embora o processo da imunomodulação tenha sido bem observado e caracterizado no fígado, a reação granulomatosa não evolui de forma idêntica em todos os órgãos onde os ovos são depositados, presumindo-se a existência de uma rede complexa de fatores locais que contribuem para a determinação do processo imunomodulatório.

1.3 A MODULAÇÃO EM DIFERENTES ÓRGÃOS

WEINSTOCK & BOROS (1981, 1983) demonstraram diferenças no tamanho e composição celular dos granulomas periovulares no fígado e no intestino. Estes pesquisadores observaram que os granulomas do íleo, na infecção recente, são consideravelmente menores que os granulomas do fígado, cólon e placa de Peyer e diferentemente destes últimos, que apresentam uma diminuição de tamanho nas fases mais tardias da infecção, os granulomas do íleo não sofrem a modulação que é induzida por linfócitos T. Quanto à composição celular, foi observado que o granuloma hepático, isolado de camundongos com nove semanas de infecção, era constituído principalmente de eosinófilos, com menor número de macrófagos,

linfócitos e neutrófilos. O granuloma do cólon continha menos eosinófilos, linfócitos e neutrófilos que os granulomas hepáticos. Entretanto, proporcionalmente, demonstrou maior número de macrófagos e relativamente menor número de outros tipos celulares. O granuloma do cólon continha menor número de linfócitos T e B em relação ao fígado e os granulomas do íleo apresentavam poucos linfócitos T, entretanto não foram observados linfócitos B.

Estudos realizados por SANTOS et al. (1992), visando avaliar diferenças na produção e reabsorção da fibrose no fígado e intestino, mostraram que nas primeiras semanas da pós-exposição a cercárias, os granulomas encontrados no intestino eram menores, mais celulosos e constituídos principalmente por macrófagos e granulócitos. Já os granulomas observados no fígado eram maiores, mais compactos e apresentavam halo celular representado por linfócitos, plasmócitos e granulócitos. Na décima primeira semana de infecção, granulomas constituídos predominantemente por fibroblastos e fibras colágenas foram observados no fígado, mas não no intestino. As análises morfométricas realizadas confirmaram as observações no que tange ao tamanho dessas estruturas. Os granulomas hepáticos foram maiores que os intestinais, entretanto, a partir da décima sexta semana da infecção, diferenças observadas no tamanho das estruturas não foram significantes. Também não foi demonstrado qualquer diferença no tempo de reabsorção da fibrose após tratamento nos diferentes órgãos estudados.

No pulmão, estudos anteriores desenvolvidos com o uso de modelos experimentais por LICHTENBERG (1962) e EDUNGBOLA & SCHILLER (1979), visaram o acompanhamento da evolução dos granulomas neste órgão. Ao injetar ovos viáveis de *S. mansoni* isolados de granulomas hepáticos de camundongos na fase crônica da infecção em animais não infectados observaram que estes ao se depositarem no parênquima pulmonar, desenvolviam uma reação granulomatosa. Assim, verificaram a resposta máxima em torno do décimo sexto dia após a injeção, quando lentamente involuíram, chegando a um tamanho mínimo em torno de 256 para Lichtenberg e 100 dias para Edungbola & Schiller .

Esses achados, no entanto, foram confirmados por SOUZA VIDAL et al. (1992), que ao estudarem o processo da formação granulomatosa no pulmão de camundongos infectados na fase aguda e crônica, via ligadura parcial da veia porta, verificaram que os granulomas pulmonares esquistossomóticos formados no interior do tecido alveolar do parênquima pulmonar se apresentavam morfológicamente semelhantes, quando examinados durante todo o curso da infecção, desde a décima até a vigésima quinta semana, demonstrando não haver qualquer tipo de processo imunomodulatório nesse órgão. É provável que estas discrepâncias se devam a diferenças nas técnicas empregadas, uma vez que a realização da ligadura da veia porta promove a chegada lenta de ovos viáveis em estágios iniciais do desenvolvimento e a injeção destes, leva à chegada brusca de grande quantidade de ovos em diversos estágios evolutivos.

Muitas pesquisas foram realizadas com o intuito de identificar elementos regulatórios e a influência do microambiente no processo da imunomodulação, uma vez que esse processo não ocorre de forma idêntica em todos os órgãos, valorizando-se a importância da matriz conjuntiva durante o processo imunomodulatório nos granulomas (LENZI et al., 1991).

Relações complexas entre células inflamatórias, células do tecido conjuntivo e matriz extracelular, envolvendo a produção de citocinas, hormônios, proteinases e fatores estimuladores e inibidores ocorrem durante o remodelação ou simples degradação da matriz extracelular (MURPHY & REYNOLDS, 1993). Além disso, interações adesivas entre células bem como entre células e a rede de proteínas insolúveis da matriz extracelular exercem um papel vital na regulação da expressão genética sob condições normais e patológicas (GRESSNER & BACHEM, 1994).

Sabemos que a matriz extracelular contém moléculas que funcionam como receptores para células, hormônios e fatores de crescimento, entre outros e que essas moléculas podem ter importante participação na migração, ancoragem e diferenciação fenotípica dos elementos

celulares (MARTINEZ-HERNANDEZ & AMENTA, 1995). Assim, seria possível, que reações inflamatórias em torno do mesmo estímulo patogênico, possam apresentar morfologia variável durante a evolução da reação na dependência da matriz onde elas se assentam. Uma vez que a interação entre matriz, citocinas e células promovem um número de mecanismos regulatórios e ações, as quais são provavelmente importantes na patogênese da fibrose em diferentes órgãos.

Durante a formação do granuloma e do tecido de granulação há uma reciclagem metabólica de proteínas da matriz extracelular como resultado de dois processos simultâneos porém opostos: a biossíntese e a degradação. Poucos são os conhecimentos sobre a influência direta do parasita e do organismo infectado sobre esses eventos (LENZI et al., 1991). A reação em torno dos ovos de *S. mansoni*, no tecido do hospedeiro, nos dá uma boa ilustração dessas mudanças contrárias, porque ambas as evidências, seja de síntese e de degradação do colágeno, podem ser observadas lado a lado a nível ultra-estrutural (ANDRADE, 1994).

A presença de colagenases tem sido demonstrada em fígados de camundongos infectados pelo *S. mansoni* (BIEMPICA et al., 1983). TAKAHASHI et al. (1980) observaram que, nas primeiras semanas após infecção, a síntese de colágeno e a atividade das colagenases estavam presentes e subseqüentemente, a atividade das colagenases e de outras proteases neutras decresceram rapidamente enquanto o colágeno continuava a ser sintetizado, levando ao acúmulo do mesmo (CHEEVER et al., 1983). Esse acúmulo foi caracterizado como uma deposição concêntrica de colágeno associada aos outros componentes matriciais, em torno dos ovos embolizados (NISHIMURA et al., 1985; TAKIYA et al., 1986).

Métodos bioquímicos e imunohistoquímicos têm demonstrado que a matriz extracelular do granuloma hepático murino contém grande quantidade de colágeno tipo III nas infecções recentes. Nestes animais, a quantidade absoluta de colágeno tipo III aumentou 22 vezes em relação ao fígado normal, enquanto que o colágeno tipo I aumentou 11 vezes (WU

et al., 1982). Em granulomas hepáticos murinos com 9 a 10 semanas de infecção, PARISE et al. (1985) observaram densos depósitos de procolágeno tipo III e fibronectina, enquanto que a laminina e o colágeno tipo IV foram encontrados somente em vasos neoformados na periferia do granuloma. Em material humano tem sido observado que nos estágios iniciais os granulomas contêm principalmente fibronectina e colágeno tipo III e nos granulomas da fase crônica são formados predominantemente pelo colágeno tipo I, ao passo que granulomas hialinizados não contêm colágenos tipo I ou III, nem fibronectina (AL ADANANI, 1985). MARCOS et al. (1985) também verificaram que em granulomas da 8ª semana pós-infecção são mais rapidamente reabsorvidos após quimioterapia que outros com 39 semanas. Sugerindo que a diferença genética dos tipos de colágeno predomina em cada caso: tipo III em granulomas iniciais e tipo I em granulomas tardios, o que pode concorrer para esta diferença.

GRIMAUD et al. (1987) ao estudarem os isotipos de colágeno, laminina e fibronectina de granulomas presentes no fígado e intestino de camundongos infectados pelo *S. mansoni*, observaram diferenças na composição dessa estrutura ao nível da deposição dos elementos matriciais. Através dessas observações podemos verificar a dinâmica da matriz extracelular durante a evolução da reação granulomatosa.

1.4 FATORES IMUNOLÓGICOS LIGADOS À MODULAÇÃO

Muitos estudos acerca da modulação do granuloma esquistossomótico têm enfatizado principalmente os aspectos imunológicos, sendo possível classificá-los em três grupos básicos: a) participação de células T com atividade supressoras; b) regulação transversa por citocinas produzidas por linfócitos Th1 ou Th2 e c) desenvolvimento de anticorpos anti-idiotípicos por células B ou linfócitos T com atividade anti-idiotípica.

Conforme anteriormente citado, células T CD4+ são os principais elementos para a

formação do granuloma em torno dos ovos de *S. mansoni* (MATHEW e BOROS, 1986) e células CD8+ parecem ser importantes para a modulação do tamanho do granuloma na infecção crônica (CHENSUE & BOROS 1979; HENDERSON et al., 1992).

A relação existente entre células CD4+ na sua diferenciação em Th1 e Th2 em muito tem contribuído para elucidação dos mecanismos imunomodulatórios que ocorrem durante a modulação do granuloma periovular. Esses subtipos celulares encontram-se envolvidos em uma interregulação cruzada, modulando a resposta humoral e de hipersensibilidade tardia, através da produção de linfocinas. O subtipo Th1 é responsável pela produção predominante de IL-2, IFN- γ , mediadores da hipersensibilidade do tipo tardia (DTH). O subtipo Th2 expressa IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13 e o subtipo Th0 produz citocinas dos subtipos Th1 e Th2 (WYNN e CHEEVER, 1995).

Durante a fase inicial da reação granulomatosa até a 6^a semana da infecção, tem sido verificado que a produção de citocinas indica a presença de células Th1, em contraste, observa-se que em torno da 8^a a 12^a semana a participação de células Th2 se faz proeminente (GRZYCH et al., 1991; KULLBERG et al., 1992; WYNN et al., 1993 e BOGEN et al., 1995), sendo sugerido a ovipostura como estímulo predominante na produção da resposta Th2, participando principalmente como elemento efetor na formação do granuloma esquistossomótico. Há hipóteses de que macrófagos derivados de granulomas podem induzir um estado de anergia em clones de células T, como resultado da imunomodulação *in vivo* (FLORES VILLANUEVA et al., 1994). Estudos realizados por LEPTAK & McKERROW (1997), apontam para a necessidade de sensibilização prévia e maturação de vermes adultos como elementos desencadeares do direcionamento da resposta imunológica.

Experimentos envolvendo neutralização ou administração de citocinas *in vitro* e *in vivo* tem contribuído para o conhecimento da dinâmica da produção de citocinas que

caracterizam respostas Th1 e Th2 na formação do granuloma e na sua modulação. Esses estudos demonstram que a intensa eosinofilia sangüínea e tecidual, bem como os altos níveis de imunoglobulina E (IgE), presentes durante o início da infecção, estão associados com a elevação na produção de citocinas IL-5 e esta por sua vez é dependente da diferenciação de CD4 no tipo Th2 (METWALI et al., 1993).

Trabalhos da literatura apontam para a participação de clones Th0 e Th2 no desenvolvimento da reação granulomatosa. ZHU et al. (1994), verificaram a produção de IL-2, IL-4 e IFN- γ , utilizando clones de células T obtidos de granulomas hepáticos na fase aguda da doença. Estes foram então classificadas como do subtipo Th0 e clones produtores de IL-4, IL-5 e IL-10 caracterizados como pertencentes ao subtipo Th2, os quais foram aptos a induzir uma resposta granulomatosa em “beads” forrados com antígenos do ovo (SEA). Curiosamente COUISSINIER & DESSEIN (1995), ao analisarem clones de células T parasita específicas obtidas de pacientes resistentes ao *S. mansoni*, verificaram que estas células assumiram o subtipo Th0 e produziram mais IL-4 que IFN- γ (Th0/Th2), entretanto clones de células T de indivíduos adultos sensibilizados, provenientes de uma área não endêmica, também foram Th0, mas produziram mais IFN- γ que IL-4 (Th0/Th1), indicando a importância do IFN- γ como citocina protetora.

Na infecção crônica, 20^a semana, a resposta Th2 sofre modulação (GRZYCH et al., 1991; HENDERSON et al., 1992; CHENSUE et al., 1993), quando a fase crônica da infecção passa a ser predominantemente Th1, observando-se um aumento da proporção IgG2a para IgG1, decrescendo a eosinofilia e os níveis de IgE (BOROJEVIC, 1992). O IFN- γ , IL-4 e IL-10 exercem um efeito regulador sobre o balanço entre as respostas Th1/Th2, como por exemplo o direcionamento da reação para Th2 pelo IL-4 e IL-10 (YAMASHITA & BOROS, 1992; SABIN & PEARCE, 1995; PEARCE et al., 1996) na fase inicial da infecção. O direcionamento para Th1 se faz sob a influência do IFN- γ . A IL-

10 pode inibir a resposta Th1 a depender das circunstâncias (CHENSUE et al., 1994).

Os estudos realizados por XU et al. (1991) na infecção pelo *S. japonicum* demonstraram semelhanças para as respostas Th1 e Th2. Neste trabalho, realizado com células esplênicas de animais infectados, foi verificado que no primeiro mês após o início da postura havia predomínio da resposta Th2 e a resposta Th1 havia sido suprimida. Na 22^a semana a resposta Th2 também foi suprimida e a produção de IFN- γ se tornou aparente. Análises indicaram que as células T CD4⁺ foi o subtipo linfocitário responsável pela produção de IL-5 na resposta Th2.

Com relação aos estudos com citocinas, observou-se grande produção do fator de necrose tumoral (TNF) nos granulomas periovulares hepáticos da fase aguda (JOSEPH & BOROS, 1993). Os macrófagos isolados de granulomas desta fase, ao serem estimulados com lipopolissacarídeos (LPS), produzem mais TNF que macrófagos obtidos de granulomas modulados. A administração de TNF α a camundongos com infecção crônica restaura o tamanho dos granulomas, sendo esta citocina indicada como elemento importante para formação da resposta granulomatosa e indução na produção de ovos pelas fêmeas adultas de *S. mansoni* (McKERROW et al., 1997).

Células T CD8⁺ apontadas como células responsáveis pela modulação no tamanho do granuloma (CHENSUE & BOROS, 1979), têm seu efeito resultante, em última análise, da produção de IFN- γ . Seu papel supressor está relacionado com a formação da reação granulomatosa e o desenvolvimento de citocinas relacionadas com a resposta de tipo Th2, tendo sido esse dado confirmado com a utilização de camundongos “knockout” para IFN- γ (WYNN et al., 1995). Além disso, a administração de IFN- γ a camundongos entre a 6^a e a 8^a semana da infecção deprime a formação do granuloma pulmonar (LUKACS & BOROS, 1993). Deste modo, parece que a indução rápida da expressão de IFN- γ , seguida da exposição aos ovos do parasita, interfere com a expressão do padrão de células Th2,

resultando na redução do tamanho dos granulomas. Esses dados são consistentes com estudos anteriores que sugerem um papel regulatório do IFN- γ na diferenciação de células Th1/Th2 (GAJEWSKI et al., 1989). O surgimento do IFN- γ durante a deposição de ovos sugere que células “natural killer” (NK) podem ser a principal fonte inicial do IFN- γ . Estudos da depleção de células NK, demonstraram o bloqueio da expressão do mRNA do IFN- γ . (WYNN et al., 1994).

O bloqueio de IL-10 leva ao aumento da síntese de IFN- γ , induzindo modulação da resposta granulomatosa (SHER et al., 1991). Seu mecanismo de atuação está relacionado com o bloqueio na indução da produção de IFN- γ por macrófagos e demais células apresentadoras de antígeno (OSWALDO et al., 1992; FLORES-VILLANUEVA et al., 1993; CHENSUE et al., 1994; JANKOVIC & SHER, 1996).

A presença de um fator anti-idiotípico como elemento componente do processo imunomodulatório, específico para os linfócitos T, também foi detectado em células mononucleares do sangue periférico de pacientes esquistossomóticos curados. Esse fator anti-idiotípico requer a presença de macrófagos ou IL-1 exógena para responder ao idiotípico presente no anti-SEA (COLLEY et al., 1987). Muitos dados são favoráveis à correlação da atividade supressora com uma reatividade anti-idiotípica, atribuindo-se a um fator supressor específico anti-idiotípico derivado de células do timo de camundongos infectados na fase crônica, possivelmente transferido para animais como elementos inibidores da resposta granulomatosa (ABE & COLLEY, 1994).

Ao longo dos anos os estudos a respeito de elementos imunológicos tem sido o alvo principal das pesquisas a respeito da imunomodulação, dando-se relativamente pouca atenção à participação dos elementos matriciais para correlação dos achados no processo de migração celular, proliferação, diferenciação, “homing” e o desenvolvimento da reação granulomatosa periovular em diferentes órgãos.

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

Esclarecer a participação de fatores locais (matriz extracelular) na modulação dos granulomas através do estudo comparativo de granulomas periovulares centrados por ovos maduros do *Schistosoma mansoni*, durante três fases evolutivas da infecção, em três órgãos alvos: fígado, intestino e pulmão de camundongos.

2.2 ESPECÍFICOS

- Caracterizar a modulação dos granulomas através de avaliações morfométricas e histológicas (citológicas) nos três órgãos selecionados.
- Analisar comparativamente os principais componentes da matriz extracelular nos granulomas e fazer correlação destes dados com os aspectos indicativos de modulação em diferentes fases da infecção e em diferentes órgãos.
- Analisar (através métodos imunohistoquímicos e bioquímicos) especificamente a deposição do colágeno, principal componente da matriz extracelular dos granulomas, como indicador da participação da matriz na caracterização morfológica e modulatória dos granulomas periovulares.

3 JUSTIFICATIVA

Este trabalho pretende trazer algumas contribuições aos atuais conhecimentos a respeito do comportamento da matriz extracelular produzida durante a formação da reação granulomatosa, no processo de imunomodulação do granuloma esquistossomótico periovular presentes no fígado, pulmão e intestino. Os achados obtidos através da avaliação qualitativa e quantitativa dos componentes matriciais estudados serão de grande valia para o entendimento de fatores locais como determinante dos diferentes padrões da resposta granulomatosa encontrados nestes órgãos.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS

Foram utilizados 31 camundongos albinos suíços, de ambos os sexos, com peso variável entre 18 e 23g, obtidos do Biotério Central da FIOCRUZ em Manguinhos (RJ). Os animais foram alimentados com ração comercial balanceada e água *ad libitum* durante todo o experimento, sob semelhantes condições de temperatura, umidade e iluminação. A escolha dos animais para os respectivos grupos foi realizada ao acaso.

4.2 INFECCÃO

Os animais foram infectados pela via transcutânea com 50 cercárias do *S. mansoni*, cepa Feira de Santana (ANDRADE & SADIGURSKY, 1985). Adicionalmente foi utilizado um inóculo de 100 cercárias em dois dos grupos, afim de possibilitar a detecção de granulomas pulmonares durante as fases aguda e intermediária da doença, uma vez que, com cargas menores de cercárias, são poucos os granulomas encontrados em secções histológicas deste órgão.

As cercárias foram obtidas a partir de caramujos da espécie *Biomphalaria glabrata*, criados em laboratório e infectados experimentalmente com cerca de 8-10 miracídios do *S. mansoni*. A eliminação de cercárias se processou por exposição à luz artificial durante 30 minutos em água destilada. Após a eliminação, o inóculo foi ajustado para o número desejado de cercárias. Paralelamente, os camundongos foram mantidos parcialmente mergulhados em água morna por 15 minutos para eliminação de fezes e urina, sendo posteriormente colocados em vasilhames individuais contendo o inóculo em água destilada, em quantidade suficiente para que a cauda e as patas traseiras ficassem submersas durante 40 minutos. A infecção foi comprovada mais tarde quando os animais passaram a eliminar ovos viáveis nas fezes.

4.3 GRUPOS EXPERIMENTAIS E TEMPO DE SACRIFÍCIO

Foram formados três grupos experimentais na dependência do tempo de infecção pelo *S. mansoni*:

Grupo I - Fase aguda - Oitava semana pós-infecção. Animais infectados com 50 cercárias (07 camundongos) e 100 cercárias (05 camundongos).

Grupo II -- Fase intermediária - Décima sexta semana pós-infecção. Animais infectados com 50 cercárias (07 camundongos) e 100 cercárias (05 camundongos).

Grupo III - Fase crônica - Vigésima segunda semana pós-infecção. Animais infectados com 50 cercárias (07 camundongos).

Os animais foram anestesiados por inalação de éter etílico sob campânula. Sob anestesia, foi realizada a abertura do peritônio e cavidade torácica ao nível da traquéia, sendo realizada uma ligadura parcial com fio de seda, onde inseriu-se uma agulha número 22, conectada a uma seringa contendo formol tamponado (Millonig). Um lobo pulmonar foi isolado sendo imerso em Tissue-Tek (Miles, USA) e congelado em nitrogênio líquido, o lobo fixado foi encaminhado para processamento para ser examinado por microscopia óptica.

Cortes aleatórios do fígado foram coletados e fixados em líquido de Bouin e, após um período de cinco horas foram transferidos e mantidos em álcool a 70% até o momento do seu processamento histológico. Outros fragmentos do fígado foram digeridos em hidróxido de potássio para determinação do número de ovos presentes neste órgão (método de CHEEVER, 1970).

Cortes aleatórios de várias porções do intestino delgado foram coletados para fixação em formol Millonig, para processamento histológico. Outras porções foram criopreservadas em nitrogênio líquido e outras utilizadas para digestão em hidróxido de potássio para averiguação do número de ovos por grama de tecido.

4.4 MICROSCOPIA ÓPTICA

Fragmentos de fígado, intestino e pulmão colhidos aleatoriamente e fixados em formol a 10%, foram incluídos em parafina histológica e cortados em micrótomo, obtendo-se cortes com espessura de 5,0 micrômetros que foram corados pelos seguintes métodos: hematoxilina-eosina, orceína para fibras elásticas, picrosírius vermelho para fibras colágenas, reticulina de Gomori para impregnação argêntica de fibras reticulínicas e Alcian Blue em dois diferentes pHs: 2,0 e 7,0, para identificação de proteoglicanos ácidos e neutros, respectivamente.

4.5 DADOS PARASITOLÓGICOS

4.5.1 Contagem do número de vermes

Após sacrifício dos animais todo o mesentério foi analisado para verificação e detecção do número de vermes presentes. Os demais fragmentos do fígado foram esmagados manualmente com ajuda de placas de Petri com fundo negro visando a detecção de vermes, os quais foram em seguida contados e identificados quanto ao sexo com o auxílio de lupa Bausch & Lomb.

4.5.2 Contagem do número de ovos nos tecidos

O fígado e o intestino delgado foram pesados e as amostras de ambos foram retiradas, pesadas e digeridas em hidróxido de potássio a 4%. Em seguida alíquotas de 1ml foram coletadas procedendo-se à contagem dos ovos presentes em toda a lâmina. O resultado obtido foi extrapolado para o número de ovos por grama de tecido, de acordo com o método descrito por CHEEVER (1970).

4.6 IMUNOFLUORESCÊNCIA

Os fragmentos de fígado e intestino foram congelados imediatamente após o sacrifício em nitrogênio líquido e depois mantidos em frascos bem fechados em freezer a -70°C até o momento de serem cortados em criostato a -20°C em seções de 5-10 micrômetros de espessura. As lâminas assim obtidas foram posteriormente fixadas em acetona gelada por dez minutos e em seguida hidratadas em três banhos com PBS, pH 7.4, por cinco minutos cada. O bloqueio das reações inespecíficas foi realizado com o uso de condicionador de tecido (biomeda, Foster city, CA), sendo realizada posteriormente a marcação com os seguintes anticorpos primários: colágenos tipos I, III e IV, fibronectina e laminina a 37°C por 30' em câmara úmida. Os anticorpos para os diversos tipos de colágenos, laminina e fibronectina foram produzidos em coelhos no Instituto Pasteur em Lyon (França) sendo gentilmente cedidos pelo Dr. Jean Alexis-Grimaud. Após a marcação com os anticorpos primários as lâminas foram lavadas com PBS, adicionando-se posteriormente o anticorpo secundário anti-IgG de coelho (SIGMA) conjugado com isotiocianato de fluoresceína, diluído em azul de Evans, sendo as lâminas acondicionadas em câmara úmida a 37°C por 30'. Os cortes corados foram examinados em um microscópio Zeiss, Axioskop, com epiiluminação provida de lâmpadas HBO de vapor de mercúrio potência 50w, com os filtros de barreira e excitador apropriados para fluorescência. Uma máquina fotográfica esteve acoplada ao sistema com filme para slide de 400 asa com ajuste automático do tempo de exposição e velocidade.

4.7 DOSAGEM DE HIDROXIPROLINA

O teor de colágeno foi quantificado a partir da dosagem de hidroxiprolina realizada de acordo com o método de BERGMAN & LOXLEY (1963). Fragmentos com peso variável entre 100 a 250mg fixados em formol Millionig foram digeridos em 5ml de ácido clorídrico 6N a uma temperatura de 110°C em estufa por 18 horas. Após a digestão, acrescentado água

ao hidrolisado diluindo o ácido. O material foi filtrado e sedimentado. Foram coletados 2ml do sobrenadante de cada amostra, realizando-se posteriormente sua neutralização com solução de hidróxido de sódio a 10 M, foi utilizado a fenolftaleína como indicador de pH. Após neutralização as amostras tiveram o volume final ajustado para 4ml com água destilada. A etapa seguinte foi baseada no método colorimétrico quando alíquotas de 200µl das amostras foram coletadas e acrescidas de álcool isopropanol, promovendo-se em seguida oxidação com Cloramina T por 4 minutos.

Sob agitação constante em “vórtex” foi adicionado o reagente de Ehrlich’s seguido pela incubação das amostras em banho maria por 25 minutos. A leitura da densidade óptica foi realizada com o comprimento de onda de 558nm em espectrofotômetro Hitachi. Os dados coletados foram aplicados a um programa computadorizado que fornece a quantidade de hidroxiprolina em micromol por grama de tecido. Os níveis de hidroxiprolina foram correlacionados com a intensidade da infecção pelo número de ovos de *S. mansoni* presentes no fígado. Os resultados foram avaliados pela análise de covariância, utilizando o número de ovos do fígado como covariante. Um grupo com 4 animais não infectados foi usado como controle normal.

4.8 MORFOMETRIA

Examinamos secções randômicas de cortes do fígado através da análise morfométrica automática utilizando-se um Sistema Processador e Analisador de Imagens Leica Quantimet Q500MC (Leica Cambridge, Cambridge, England), segundo técnica já desenvolvida neste Centro e descrita na literatura (COUTINHO et al., 1997). Para os estudos morfométricos foram selecionados aleatoriamente nove campos microscópicos por lâmina de cada animal. O sistema foi calibrado para uma ampliação, com uma objetiva de 4x, utilizando-se microscópio Leica Microstar IV, compreendendo uma área seccional total medida de $17,01 \times 10^6 \mu\text{m}^2$ por órgão de cada animal. Todos os granulomas periovulares, confluentes ou não, foram

avaliados. Para efeito de cálculo estereológico consideraram-se os granulomas esquistosomóticos como estruturas esferóides, apresentando distribuição normal de tamanho.

Foram também analisados granulomas periovulares hepáticos isolados, sempre centrados por ovo maduro, cortado no seu maior diâmetro. Para este estudo morfométrico foram feitas as seguintes medidas diretas: área seccional e diâmetro ocupados pelos granulomas, levando-se em conta os parâmetros estabelecidos nos objetivos deste trabalho. Na seleção dos granulomas hepáticos isolados utilizamos o seguinte critério para exclusão: granulomas confluentes, no último estágio evolutivo de desenvolvimento da reação, com embrião não viável ou não visível no interior do ovo e os granulomas centrados por cascas de ovos.

Realizamos medidas morfométricas diretas dos granulomas confluentes presentes no fígado, pulmão e intestino, levando-se em conta os parâmetros acima descritos com relação ao tamanho do compartimento selecionado.

Os dados obtidos foram utilizados para o cálculo dos seguintes parâmetros morfométricos: volume dos granulomas, área seccional ocupada, densidade de volume dos granulomas e densidade numérica dos granulomas. O volume dos granulomas foi calculado usando-se a fórmula para cálculo do volume da esfera, que é: $V_e = \pi \cdot R^3$, onde R = raio do granuloma obtido através de medida direta.

A densidade de volume foi calculada pelo quociente da área total ocupada pelos granulomas, dividido pelo valor total da área seccional medida. Esse cálculo se baseia no somatório dos volumes de todos os granulomas presentes nas seções analisadas dividido pelo volume total da área estudada.

Fórmula: $V_v = \text{Somatório das áreas dos granulomas} / \text{Somatório da área seccional medida por animal}$.

O número de granulomas por unidade de volume do fígado, pulmão e intestino foi obtido através da aplicação da fórmula de Weibel, a qual se expressa com $N_n = 0,77 \times \sqrt{N^{1,5}}$

$V_v^{0.5}$), onde N= número de granulomas no compartimento estudado e V_v = Densidade de volume (WEIBEL, 1969).

Visando a quantificação do tecido conjuntivo hepático, os cortes histológicos de 5 micrômetros, corados pelo Picrosírius vermelho para detecção de colágeno (JUNQUEIRA et al., 1979), foram utilizados na avaliação do tecido fibroso. A área seccional do tecido corado em vermelho foi diretamente medida e calculada, como um percentual do total da área examinada. Os dados obtidos foram avaliados através de análises de variância.

4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os valores numéricos obtidos através da contagem de ovos por grama de tecido hepático, dosagem de hidroxiprolina e medidas morfométricas foram analisados estatisticamente através do uso de testes paramétricos. Análises de variância com um ou dois fatores (ANOVA) foram utilizados para identificação de diferenças significativas. Pós-testes tais como o teste de Student-Newman-Keuls e o teste t de Student foram aplicados para identificação de diferenças entre os grupos. Os resultados foram considerados significantes quando apresentaram $p < 0.05$. As análises foram realizadas com o auxílio do software Sigma Stat e SPSS.

5 RESULTADOS

5.1 DADOS PARASITOLÓGICOS

5.1.1 Recuperação de Vermes

O número médio de vermes obtidos por grupo de animais infectados com 50 cercárias de *S. mansoni* foi de 5 pares para os animais do grupo I - fase aguda, e 3 pares para os animais dos grupos II e III- fases intermediária e crônica da infecção. Grupos de animais infectados com o dobro do inóculo, 100 cercárias, apresentaram em média 9 e 10 pares de vermes, respectivamente.

5.1.2 Contagem do Número de Ovos por Grama de Tecido

O número médio de ovos de *S. mansoni*, calculado por grama de tecido digerido demonstrou diferenças significantes a depender do órgão e da fase da infecção (tabela 1).

Tabela 1. Comparação das médias do número de ovos encontrados por grama de tecido de acordo com órgão e fase da infecção nos animais infectados com 50 cercárias (ANOVA com dois fatores).

Fatores	Graus de Liberdade	F	p
Fase da infecção	2, 36	6,34	0,0044
Órgãos	1, 36	5,21	0,0285
Fase x Órgão	2, 36	0,69	0,5064

O fígado apresentou maior número de ovos por grama de tecido (14.713,2) que o intestino (8.450,9), sendo essa diferença significativa ($p < 0,05$). Também foram vistas diferenças entre as fases aguda e crônica bem como aguda e intermediária da infecção (tabela 1b). Não houve diferenças no número de ovos entre as fases intermediária e crônica.

Tabela 1b. Comparação do número de ovos por grama de tecido hepático e intestinal nas três fases estudadas em animais infectados com 50 cercárias (Teste de Student Newman-Keuls).

Comparações (fases)*	Diferenças entre as médias	Valor de q	p<0,05
Aguda x Crônica	10998.4	4,63	sim
Aguda x Intermediária	9586.5	4,03	sim
Intermediária x Crônica	1.411,9	0,59	não

* Valor médio das fases: aguda=4.720,4 ovos/grama de tecido; intermediária=14.306,9 ovos/grama de tecido e crônica=15.718,8 ovos/grama de tecido.

5.2 ACHADOS HISTOLÓGICOS

5.2.1 Animais do Grupo I - Fase Aguda

5.2.1.1 Fígado

A análise de cortes histológicos do fígado nesta fase demonstrou grande quantidade de reações granulomatosas nos estágios exsudativo e exsudativo produtivo. Os granulomas recentes contendo ovos maduros muitas vezes são pseudo-granulomas, formados pelo acúmulo focal predominante de eosinófilos (prancha 1, figura A). Apresentam contornos periféricos irregulares, com halo celular constituído predominantemente por mononucleares no centro do granuloma e polimorfonucleares, eosinófilos e neutrófilos, na periferia. As fibras colágenas são escassas, apresentam disposição concêntrica na região periovular, adotando um arranjo frouxo, irregular, por quase toda a extensão da reação (prancha 1, figura D). Os filamentos mais delgados formam finas ramificações que se dispunham de maneira radiada do centro para a periferia. As secções impregnadas pela prata demonstram fibras reticulínicas formando uma discreta rede irregular em torno do ovo do *S. mansoni*.

A pesquisa para proteoglicanos ácidos e neutros (Alcian Blue pH 2,0 e 7,0 respectivamente) destacou a presença desses elementos em toda a extensão da reação granulomatosa, aparecendo como um material amorfo, corado tenuamente em azul e assumindo uma tonalidade mais intensa daquela do resto do parênquima hepático. A

coloração azul se intensificava no interior dos ovos (miracídio) e na sua vizinhança imediata, sendo um pouco mais intenso quando se usou o pH 7,0. As fibras elásticas estiveram ausentes no interior dos granulomas, exceto por alguns filamentos ou fragmentos, que apareciam corados e que provavelmente representavam restos da parede vascular. No entanto, foi possível identificar finos e pequenos filamentos na periferia da reação granulomatosa, ainda aqui relacionados com a destruição de vasos que sofreram desorganização em decorrência da ação dos ovos.

Em todos os estágios estudados verificamos em algumas regiões do fígado a presença de pigmentos enegrecidos próximos às células sinusoidais e reações inflamatórias inespecíficas, representadas por grupamentos de mono e polimorfonucleares, localizados nos espaços porta. Em ramos da veia porta por vezes eram observadas secções de vermes adultos intactos.

As características histológicas acima descritas foram comuns aos dois grupos de animais estudados na fase aguda (com 50 e 100 cercárias, respectivamente), devendo-se ressaltar, apenas o maior número de granulomas observados nos animais com maior carga parasitária.

5.2.1.2 Intestino

Os granulomas periovulares formados no intestino apareceram pequenos, bem delimitados, mesmo na fase aguda. Apenas alguns poucos exibiram componente exudativo ou exudativo-produtivo, diferindo nitidamente das reações encontradas no fígado, em decorrência não somente ao tipo de reação granulomatosa predominante mas também pelo tamanho da reação periovular (prancha 3, figura A). Esses elementos situavam-se principalmente na mucosa e submucosa, sendo encontrados alguns nas camadas musculares e raros na serosa. Os granulomas multiovulares foram encontrados com relativa freqüência a

este nível. Alguns granulomas eram constituídos por pequeno agrupamento de macrófagos e polimorfonucleares. Estes granulomas pequenos, pouco reativos, bem como alguns ovos maduros sem reação em torno, estavam localizados principalmente na mucosa, com poucos na submucosa.

Na coloração pelo sítius vermelho, os granulomas intestinais também demonstraram menor quantidade de fibras colágenas quando comparados aos granulomas hepáticos (prancha 3, figura B) Essas fibras seguiam o mesmo padrão das fibras reticulínicas sendo sua quantidade variável a depender da localização dos mesmos. Granulomas situados na submucosa apresentavam maior quantidade de fibras colágenas em relação aos granulomas vistos nas demais camadas do intestino. Ainda menor deposição de fibras foi registrado nos granulomas da camada serosa.

As fibras reticulínicas foram escassas ao nível do intestino localizando-se na periferia da reação periovular, estando em menor proporção que as observadas nos granulomas hepáticos, este padrão foi visto em quase todos os granulomas, com poucas variações (prancha 3, figura C).

Uma outra característica marcante nos granulomas intestinais foi a presença de proteoglicanos neutros e ácidos que tendiam a ser menos intensos que nos granulomas hepáticos (dados não demonstrados). Os granulomas apresentaram coloração azul similar ao do tecido conjuntivo adjacente, com discreto aumento da tonalidade na periferia do ovo. Achados a respeito de fibras elásticas foram similares aos encontrados no fígado. O padrão das reações granulomatosas nessa fase foram similares nos grupos com inóculos diferentes (100 e 50 cercárias).

5.2.1.3 Pulmão

Várias secções de pulmão obtidas de camundongos infectados com 50 cercárias não continham ovos de *S. mansoni*, exceto em três animais. Já a infecção com 100 cercárias, garantiu o estudo dessas reações no parênquima pulmonar. Nos demais órgãos, embora aparecesse uma quantidade maior de ovos, o padrão geral das reações não se modificou com a maior carga parasitária presente.

De um modo geral, os granulomas formados eram basicamente exsudativos compostos pelo adensamento de células inflamatórias representadas principalmente por grande quantidade de polimorfonucleares eosinófilos e alguns linfócitos, macrófagos e plasmócitos (prancha 2, figura A). As reações localizaram-se principalmente nas proximidades de vasos, estando a sua maioria isolados nas paredes alveolares.

As fibras reticulínicas apresentaram um padrão regular de distribuição sob a forma de finos filamentos situados na periferia dos granulomas periovulares, constituindo uma fina rede de fibras dispostas concentricamente, muito similar à sua distribuição no intestino (prancha 2, figura B). As fibras colágenas coradas pelo sírius-vermelho, foram escassas, diferindo de sua distribuição nos granulomas periovulares hepáticos e intestinais (prancha 2, figura C). Estas últimas se colocavam sob a forma de um halo discreto, composto por finos e discretos filamentos situados no interior da reação. A quantidade de proteoglicanos ácidos e neutros foi homogênea, com maior deposição na periferia dos ovos do *S. mansoni*, muito similar ao encontrado no intestino (prancha 4, figuras C e D). Diferente dos granulomas periovulares hepáticos e intestinais, traços de fibras elásticas foram vistos freqüentemente na periferia dos granulomas periovulares, entretanto, devido à grande quantidade de capilares presente nos septos alveolares e de fibras elásticas da própria estrutura da parede alveolar, esse achado não pode ser visto como gerado pela reação granulomatosa pulmonar (prancha 2, figura D).

5.2.2 Animais do Grupo II - Fase Intermediária

5.2.2.1 Fígado

Granulomas hepáticos neste estágio da infecção apresentaram diferenças marcantes quando comparados aos granulomas da fase aguda (prancha 1, figura B). Foi observado grande quantidade de reações confluentes em vários graus de desenvolvimento. Muitos granulomas se encontravam no estágio exsudativo produtivo e produtivo, ao lado de reações cicatriciais, contendo ovos calcificados. Os granulomas periovulares formados em torno de ovos maduros eram menores e mais circunscritos que os vistos na fase aguda. Estes, por sua vez, continham limites bem nítidos, com redução da população de polimorfonucleares.

Muitos ovos apareciam concentrados nos espaços porta, deixando o parênquima relativamente poupado. A fibrose (intra e inter-granulomatosa) contribuía para a expansão dos espaços porta, formando um quadro remissente da fibrose “pipestem” do homem.

Diferente de sua distribuição na fase aguda, as fibras reticulínicas e colágenas formavam um arranjo denso e compacto em torno dos ovos (prancha 4, figura A), nos granulomas confluentes elas se tornavam ainda mais espessas. Os proteoglicanos ácidos e neutros apresentaram o mesmo padrão de distribuição descrito anteriormente, entretanto verificamos que proteoglicanos neutros denotaram uma coloração mais intensa que os proteoglicanos ácidos. Os achados com relação às fibras elásticas permaneceram os mesmos registrados para a fase aguda.

5.2.2.2 Intestino

Diferindo principalmente dos granulomas hepáticos, os granulomas intestinais não apresentaram variações entre si e com aqueles da fase aguda (dados não demonstrados). Foram detectados apenas maior número de reações granulomatosas contendo ovos confluentes e ovos calcificados. Houve também aumento do número de granulomas presentes nas camadas muscular e serosa, levando algumas vezes à desestruturação destas camadas. Os

elementos da matriz extracelular pesquisados nas colorações histológicas não apresentaram diferenças marcantes em relação à fase anterior.

5.2.2.3 Pulmão

Os granulomas periovulares observados apresentaram padrões histológicos similares aos descritos anteriormente, com comportamento similar aos granulomas intestinais. As reações granulomatosas contendo ovos calcificados também foram vistas nesse órgão. Os elementos da matriz mantiveram o mesmo padrão de organização descrito anteriormente. Um achado interessante foi a detecção de um discreto espessamento dos septos alveolares em animais que apresentavam maior número de ovos, bem como agregações de células mononucleares nos tecidos intersticiais e peribrônquicos.

5.2.3 Animais do Grupo III - Fase Crônica

5.2.3.1 Fígado

A reação granulomatosa periovular aos ovos maduros foi caracterizado por ser ainda mais circunscrita que as encontradas na fase intermediária das 16 semanas (prancha 1, figura C). Houve maior predomínio de granulomas produtivos e involutivos. Os granulomas produtivos apresentaram macrófagos epitelióides, células gigantes e poucos polimorfonucleares. A presença de células contendo pigmento enegrecido foi um achado constante no interior dessas reações. As fibras colágenas apresentaram-se mais espessas e compactas, delimitando com nitidez a área do granuloma periovular. No parênquima hepático foi verificado a presença de depósitos de fibras colágenas nas áreas de granulomas confluentes. Quanto maior o inoculo, maior o número de granulomas confluentes e, conseqüentemente, mais evidente a deposição de fibras colágenas.

Os proteoglicanos ácidos e neutros apresentaram padrões similares aos vistos anteriormente, ambos foram limitados às regiões de deposição das fibras colágenas. Os cortes

histológicos corados pela orceína apresentaram marcação para fibras elásticas no interior da reação granulomatosa em três animais da fase crônica (prancha 4, figura B). Estas fibras se localizaram no interior da reação granulomatosa periovular, dispostas concentricamente, com padrão semelhante aos das fibras colágenas. Essas últimas, apresentaram coloração marrom escura pela orceína e se faziam presentes na maioria das reações, com maior deposição nos granulomas cicatriciais.

5.2.3.2. Intestino

As secções de intestino nesta fase, diferenciaram-se das vistas anteriormente neste órgão, apenas pelo maior número de reações granulomatosas. Os granulomas se encontravam nos estágios exsudativos e involutivos, com ovos calcificados, muitos desses localizados na submucosa. Em secções de jejuno foram vistos muitos granulomas nas camadas muscular e serosa. A deposição de elementos da matriz permaneceu inalterada.

5.2.3.3. Pulmão

Animais infectados com 50 cercárias na 22^a semana pós-infecção apresentaram maior número de reações granulomatosas sem qualquer alteração histológica com relação aos achados vistos anteriormente.

5.3 HIDROXIPROLINA

Os resultados obtidos com a dosagem de hidroxiprolina em fígado de camundongos infectados com 50 cercárias não apresentaram diferença significativa entre as fases: aguda 6,90 $\mu\text{mol/g}$ de tecido, intermediária 7,84 $\mu\text{mol/g}$ de tecido e crônica 8,77 $\mu\text{mol/g}$ de tecido ($p = 0,338$). Entretanto, diferiram significativamente do teor de hidroxiprolina presente nos camundongos normais (3,42 $\mu\text{mol/g}$ de tecido). Os valores de hidroxiprolina foram correlacionados ao número de ovos por grama de tecido para verificação de possível

associação entre esses elementos (gráficos 1, 2 e 3) sendo visto, que apenas na fase aguda da infecção encontramos correlação positiva entre teor de hidroxiprolina e número de ovos no fígado.

Gráfico 1. Correlação entre o número de ovos no fígado e o teor de hidroxiprolina na fase aguda

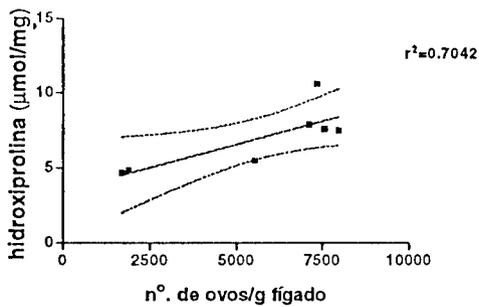


Gráfico 2. Correlação entre o número de ovos no fígado e o teor de hidroxiprolina na fase intermediária

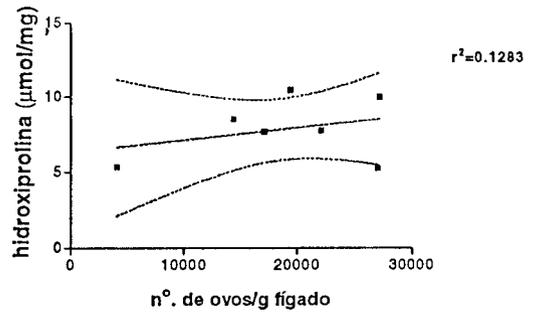
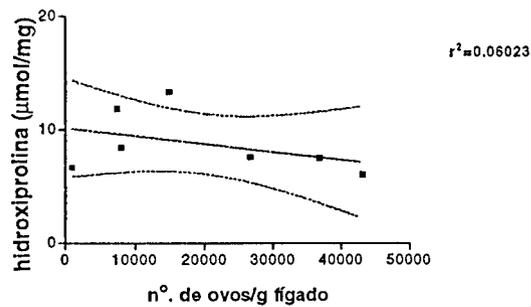


Gráfico 3. Correlação entre o número de ovos no fígado e o teor de hidroxiprolina na fase crônica



5.4 IMUNOFLUORESCÊNCIA

• Fígado - Fase Aguda

Colágeno Tipo I

O granuloma hepático na fase aguda marcado pelo colágeno tipo I apresentou uma marcação de tonalidade verde maçã que ocupou toda a extensão da reação de forma difusa, irregular, delimitada por células do parênquima hepático (prancha 5, figura A).

Colágeno tipo III

O colágeno tipo III esteve presente em quantidade expressiva nos granulomas hepáticos nas fases aguda e intermediária, estando depositado de forma frouxa semelhante a uma rede em toda a extensão da reação (prancha 6, figura F)

Colágeno tipo IV

O colágeno tipo IV esteve ausente no interior da reação granulomas hepática nas três fases estudadas (prancha 5, figura C; prancha 6 figura B e prancha 7, figura F). Sua localização esteve limitada à parede de vasos sanguíneos neoformados situados na periferia da reação granulomatosa e nos sinusóides.

Fibronectina

A fibronectina foi abundante nos granulomas hepáticos presentes na fase aguda, apresentando uma distribuição regular em todo o espaço da lesão (prancha 5, figura D).

Laminina

A laminina como glicoproteína associada ao colágeno IV apresentou distribuição semelhante a este, estando presente apenas na parede de vasos neoformados na periferia dos granulomas hepáticos e parede de sinusóides em todas as fases estudadas (prancha 5, figura E e prancha 7, figura C).

- **Fígado - Fases Intermediária e Crônica**

Colágeno tipo I

No decorrer da infecção houve uma redução gradual da área ocupada por esse tipo de colágeno, em correlação direta do processo imunomodulatório. As fibras colágenas se tornaram mais densas, compactas e organizadas (prancha 6, figura C). Esse padrão foi característico das fases intermediária e crônica, variando apenas no grau de condensação das fibras.

Colágeno tipo III

Houve redução gradual da área ocupada pelo colágeno tipo III nos granulomas hepáticos em decorrência da modulação da reação granulomatosa e maior condensação das fibras. A intensa fluorescência apresentada pelo anticorpo utilizado não permitiu uma avaliação quantitativa desse componente entre as fases pesquisadas.

Fibronectina

Nas fases subseqüentes houve uma redução lenta e gradual da fibronectina com relação a marcação obtida na fase aguda (prancha 6, figura D e prancha 7, figura D).

- **Intestino - Fases Aguda, Intermediária e Crônica**

Os componentes da matriz extracelular presentes nas reações granulomatosas intestinais não apresentaram alterações na sua distribuição durante a cronicidade da infecção. Os elementos estudados apresentavam uma distribuição contínua com o tecido conjuntivo subjacente ou se depositavam de forma concêntrica na periferia do ovo.

Colágeno tipo I

No intestino, o colágeno tipo I apresentou uma distribuição regular em todas as fases estudadas localizando-se principalmente na periferia da reação granulomatosa, formando um anel compacto e delgado em torno da reação (prancha 5, figura B e prancha 6, figura E).

Colágeno tipo III

Houve intensa fluorescência para colágeno tipo III no intestino o que dificultou o seu estudo.

Colágeno tipo IV

No intestino o colágeno tipo IV estava situado na parede de vasos e nas lâminas basais das criptas de Lieberkühn (prancha 7, figura E).

Fibronectina

Nos granulomas intestinais não houve alteração no padrão de distribuição da fibronectina, esta por sua vez esteve presente na região periovular em continuidade com o tecido adjacente (prancha 7, figura A).

Laminina

A laminina esteve presente na lâmina basal de glândulas, parede de vasos e camada muscular do intestino, sendo ausente no interior da reação granulomatosa (prancha 5, figura F, prancha 6, figura A e prancha 7, figura B).

• Pulmão

Devido a estrutura esponjosa do pulmão não foi possível a obtenção de cortes congelados para imunofluorescência. Com essa limitação, tentamos utilizar cortes parafenizados para esta técnica mas o processamento do tecido dificultou a exposição dos epitopos comprometendo a marcação dos componentes pesquisados.

5.5 MORFOMETRIA

5.4.1 Fibrose

O espaço ocupado pela fibrose no fígado foi avaliado morfometricamente através da medida direta de fibras colágenas coradas pelo sítius vermelho em relação à área seccional total examinada. Os dados coletados foram analisados estatisticamente. Um grupo controle de

animais não infectados foi utilizado como parâmetro da quantidade de matriz extracelular normalmente encontrada no fígado desses animais. Os resultados obtidos demonstraram diferenças significantes no aumento da matriz extracelular entre os animais normais e os animais infectados pelo *S. mansoni*. Entretanto, não houve diferenças nas fases da infecção estudadas.

Tabela 2. Área seccional ocupada por tecido fibroso corado pelo sítius vermelho medida morfometricamente.

Fases da infecção	Médias das áreas seccionais ocupada por tecido fibroso
Não infectado	$2,53 \times 10^4 \mu\text{m}^2$
Aguda	$15,87 \times 10^4 \mu\text{m}^2$
Intermediária	$16,06 \times 10^4 \mu\text{m}^2$
Crônica	$24,62 \times 10^4 \mu\text{m}^2$

5.4.2 Medidas morfométricas dos granulomas

Volume

Através de análise morfométrica, foi possível verificar diferenças significantes nas médias dos volumes encontrados nos granulomas periovulares em decorrência do órgão e período da infecção, sendo possível verificar interação entre esses dois fatores nos animais infectados com 50 cercárias (tabela 3).

Tabela 3. Comparação do volume dos granulomas periovulares de acordo com o órgão e período da infecção nos animais infectados com 50 cercárias (ANOVA com dois fatores).

Fatores	Graus de Liberdade	F	p
Fase da infecção	2,54	44,57	<0,0001
Órgãos	2,54	9,52	0,0003
Fase x Órgão	4,54	10,43	<0,0001

O volume dos granulomas periovulares sofreram reduções significantes entre as fases aguda e crônica bem como nas fases intermediária e crônica. Entretanto não foram vistas diferenças entre as fases aguda e intermediária (tabela 3a).

Tabela 3a. Comparação entre o volume dos granulomas periovulares nas três fases estudadas nos animais infectados com 50 cercárias (Teste de Student Newman-Keuls).

Comparações (fases)*	Diferenças entre as médias	Valor de q	p<0,05
Aguda x Crônica	129,4	6,16	sim
Aguda x Intermediária	59,4	2,83	não
Intermediária x Crônica	70,0	3,34	sim

* Valor médio do volume dos granulomas por fase: aguda= $174,0 \times 10^4 \mu\text{m}^3$; intermediária= $114,7 \times 10^4 \mu\text{m}^3$ e crônica= $44,6 \times 10^4 \mu\text{m}^3$

Com relação ao volume e local da reação, verificamos que os granulomas hepáticos apresentaram maior volume que os granulomas pulmonares e intestinais nos animais estudados (tabela 3b). Não havendo diferenças significantes entre os dois órgãos (pulmão e intestino) (tabela 3c).

Tabela 3b Valor médio do volume dos granulomas periovulares no pulmão, fígado e intestino nas três fases da infecção nos animais infectados com 50 cercárias.

Órgãos	Período da infecção x $10^4 \mu\text{m}^3$		
	8 semanas	16 semanas	22 semanas
Pulmão	$17,62 \pm 27,62$	$44,28 \pm 43,23$	$32,56 \pm 39,19$
Fígado	$481,53 \pm 161,51$	$252,98 \pm 227,66$	$84,32 \pm 26,22$
Intestino	$22,96 \pm 15,13$	$46,71 \pm 17,13$	$16,96 \pm 4,49$

Tabela 3c. Comparação entre as médias dos volumes dos granulomas do pulmão, fígado e intestino nas fase aguda, intermediária e crônica nos animais infectados com 50 cercárias (Teste de Student-Newman-Keuls).

Comparações(Órgão)*	Diferenças entre as médias	Valor de q	p< 0,05
Pulmão x Intestino	2,61	0,12	não
Pulmão x Fígado	241,46	11,50	sim
Fígado x Intestino	244,07	11,62	sim

Médias: pulmão= $31,5 \times 10^4 \mu\text{m}^3$; fígado= $272,9 \times 10^4 \mu\text{m}^3$ e intestino= $28,9 \times 10^4 \mu\text{m}^3$.

Quando verificamos as correlações existentes entre órgão e fase da infecção observamos que os granulomas hepáticos apresentaram maior volume na fase aguda e estes foram maiores que os granulomas pulmonares e intestinais presentes nas três fases do experimento (tabela 3d). Os granulomas hepáticos na fase intermediária ainda continham maior volume que os granulomas estudados nos demais órgãos, contudo, os granulomas hepáticos na fase crônica não diferiram dos granulomas intestinais (tabela 3d).

Tabela 3d. Possíveis associações existentes entre o volume dos granulomas nos três órgãos estudados nas fases aguda, intermediária e crônica em animais infectados com 50 cercárias (Teste de Student Newman Keuls).

Comparações (Órgãos x Fases)*	Diferenças entre as médias	Valor de q	p< 0,05
Fígado(FA)x Intestino(FC)	464,57	12,76	sim
Fígado(FA)x Pulmão(FA)	463,91	12,76	sim
Fígado(FA)x Intestino(FA)	458,58	12,61	sim
Fígado(FA)x Pulmão (FC)	448,98	12,35	sim
Fígado(FA) x Pulmão(FI)	437,25	12,02	sim
Fígado(FA) x Intestino(FI)	434,82	11,96	sim
Fígado(FA) x Fígado(FC)	397,21	10,92	sim
Fígado(FA) x Fígado(FI)	228,56	6,28	sim
Fígado(FI) x Intestino(FC)	236,01	6,49	sim
Fígado(FI) x Pulmão(FA)	235,35	6,47	sim
Fígado(FI) x Intestino(FA)	230,02	6,32	sim
Fígado(FI) x Pulmão (FC)	220,42	6,06	sim
Fígado(FI) x Pulmão(FI)	208,69	5,74	sim
Fígado(FI) x Intestino(FI)	206,27	5,67	sim
Fígado(FI) x Fígado(FC)	168,66	4,64	sim
Fígado(FC)x Intestino(FC)	67,36	1,85	não

* FA= fase aguda; FI= fase intermediária e FC = fase crônica.

Em animais infectados com o dobro de cercárias, diferenças significantes foram encontradas no volume dos granulomas periovulares a depender do órgão, muito embora, não foram vistas diferenças entre o volume dos granulomas nas fases aguda e intermediária (tabela 4).

Tabela 4. Comparação do volume dos granulomas periovulares de acordo com o órgão onde estes se localizavam e período da infecção nos animais infectados com 100 cercárias (ANOVA com dois fatores).

Fatores	Graus de Liberdade	F	p
Fase da infecção	1, 24	0,419	0,52
Órgão	2, 24	15,87	<0,0001
Fase x Órgão	2, 24	0,100	0,90

O volume dos granulomas periovulares não apresentaram diferenças significantes entre as fases aguda e intermediária neste subgrupo. Dado similar ao encontrado

nos animais infectados com menor carga parasitária (tabela 4a).

Tabela 4a. Comparação entre o volume dos granulomas periovulares nas fases aguda e intermediária nos animais infectados com 100 cercárias (ANOVA com um fator).

Comparações (fases)*	Diferenças entre as médias	Valor de q	p<0,05
Aguda x Intermediária	38,6	0,915	não

* Valor médio do volume dos granulomas por fase: aguda= $0,0686 \times 10^4 \mu\text{m}^3$ e intermediária= $0,0755 \times 10^4 \mu\text{m}^3$

Da mesma forma que o subgrupo anterior, os granulomas hepáticos nos animais infectados com 100 cercárias apresentaram maior volume que os granulomas pulmonares e intestinais (tabelas 4b e 4c).

Tabela 4b Valor médio do volume dos granulomas periovulares no pulmão, fígado e intestino nas três fases da infecção nos animais infectados com 100 cercárias.

Órgãos	Período da infecção	
	8 semanas	16 semanas
Pulmão	$9,11 \pm 12,00$	$63,65 \pm 57,90$
Fígado	$358,33 \pm 110,48$	$418 \pm 378,98$
Intestino	$27,60 \pm 13,18$	$28,57 \pm 21,45$

Tabela 4c. Comparações entre as médias dos volume dos granulomas do pulmão, fígado e intestino nos animais infectados com 100 cercárias (ANOVA com um fator).

Comparações(Órgão)*	Diferenças entre as médias	Valor de q	p< 0,05
Pulmão x Intestino	8,29	0,161	não
Pulmão x Fígado	352,08	6,816	sim
Fígado x Intestino	360,36	6,979	sim

*Valor médio do volume dos granulomas por órgão: pulmão= $36,37 \times 10^4 \mu\text{m}^3$; fígado= $388,45 \times 10^4 \mu\text{m}^3$ e intestino= $28,09 \mu\text{m}^3$.

Os granulomas hepáticos presentes nas fases aguda e intermediária continham maior volume que os granulomas presentes nos demais órgãos. Os granulomas hepáticos e

pulmonares não apresentaram diferenças no volume entre as fases aguda e intermediária (tabela 4 d).

Tabela 4d. Possíveis associações existentes entre o volume dos granulomas em três órgãos nas fases aguda e intermediária nos animais infectados com 100 cercárias (Teste de Student Newman Keuls).

Comparações (Órgãos x Fases)*	Diferenças entre as médias	Valor de q	p < 0,05
Fígado(FI) x Pulmão(FA)	409,47	5,61	sim
Fígado(FI)x Intestino(FA)	390,97	5,35	sim
Fígado(FI) x Intestino(FI)	390,00	5,34	sim
Fígado(FI) x Pulmão(FI)	354,93	4,86	sim
Fígado(FI) x Fígado(FA)	60,24	0,82	não
Fígado(FA)x Pulmão(FA)	349,22	4,78	sim
Fígado(FA)x Intestino(FA)	330,73	4,53	sim
Fígado(FA) x Intestino(FI)	329,76	4,52	sim
Fígado(FA) x Pulmão(FI)	294,68	4,036	sim
Pulmão(FI) x Pulmão(FA)	54,54	0,75	não

* FA = fase aguda; FI= fase intermediária.

Área Seccional

A área seccional ocupada pelos granulomas periovulares nos animais infectados com 50 cercárias foi influenciada pelo sítio onde entes se localizavam e fase da infecção, havendo ainda interação entre esses fatores (tabela 5).

Tabela 5. Relação entre área seccional ocupada pelos granulomas periovulares de acordo com órgão e período da infecção nos animais infectados com 50 cercárias (ANOVA com dois fatores).

Fatores	Graus de Liberdade	F	p
Fase da infecção	2, 54	5,13	0,0091
Órgão	2, 54	40,88	<0,0001
Fase x Órgão	4, 54	6,29	0,0003

Diferenças significantes foram vistas entre as fases aguda e crônica bem como intermediária e crônica da infecção, sem qualquer diferença entre as fases aguda e

intermediária (tabela 5a).

Tabela 5a. Comparação entre as médias das áreas seccionais ocupadas pelos granulomas nas três fases estudadas nos animais infectados com 50 cercárias (Teste de Student Newman Keuls).

Comparações (fases)*	Diferenças entre as médias	Valor de q	p<0,05
Aguda x Crônica	25,76	4,31	sim
Aguda x Intermediária	5,56	0,93	não
Intermediária x Crônica	20,20	3,38	sim

* Valor médio da área dos granulomas por fase: aguda= $49,0 \times 10^3 \mu\text{m}^2$; intermediária= $43,4 \times 10^3 \mu\text{m}^2$ e crônica= $23,2 \times 10^3 \mu\text{m}^2$

Os granulomas hepáticos demonstraram maior área seccional que os granulomas presentes nos demais órgãos, não havendo diferenças significantes entre as áreas ocupadas pelos granulomas pulmonares e intestinais (tabelas 5b e 5c).

Tabela 5b. Valor médio da área seccional ocupada pelos granulomas periovulares no pulmão, fígado e intestino nas três fases da infecção nos animais infectados com 50 cercárias.

Órgãos	Período da infecção x $10^3 \mu\text{m}^2$		
	8 semanas	16 semanas	22 semanas
Pulmão	$6,75 \pm 9,33$	$17,48 \pm 17,17$	$17,43 \pm 20,19$
Fígado	$123,40 \pm 56,02$	$86,07 \pm 49,06$	$38,32 \pm 17,34$
Intestino	$16,79 \pm 8,07$	$26,71 \pm 7,57$	$13,92 \pm 2,32$

Tabela 5c. Comparação entre as médias das áreas seccionais ocupadas pelos granulomas do pulmão, fígado e intestino nas fase aguda, intermediária e crônica nos animais infectados com 50 cercárias (Teste de Student Newman-Keuls).

Comparações(Órgão)*	Diferenças entre as médias	Valor de q	p< 0,05
Pulmão x Intestino	5,25	0,88	não
Pulmão x Fígado	68,71	11,49	sim
Fígado x Intestino	63,46	10,61	sim

Médias: pulmão= $13,9 \times 10^3 \mu\text{m}^2$; fígado= $82,6 \times 10^3 \mu\text{m}^2$ e intestino= $19,1 \times 10^3 \mu\text{m}^2$.

Os granulomas hepáticos na fase aguda ocuparam maior área seccional que granulomas presentes nas fases subseqüentes. Estes granulomas também apresentaram diferenças com relação aos granulomas pulmonares e intestinais nos três estágios da infecção. Na fase intermediária, os granulomas hepáticos ainda demonstraram maior área seccional que os granulomas intestinais e pulmonares. Entretanto, na fase crônica, esses granulomas ocuparam uma área similar à ocupada pelos granulomas pulmonares na fase aguda (tabela 5d).

Tabela 5d. Possíveis associações existentes entre a área seccional ocupada pelos granulomas nos três órgãos estudados nas fases aguda, intermediária e crônica nos animais infectados com 50 cercárias (Teste de Student Newman-Keuls).

Comparações (Órgãos x Fases)*	Diferenças entre as médias	Valor de q	p< 0,05
Fígado(FA)x Pulmão(FA)	116,66	11,26	sim
Fígado(FA)x Intestino(FC)	109,48	10,57	sim
Fígado(FA)x Intestino(FA)	106,62	10,29	sim
Fígado(FA)x Pulmão(FC)	105,97	10,23	sim
Fígado(FA) x Pulmão(FI)	105,92	10,22	sim
Fígado(FA) x Intestino(FI)	96,70	9,33	sim
Fígado(FA) x Fígado(FC)	85,08	8,21	sim
Fígado(FA) x Fígado(FI)	37,32	3,60	sim
Fígado(FI) x Pulmão(FA)	79,33	7,66	sim
Fígado(FI) x Intestino(FC)	72,15	6,96	sim
Fígado(FI) x Intestino(FA)	69,29	6,69	sim
Fígado(FI) x Pulmão (FC)	68,64	6,62	sim
Fígado(FI) x Pulmão(FI)	68,59	6,62	sim
Fígado(FI) x Intestino(FI)	59,37	5,73	sim
Fígado(FI) x Fígado(FC)	47,75	4,61	sim
Fígado(FC) x Pulmão(FA)	31,57	3,05	não

* FA= fase aguda; FI= fase intermediária e FC = fase crônica.

Nos animais infectados com 100 cercárias a área seccional ocupada pelos granulomas não foi influenciada pela fase da infecção (tabela 6).

Tabela 6. Relação entre área seccional ocupada pelos granulomas periovulares de acordo com órgão e período da infecção nos animais infectados com 100 cercárias (ANOVA com dois fatores).

Fatores	Graus de Liberdade	F	p
Fase da infecção	1, 24	0,42	0,5237
Órgão	2, 24	15,872	<0,0001
Fase x Órgão	2, 24	0,100	0,9050

Não foram detectadas diferenças entre as médias da área seccional ocupada pelos granulomas entre as fases aguda e intermediária da doença nesse subgrupo (tabela 6a).

Tabela 6a. Comparação entre as médias das áreas seccionais ocupadas pelos granulomas nas três fases estudadas nos animais infectados com 100 cercárias (ANOVA com um fator).

Comparações (fases)*	Diferenças entre as médias	Valor de q	p<0,05
Aguda x Intermediária	6,06	0,69	não

A área seccional ocupada pelos granulomas pulmonares e intestinais foi menor que os granulomas hepáticos (tabela 6b), sendo essas diferenças significantes (tabela 6c). Também nesse subgrupo não houve diferenças entre a área ocupada pelos granulomas pulmonares e intestinais (tabela 6c).

Tabela 6b. Valor médio da área seccional ocupada pelos granulomas periovulares no pulmão, fígado e intestino nas duas fases da infecção nos animais infectados com 100 cercárias.

Órgãos	Período da infecção x $10^3 \mu\text{m}^2$	
	8 semanas	16 semanas
Pulmão	4,17 ± 5,01	28,59 ± 28,36
Fígado	120,07 ± 42,91	77,66 ± 64,28
Intestino	17,25 ± 5,90	17,06 ± 6,55

Tabela 6c. Comparação entre as médias de áreas ocupadas pelos granulomas do pulmão, fígado e intestino nas fase aguda e intermediária nos animais infectados com 100 cercárias (Teste de Student Newman-Keuls).

Comparações(Órgão)*	Diferenças entre as médias	Valor de q	p< 0,05
Pulmão x Intestino	0,775	0,0724	não
Pulmão x Fígado	82,48	7,70	sim
Fígado x Intestino	81,71	7,63	sim

* Valor médio por órgão: pulmão = $16,4 \times 10^3 \mu\text{m}^2$, fígado = $98,9 \times 10^3 \mu\text{m}^2$ e intestino = $17,2 \times 10^3 \mu\text{m}^2$

Os granulomas hepáticos na fase aguda apresentaram maior área seccional que os granulomas presentes nos demais órgãos nas fases estudadas, entretanto não houve diferença entre os granulomas presentes nas fases aguda e intermediária (tabela 6c). Também não houve diferenças entre os granulomas pulmonares nas duas fases estudadas (tabela 6c).

Tabela 6c. Possíveis associações existentes entre a área ocupada pelos granulomas nos três órgãos estudados nas fases aguda e intermediária nos animais infectados com 100 cercárias (Teste de Student Newman-Keuls).

Comparações (Órgãos x Fases)*	Diferenças entre as médias	Valor de q	p< 0,05
Fígado(FA) x Pulmão(FA)	115,9	7,65	sim
Fígado(FA) x Intestino(FI)	103,01	6,80	sim
Fígado(FA) x Intestino(FA)	102,81	6,79	sim
Fígado(FA) x Pulmão(FI)	91,47	6,04	sim
Fígado(FA) x Fígado(FI)	42,40	2,80	não
Fígado(FI) x Pulmão(FA)	73,49	4,85	sim
Fígado(FI) x Intestino(FI)	60,60	4,00	sim
Fígado(FI) x Intestino(FA)	60,41	3,99	sim
Fígado(FI) x Pulmão(FI)	49,06	3,23	sim
Pulmão(FI) x Pulmão(FA)	24,42	1,61	não

* FA= fase aguda e FI= fase intermediária

Densidade de Volume (Vv)

A densidade de volume (Vv) apresentou resultados similares ao volume dos granulomas demonstrando uma associação direta entre eses parâmetros. Este índice foi

influenciado pelo local e fase da infecção onde os granulomas se localizavam nos animais infectados com 50 cercárias (tabela 7).

Tabela 7. Relação entre a densidade de volume (Vv) dos granulomas periovulares de acordo com órgão e período da infecção nos animais infectados com 50 cercárias (ANOVA com dois fatores).

Fatores	Graus de Liberdade	F	p
Fase da infecção	2, 54	7,71	0,0011
Órgão	2, 54	69,11	<0,0001
Fase x Órgão	4, 54	10,47	<0,0001

Quando avaliamos a influência da fase da infecção sobre a densidade de volume obtivemos os mesmos resultados encontrados para o volume, ou seja, não houve diferença entre as fases aguda e intermediária neste subgrupo (tabela 7a).

Tabela 7a. Comparações dos índices de densidade de volume (Vv) dos granulomas presentes nas fases aguda, intermediária e crônica dos animais infectados com 50 cercárias (Teste de Student Newman-Keuls).

Comparações (fases)*	Diferenças entre as médias	Valor de q	p<0,05
Aguda x Crônica	0,03	4,72	sim
Intermediária x Crônica	0,03	4,90	sim
Aguda x Intermediária	0,00	0,18	não

*Valor médio por fase: aguda = 0,0730, intermediária = 0,0743 e crônica = 0,0412.

A densidade de volume dos granulomas periovulares nos animais infectados com 50 cercárias apresentou diferenças significativas nos três órgãos pesquisados (tabelas 7b e 7c).

Tabela 7b. Valores da desidade de volume (Vv) dos granulomas periovulares pulmonares, hepáticos e intestinais nas três fases da infecção nos animais infectados com 50 cercárias.

Órgãos	Período da infecção		
	8 semanas	16 semanas	22 semanas
Pulmão	0,00 ± 0,00	0,01 ± 0,01	0,01 ± 0,02
Fígado	0,18 ± 0,05	0,012 ± 0,05	0,07 ± 0,02
Intestino	0,04 ± 0,02	0,09 ± 0,03	0,04 ± 0,03

Tabela 7c. Comparação dos índices de densidade de volume (Vv) dos granulomas presentes nos animais infectados com 50 cercárias no pulmão, fígado e intestino (Teste de Student Newman-Keuls).

Comparações(Órgão)*	Diferenças entre as médias	Valor de q	p< 0,05
Fígado x Pulmão	0,11	16,57	sim
Fígado x Intestino	0,06	9,48	sim
Intestino x Pulmão	0,05	7,09	sim

* Valor médio da densidade de volume dos granulomas por órgão: pulmão=0,0096; fígado=0,1214 e intestino=0,0574.

A interação entre órgão e fase da infecção sobre a densidade de volume dos granulomas presentes nos camundongos infectados com 50 cercárias permitiu a identificação dos seguintes achados: granulomas hepáticos na fase aguda apresentaram maior densidade de volume que estes nas demais fases; granulomas pulmonares nas três fases pesquisadas e intestinais nas fases aguda e crônica apresentaram menor densidade de volume que os granulomas hepáticos na fase aguda (tabela 7d). Os valores para a densidade de volume (Vv) dos granulomas hepáticos e intestinais na fase intermediária foram muito similares.

Ainda na fase intermediária, os granulomas intestinais apresentaram maior densidade de volume que na fases crônica e que os granulomas pulmonares durante todas as fases da infecção, não diferindo dos granulomas hepáticos na fase crônica (tabela 7d). A densidade de volume dos granulomas hepáticos na fase crônica não apresentaram diferença significativa para os granulomas intestinais na fase aguda e intermediária, entretanto foi maior para os

granulomas pulmonares. A densidade de volume dos granulomas intestinais na fase crônica foi diferente da densidade de volume dos granulomas pulmonares na fase aguda (tabela 7d).

Tabela 7d. Possíveis associações existentes entre os índices de densidade de volume (Vv) dos granulomas periovulares nos três órgãos estudados nas fases aguda, intermediária e crônica dos animais infectados com 50 cercárias (Teste de Student Newman-Keuls).

Comparações (Órgãos x Fases)*	Diferenças entre as médias	Valor de q	p< 0,05
Fígado(FA) x Pulmão(FA)	0,17	14,85	sim
Fígado(FA) x Pulmão(FI)	0,16	14,17	sim
Fígado(FA) x Pulmão(FC)	0,16	13,97	sim
Fígado(FA) x Intestino(FA)	0,14	11,86	sim
Fígado(FA) x Intestino(FC)	0,14	11,66	sim
Fígado(FA) x Fígado(FC)	0,11	9,26	sim
Fígado(FA) x Intestino(FI)	0,08	7,20	sim
Fígado(FA) x Fígado(FI)	0,06	5,03	sim
Fígado(FI) x Pulmão(FA)	0,11	9,82	sim
Fígado(FI) x Pulmão(FI)	0,11	9,14	sim
Fígado(FI) x Pulmão(FC)	0,10	8,93	sim
Fígado(FI) x Intestino(FA)	0,08	6,83	sim
Fígado(FI) x Intestino(FC)	0,08	6,62	sim
Fígado(FI) x Intestino(FI)	0,05	4,23	sim
Fígado(FI) x Intestino(FI)	0,25	2,17	não
Intestino(FI) x Pulmão(FA)	0,09	7,65	sim
Intestino(FI) x Pulmão(FI)	0,08	6,97	sim
Intestino(FI) x Pulmão(FC)	0,08	6,77	sim
Intestino(FI) x Intestino(FA)	0,05	4,66	sim
Intestino(FI) x Intestino(FC)	0,05	4,46	sim
Intestino(FI) x Fígado(FC)	0,02	2,06	não
Fígado(FC) x Pulmão(FA)	0,06	5,59	sim
Fígado(FC) x Pulmão(FI)	0,06	4,91	sim
Fígado(FC) x Pulmão(FC)	0,05	4,71	sim
Fígado(FC) x Intestino(FA)	0,03	2,60	não
Intestino(FC) x Pulmão(FA)	0,04	3,20	não

* FA= fase aguda; FI= fase intermediária e FC = fase crônica.

Nos animais infectados com o dobro de cercárias houve associação entre densidade de volume e órgão, mas não entre densidade de volume e fase da infecção(tabelas 8 e 8a).

Tabela 8. Relação entre a densidade de volume (Vv) dos granulomas periovulares de acordo com órgão e período da infecção nos animais infectados com 100 cercárias (ANOVA com dois fatores).

Fatores	Graus de Liberdade	F	p
Fase da infecção	2, 54	8,98	0,7467
Órgão	1, 54	0,107	0,0012
Fase x Órgão	2, 54	0,492	0,6172

Tabela 8a. Comparações dos índices de densidade de volume (Vv) dos granulomas presentes nas fases aguda e intermediária dos animais infectados com 100 cercárias (Teste t de Student).

Comparações (fases)*	Diferenças entre as médias	Valor de q	p<0,05
Aguda x Intermediária	0,01	0,46	não

*Valores médio por fase: aguda=0,0686 e intermediária=0,0755

Nesse subgrupo a densidade de volume (Vv) dos granulomas periovulares apresentou maior valor para os granulomas hepáticos em comparação com os granulomas pulmonares e intestinais. Estes por sua vez não apresentaram diferenças significantes entre si (tabelas 8b e 8c).

Tabela 8b Valor médio da densidade de volume (Vv) dos granulomas periovulares no pulmão, fígado e intestino nas duas fases da infecção nos animais infectados com 100 cercárias.

Órgãos	Período da infecção	
	8 semanas	16 semanas
Pulmão	0,00 ± 0,00	0,03 ± 0,05
Fígado	0,14 ± 0,04	0,12 ± 0,07
Intestino	0,06 ± 0,05	0,08 ± 0,09

Tabela 8c. Comparação dos índices de densidade de volume (Vv) dos granulomas presentes nos animais infectados com 100 cercárias no pulmão, fígado e intestino (Teste de Student Newman-Keuls).

Comparações(Órgão)*	Diferenças entre as médias	Valor de q	p< 0,05
Fígado x Pulmão	0,1094	5,99	sim
Fígado x Intestino	0,0564	3,09	sim
Intestino x Pulmão	0,0530	2,90	não

* Valores médio da densidade de volume dos granulomas por órgão: pulmão=0,0179; fígado=0,1273 e intestino=0,0709.

A análise estatística referente a associação entre densidade de volume dos granulomas periovulares, órgão e fase da infecção demonstraram que os granulomas hepáticos na fase aguda mas não na fase intermediária (tabela 8d). Granulomas pulmonares na fase aguda não apresentaram diferença na densidade de volume dos granulomas intestinais na fase intermediária (tabela 8d).

Tabela 8d. Possíveis associações existentes entre os índices de densidade de volume (Vv) dos granulomas periovulares nos três órgãos estudados nas fases aguda e intermediária dos animais infectados com 100 cercárias (Teste de Student Newman-Keuls).

Comparações (Órgãos x Fases)*	Diferenças entre as médias	Valor de q	p< 0,05
Fígado(FA) x Pulmão(FA)	0,13	5,21	sim
Fígado(FA) x Pulmão(FI)	0,10	4,07	não
Fígado(FI) x Pulmão(FA)	0,11	4,40	sim
Intestino(FI) x Pulmão(FA)	0,07	2,86	não

* FA= fase aguda e FI= fase intermediária

Densidade Numérica (Nn)

A densidade numérica dos granulomas periovulares nos animais infectados com 50 cercárias foi influenciada apenas pela fase da infecção em que estes se encontravam (tabela 9)

Tabela 09. Relação entre a densidade numérica (Nn) dos granulomas periovulares de acordo com órgão e período da infecção nos animais infectados com 50 cercárias (ANOVA com dois fatores).

Fatores	Graus de Liberdade	F	p
Fase da infecção	2, 24	9,88	0,0002
Órgão	2, 24	74,85	<0,0001
Fase x Órgão	4, 24	0,37	0,8306

Houveram diferenças entre as densidades numéricas dos granulomas presentes nas fases aguda e crônica bem como nas fases intermediária e crônica da infecção nos animais infectados com 50 cercárias (tabela 9a).

Tabela 9a. Comparações dos índices de densidade numérica (Nn) dos granulomas presentes nas fases aguda, intermediária e crônica dos animais infectados com 50 cercárias (Teste de Student Newman-Keuls).

Comparações (fases)*	Diferenças entre as médias	Valor de q	p<0,05
Aguda x Crônica	5,55	6,17	sim
Intermediária x Crônica	3,73	4,14	sim
Aguda x Intermediária	1,82	2,02	não

*Valor médio por fase: aguda=9,73 Nn/ μm^3 , intermediária =11,55 Nn/ μm^3 e crônica =15,28 Nn/ μm^3

O intestino apresentou maior densidade numérica seguido pelo fígado e posteriormente pelo pulmão (tabela 9b)

Tabela 9b. Valores da densidade numérica (Nn) do pulmão, fígado e intestino nos animais infectados com 50 cercárias nas três fases da infecção .

Órgãos	Período da infecção (Nn/ μm^3)		
	8 semanas	16 semanas	22 semanas
Pulmão	1,36 \pm 1,78	3,29 \pm 4,35	5,38 \pm 5,77
Fígado	12,24 \pm 2,09	14,89 \pm 2,89	18,53 \pm 4,29
Intestino	15,59 \pm 2,96	16,48 \pm 2,42	21,93 \pm 7,21

Diferenças significantes foram encontradas nos três órgãos estudados (tabela 9c).

Tabela 9c. Comparação entre as médias da densidade numérica (Nn) dos granulomas do pulmão, fígado e intestino em todas as fases estudadas nos animais infectados com 50 cercárias (Teste de Student Newman-Keuls).

Comparações(Órgão)*	Diferenças entre as médias	Valor de q	p< 0,05
Pulmão x Intestino	14,66	16,29	sim
Fígado x Intestino	2,78	3,09	sim
Fígado x Pulmão	11,88	13,20	sim

*Médias: pulmão=3,34 Nn/ μm^3 ; fígado=15,22 Nn/ $\mu\text{m}^3\mu\text{m}^3$ e intestino=18,00 Nn/ μm^3

A análise da densidade numérica de acordo com órgão e fase da infecção demonstrou que o intestino na fase crônica apresentou maior densidade numérica que o pulmão nas três fases e maior densidade que o fígado nas fases aguda e intermediária (tabela 9d). A densidade numérica dos granulomas intestinais na fase crônica não apresentaram diferenças significantes dos granulomas hepáticos no mesmo período.

Na fase intermediária os granulomas intestinais ainda apresentavam maior densidade numérica que os granulomas pulmonares em toda as três fases mas não diferiram dos granulomas hepáticos na fase aguda (tabela 9d). Os granulomas hepáticos apresentaram maior densidade numérica que o pulmão em todas as fases do estudo. Não foram vistas diferenças significantes na densidade numérica dos granulomas pulmonares entre as fases aguda e crônica (tabela 9d).

Tabela 9d. Possíveis correlações existentes entre a densidade numérica (Nn) dos granulomas periovulares nos três órgãos estudados nas fases aguda, intermediária e crônica em animais infectados com 50 cercárias (Teste de Student Newman Keuls).

Comparações (Órgãos x Fases)*	Diferenças entre as médias	Valor de p	p< 0,05
Intestino(FC)xPulmão(FA)	20,60	9	sim
Intestino(FC)xPulmão(FI)	18,65	8	sim
Intestino(FC)xPulmão(FC)	16,55	7	sim
Intestino(FC)x Fígado(FA)	9,69	6	sim
Intestino(FC) x Fígado(FI)	7,04	5	sim
Intestino(FC)x ntestino(FA)	6,34	4	sim
Intestino(FC)x Intestino(FI)	5,45	3	sim
Intestino(FC) x Fígado(FC)	3,40	2	não
Fígado(FC) x Pulmão(FA)	17,17	8	sim
Fígado(FC) x Pulmão(FI)	15,25	7	sim
Fígado(FC) x Pulmão(FC)	13,15	6	sim
Fígado(FC) x Fígado(FA)	6,29	5	sim
Fígado(FC) x Fígado(FI)	3,64	4	não
Intestino(FI) x Pulmão(FA)	15,12	7	sim
Intestino(FI) x Pulmão(FI)	13,20	6	sim
Intestino(FI) x Pulmão(FC)	11,10	5	sim
Intestino(FI) x Fígado(FA)	4,24	4	não
Intestino(FA)x Pulmão(FA)	14,23	6	sim
Intestino(FA) x Pulmão(FI)	12,31	5	sim
Intestino(FA)x Pulmão(FC)	10,21	4	sim
Fígado(FI) x Pulmão(FA)	13,53	5	sim
Fígado(FI) x Pulmão(FI)	11,61	4	sim
Fígado(FI) x Pulmão(FC)	9,51	3	sim
Fígado(FA) x Pulmão(FA)	10,88	4	sim
Fígado(FA) x Pulmão(FI)	8,95	3	sim
Fígado(FA) xPulmão(FC)	6,86	2	sim
Pulmão(FC) xPulmão(FA)	4,02	3	não

* FA=fase aguda; FI= fase intermediária e FC = fase crônica.

Nos animais infectados com 100 cercárias foram encontradas diferenças nos valores da densidade numérica dos granulomas periovulares a depender do órgão onde estes se localizavam, sendo acompanhado por diferenças a depender da fase da infecção (tabela 10).

Tabela 10. Relação entre a densidade numérica (Nn) dos granulomas periovulares de acordo com órgão e período da infecção nos animais infectados com 100 cercárias (ANOVA com dois fatores).

Fatores	Grau de Liberdade	F	p
Fase da infecção	2, 24	17,95	<0,0001
Órgão	1, 24	6,31	0,0191
Fase x Órgão	2, 24	0,54	0,5906

Nesse subgrupo foram encontradas diferenças entre as médias da densidade numérica nas fases aguda e intermediária (tabela 10a).

Tabela 10a. Comparações dos índices de densidade numérica (Nn) dos granulomas presentes nas fases aguda e intermediária dos animais infectados com 100 cercárias.

Comparações (fases)*	Diferenças entre as médias	Valor de q	p<0,05
Agudax Intermediária	4,76	3,55	sim

*Valor médio por fase: aguda = $10,06 \text{ Nn}/\mu\text{m}^3$ e intermediária = $15,3 \text{ Nn}/\mu\text{m}^3$.

O intestino apresentou maior densidade numérica que os demais órgãos, sendo encontradas diferenças significante entre os três órgãos estudados (tabelas 10b e 10c).

Tabela 10b Valor médio da densidade numérica (Nn) dos granulomas periovulares no pulmão, fígado e intestino nas três fases da infecção nos animais infectados com 100 cercárias.

Órgãos	Período da infecção $\text{Nn}/\mu\text{m}^3$	
	8 semanas	16 semanas
Pulmão	$2,93 \pm 1,82$	$8,02 \pm 6,03$
Fígado	$10,58 \pm 2,67$	$17,58 \pm 5,58$
Intestino	$18,14 \pm 3,70$	$20,35 \pm 8,38$

Tabela 10c. Comparação entre as médias da densidade numérica (Nn) dos granulomas do pulmão, fígado e intestino nas fase aguda e intermediária nos animais infectados com 100 cercárias (Teste de Student Newman-Keuls).

Comparações(Órgão)*	Diferenças entre as médias	Valor de q	p< 0,05
Pulmão x Intestino	13,77	8,39	sim
Fígado x Intestino	5,16	3,14	sim
Fígado x Pulmão	8,61	5,24	sim

*Médias: pulmão=5,47 Nn/ μm^3 ; fígado=14,08 Nn/ μm^3 e intestino=19,24 Nn/ μm^3 .

Quando comparamos a densidade numérica nos três órgãos e sua correlação com as fases da infecção constatamos que o intestino na fase intermediária apresentou maior densidade numérica que o pulmão nas duas fases e que o fígado na fase aguda (tabela 10d). Não houve diferenças significativas entre intestino e fígado na fase intermediária. Na fase intermediária e na fase aguda não houve diferenças entre intestino e fígado (tabela 10d). Na fase intermediária o fígado demonstrou maior densidade numérica que o pulmão nas fases estudadas, entretanto não houve diferenças significativas entre as médias da densidade numéricas dos os granulomas presentes no fígado e pulmão na fase aguda (tabela 10d).

Tabela 10d. Possíveis associações existentes entre a densidade numérica (Nn) dos granulomas nos três órgãos estudados nas fases aguda e intermediária nos animais infectados com 100 cercárias (Teste de Student Newman-Keuls).

Comparações (Órgãos x Fases)*	Diferenças entre as médias	Valor de q	p< 0,05
Intestino(FI) x Pulmão(FA)	17,42	7,50	sim
Intestino(FI) x Pulmão(FI)	12,33	5,31	sim
Intestino(FI) x Fígado(FA)	9,76	4,20	sim
Intestino(FI) x Fígado(FI)	2,77	1,19	não
Intestino(FA) x Pulmão(FA)	15,21	6,55	sim
Intestino(FA) x Pulmão(FI)	10,12	4,36	sim
Intestino(FA) x Fígado(FA)	7,56	3,25	não
Fígado(FI) x Pulmão(FA)	14,65	6,31	sim
Fígado(FI) x Pulmão(FI)	9,56	4,11	sim
Fígado(FA) x Pulmão(FA)	7,66	3,30	não

* FA= fase aguda e FI = fase intermediária

5.4.3 Granulomas Isolados do Fígado

Volume

Foram detectadas diferenças significantes nos granulomas hepáticos situados entre as fases aguda e intermediária e aguda e crônica, mas não entre as fases intermediária e crônica ($gl = 2, 20$; $f = 10,89$ e $p < 0,08$). As médias encontradas para cada período da infecção foram: aguda = $633,05 \times 10^4 \mu\text{m}^3$; intermediária = $210,65 \times 10^4 \mu\text{m}^3$ e crônica = $190,23 \times 10^4 \mu\text{m}^3$.

Área Seccional

Os granulomas isolados presentes na fase aguda apresentaram redução significativa da área seccional ocupada durante a evolução da infecção (tabela 11), entretanto não verificamos diferenças entre as fases intermediária e crônica.

Tabela 11. Médias da área seccional ocupada pelos granulomas periovulares isolados hepáticos em animais infectados com 50 cercárias.

Período da Infecção	Média da Área Seccional ($\times 10^3 \mu\text{m}^2$)
8 semanas	159,86*
16 semanas	78,22
22 semanas	68,61

* $p < 0,05$

Densidade de Volume

A densidade de volume não apresentou diferenças significantes entre as três fases pesquisadas (tabela 12). Esse resultado foi completamente diferente dos dados observados nos granulomas totais.

Tabela 12. Médias da densidade de volume (Vv) dos granulomas isolados hepáticos nos animais infectados com 50 cercárias.

Período da Infecção	Densidade de Volume (Vv)*
8 semanas	0,0953
16 semanas	0,0994
22 semanas	0,0716

*p = 0,4389

Densidade Numérica

Também não verificamos diferenças significantes na densidade numérica dos granulomas isolados durante a evolução da infecção (tabela 13)

Tabela 13. Médias da densidade numérica dos granulomas isolados hepáticos nos animais infectados com 50 cercárias.

Período da Infecção	Densidade numérica (Nn/ μm^3)*
8 semanas	7,2743
16 semanas	7,3971
22 semanas	8,0029

Pranchas

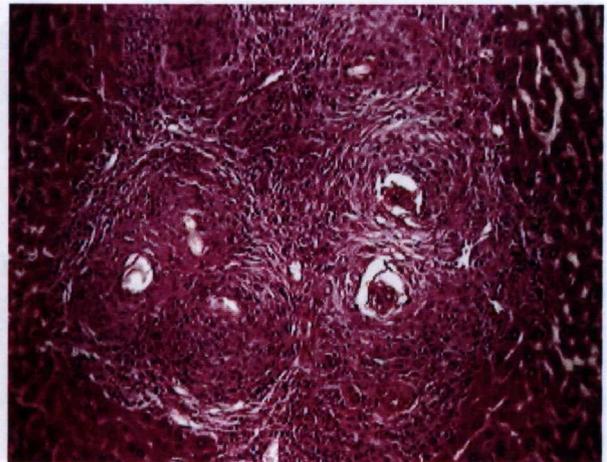
11



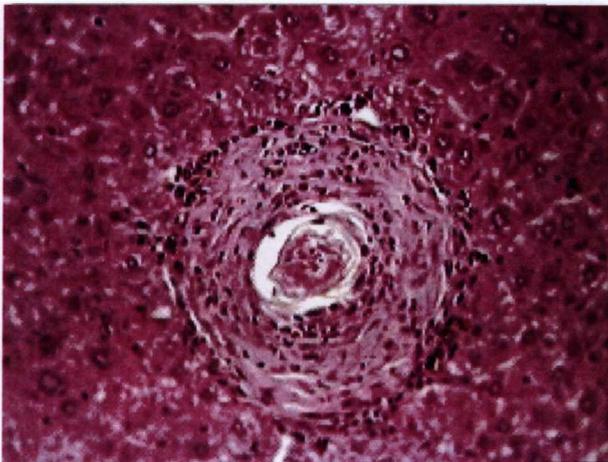
Prancha 1 - Granulomas Periovulares Hepáticos



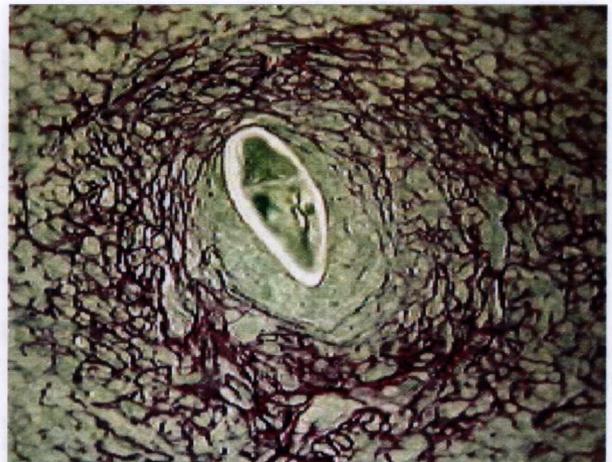
A - Granuloma da fase aguda. Granuloma predominantemente exsudativo, com periferia pouco delimitada, sem evidência de fibrose, formado em torno a ovo maduro do *S. mansoni*, numa infecção de 8 semanas, no camundongo. H.E. 250 X.



B - Granuloma da fase intermediária. Granulomas pluri-ovulares, já com fibrose evidente e com delimitação nítida com o parênquima hepático. H.E. 100 X.

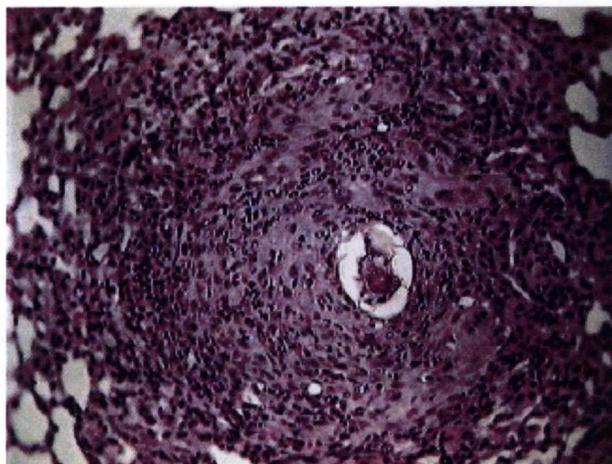


C - Granuloma da fase crônica. Ovo maduro circundado por uma reação celular compacta, bem delimitada, com nítida fibrose, formada numa infecção experimental murina, com 22 semanas de duração. H.E. 250 X.

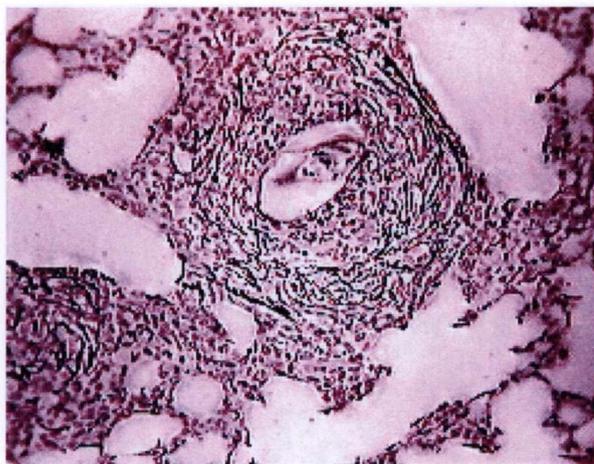


D - A fibrose no granuloma periovular da esquistossomose aparece bem inicialmente, mas fica pouco evidente devido às fibras se distribuírem frouxamente. Todavia, nas colorações específicas para colágeno, a fibrose fica mais aparente, como pode ser visto neste granuloma da fase aguda, corado pelo sirius vermelho. 250 X.

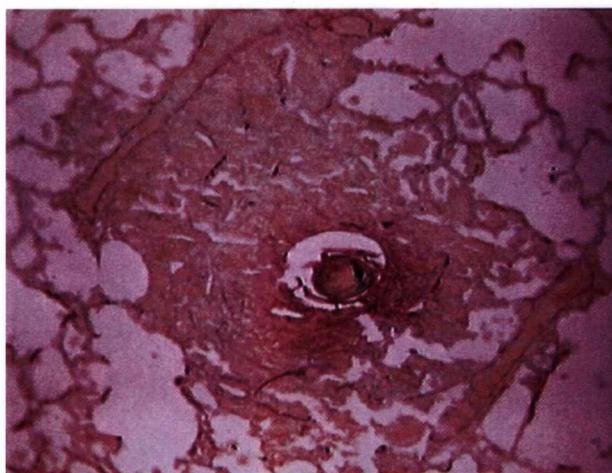
Prancha 2 - Granulomas Esquistossomóticos Pulmonares.



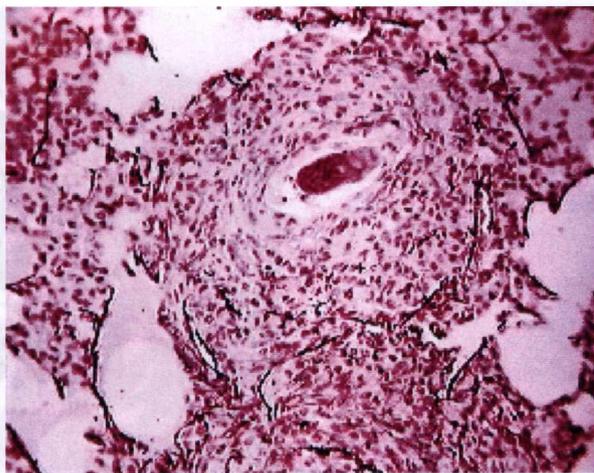
A - Granuloma bem organizado em torno a ovo maduro do *S. mansoni*, circundado por alveolos pulmonares semi-colapsados. Infecção de 8 semanas, mas o aspecto geral deste granuloma se conserva o mesmo ao longo de infecções mais crônicas. H.E. 250 X.



B - Distribuição de fibrilas reticulínicas num granuloma periovular da fase aguda. Estas se mostram abundantes, mas conservam uma distribuição frouxa. Método de Gomori, 250 X.

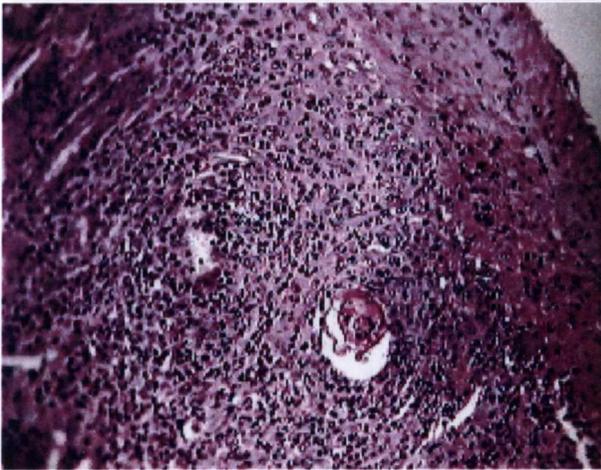


C - A fibrose é sempre pouco acentuada nos granulomas pulmonares, como pode ser visto nesta secção, contendo um granuloma da fase aguda. Picrosirius-vermelho. 250 X.

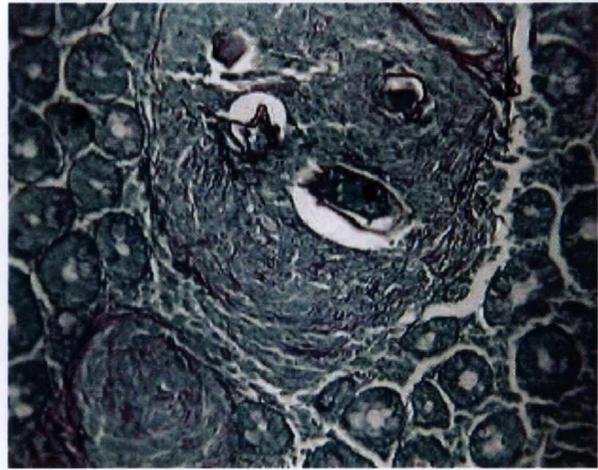


D - O tecido pulmonar contém muitas fibras elásticas, mas o granuloma periovular não contém fibras elásticas. Na foto aparecem algumas fibras elásticas na periferia do granuloma, provavelmente derivadas de capilares alveolares. Método da orceína. 250 X.

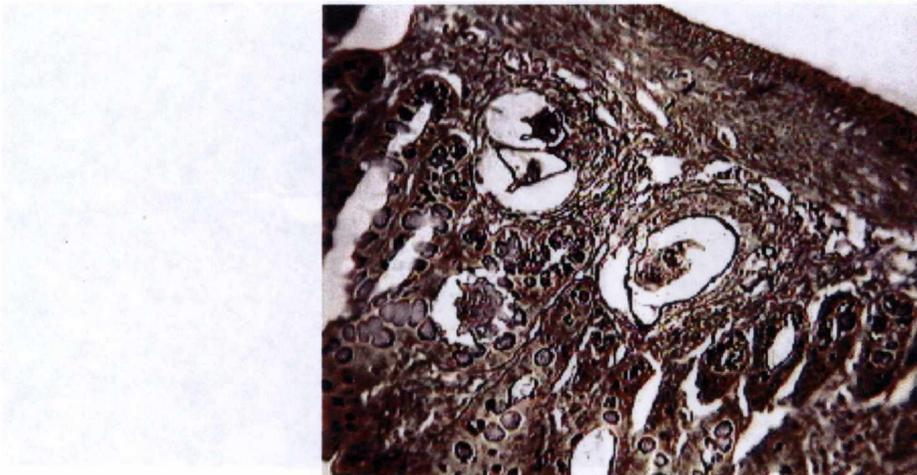
Prancha 3 - Granulomas periovulares Intestinais



A - Reação predominantemente celular num granuloma formado na submucosa intestinal durante a fase aguda da infecção. H.E. 250 X.



B - Granuloma pluriocular formado em plena mucosa intestinal. Fase aguda. A quantidade de tecido fibroso é mínima. Método do picro-sírius vermelho. 250 X.



C - As fibrilas reticulínicas também são escassas nos granulomas intestinais, como pode ser observado na figura acima, Fase aguda da infecção. Método de Gomori. 250 X.

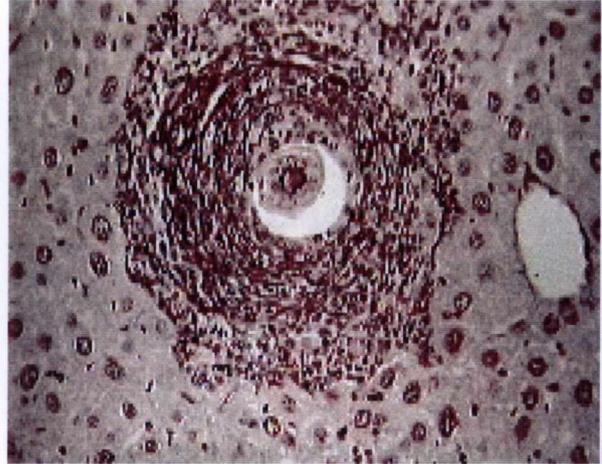
Reações de imunofluorescência para componentes da Matriz Extracelular

Essa técnica foi utilizada em dois outros pesquisadores, aparecendo com a característica de imunofluorescência para a matriz extracelular. Diferentes componentes estão sendo estudados sempre em torno de ovos de *S. mansoni*, portanto fazem parte da

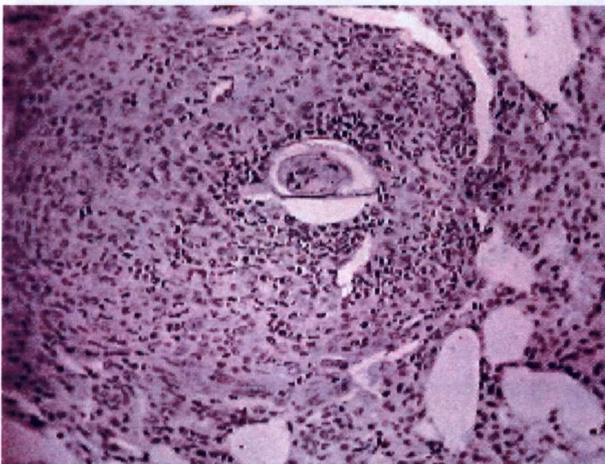
Prancha 4 - A Matriz Extracelular nos Granulomas Periovulares



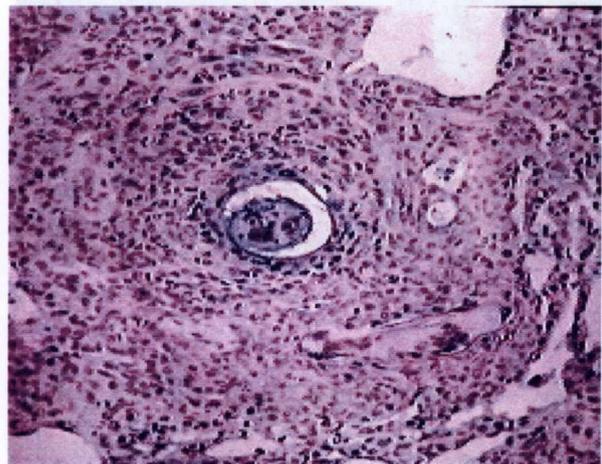
A - Granuloma hepático na fase intermediária. Um depósito abundante e compacto de fibras colágenas aparece circundando um ovo maduro no interior do parênquima. Método do picro-sírius vermelho. 250 X.



B - Excepcionalmente, alguns granulomas hepáticos na fase crônica da infecção, revelaram uma abundante quantidade de fibras elásticas, como pode ser vista na microfotografia acima. Método da orceína. 250 X.



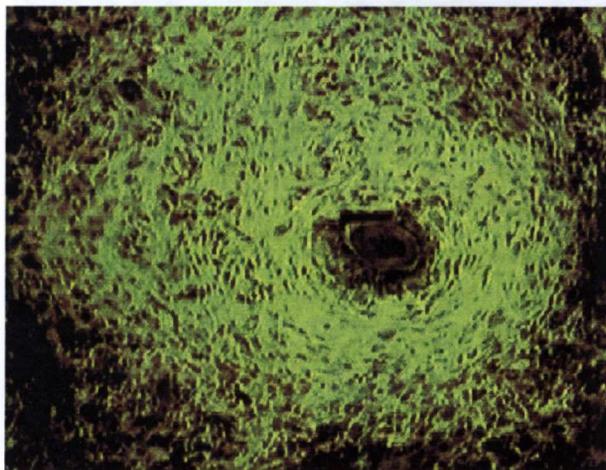
C - Tanto no ovo, como no tecido que compõe o granuloma, a presença de proteoglicanos, foi constante, como revelado através da coloração do azul de alciano. No caso acima, no granuloma localizado no pulmão, se evidenciam os proteoglicanos ácidos. Método Alcian Blue, com pH. 2,0. 250 X.



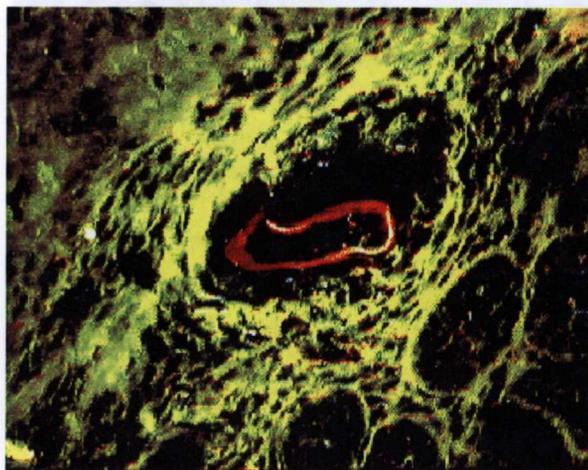
D - Situação semelhante à da figura anterior, mas agora evidenciando os proteoglicanos neutros. Método Alcian Blue com pH 7,0. 250 X.

Prancha 5 - Reações de Imunofluorescência para componentes da Matriz Extracelular

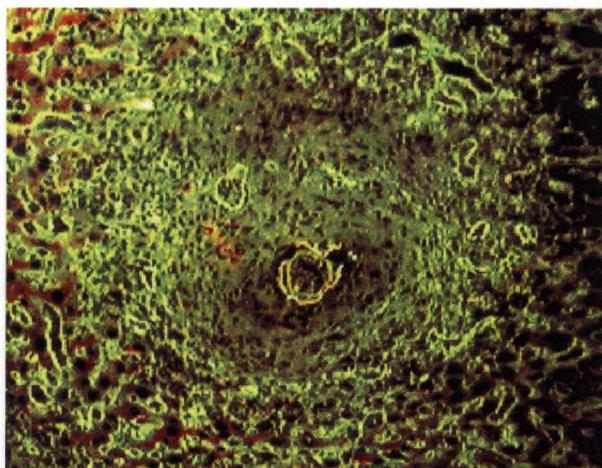
Fase Aguda - Os diversos componentes pesquisados aparecem com a característica coloração verde maçã da fluoresceína sob luz ultra-violeta. Ditos componentes estão representados sempre em torno de ovos do *S. mansoni*, portanto fazendo parte da composição da reação granulomatosa.



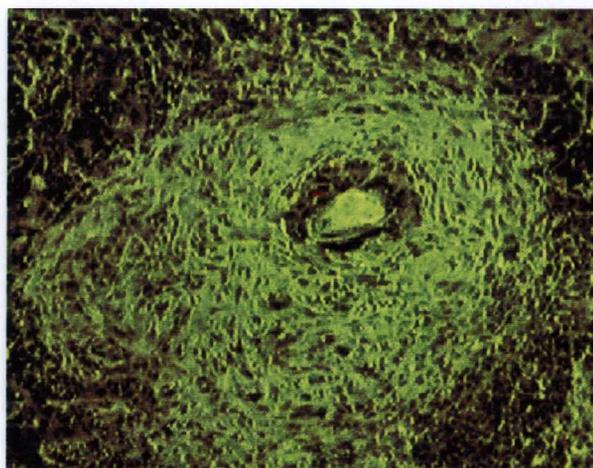
A - Fígado - colágeno tipo I. 200 X.



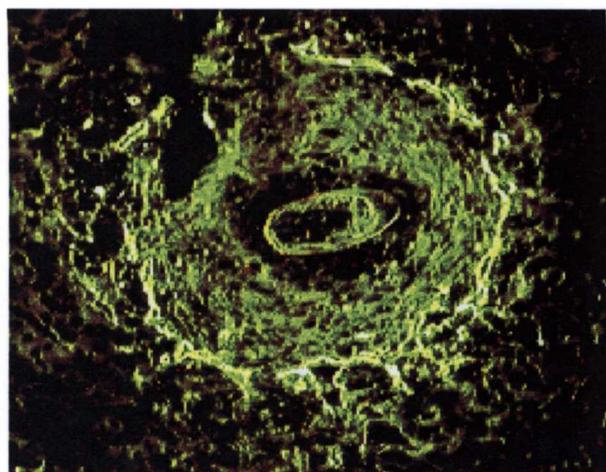
B - Intestino - colágeno tipo I. 400 X.



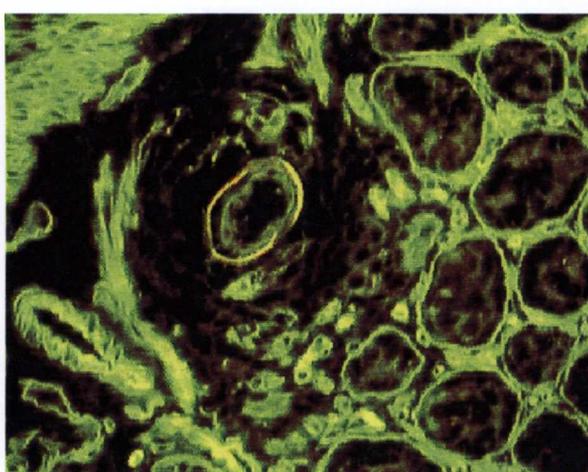
C - Fígado - colágeno tipo IV. 200 X.



D - Fígado - fibronectina. 200 X.



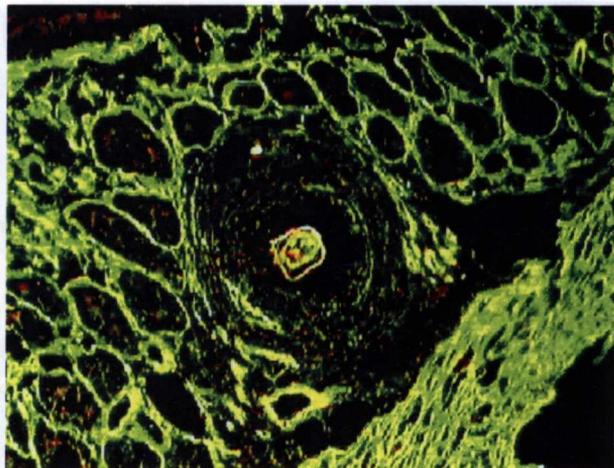
E - Fígado - laminina. 200 X.



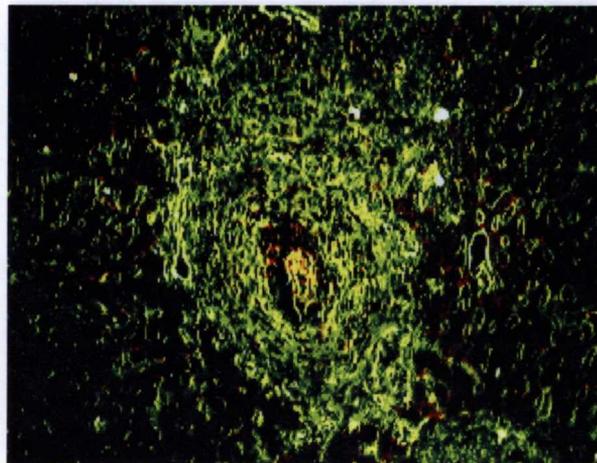
F - Intestino - laminina 400 X.

Prancha 6 - Reações de Imunofluorescência para componentes da Matriz Extracelular

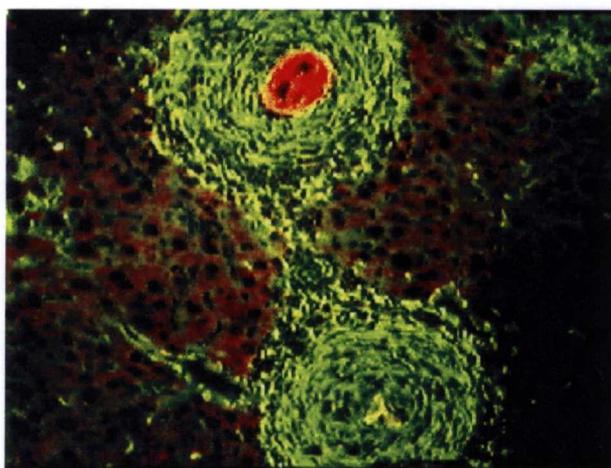
Fase Intermediária - Marcação de elementos da matriz extracelular formada em torno dos ovos de *S. mansoni* depositados em diferentes tecidos



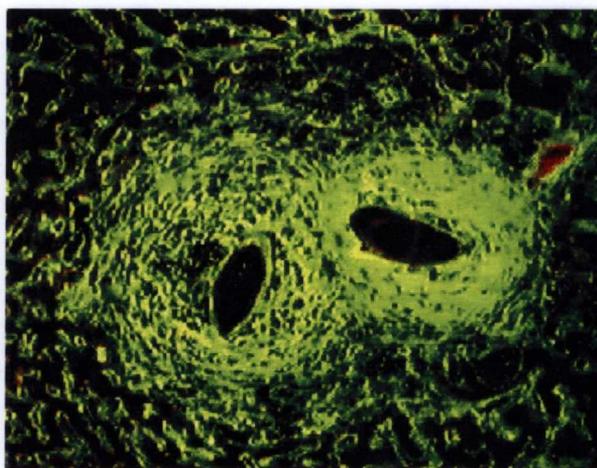
A - Intestino - laminina. 200 X.



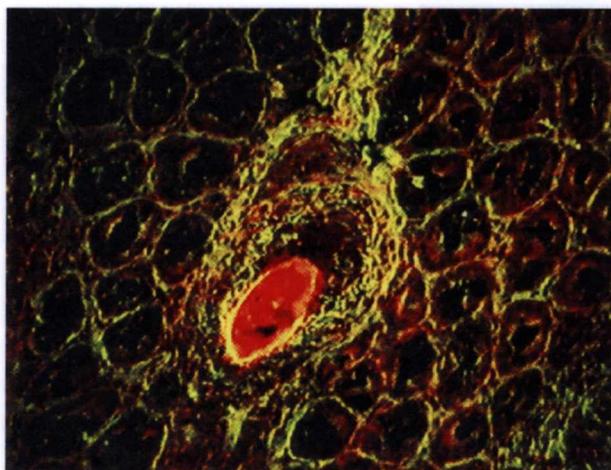
B - Fígado - colágeno tipo IV. 200 X.



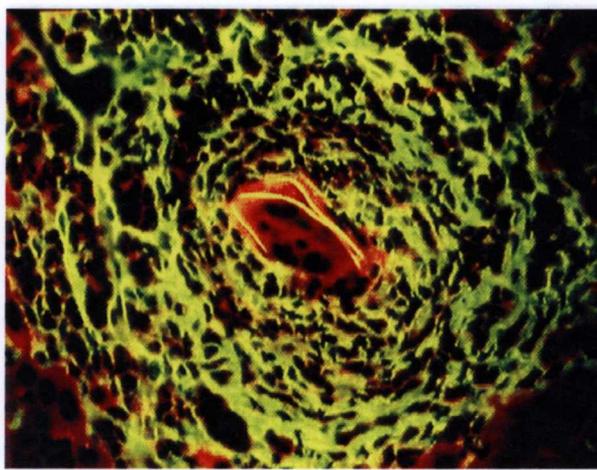
C - Fígado - colágeno tipo I. 200 X.



D - Fígado - fibronectina. 200 X.



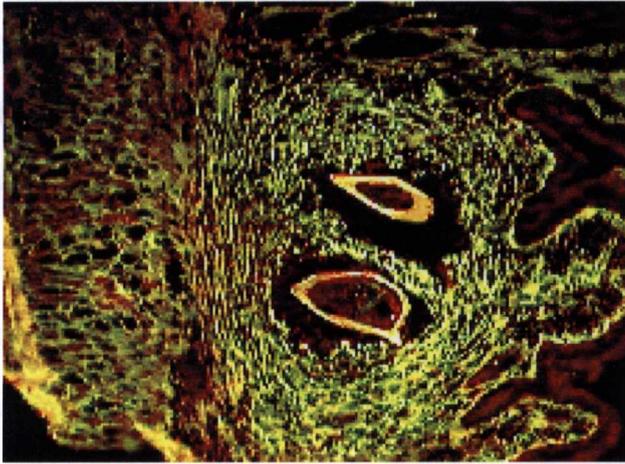
E - Intestino - colágeno tipo I. 200 X.



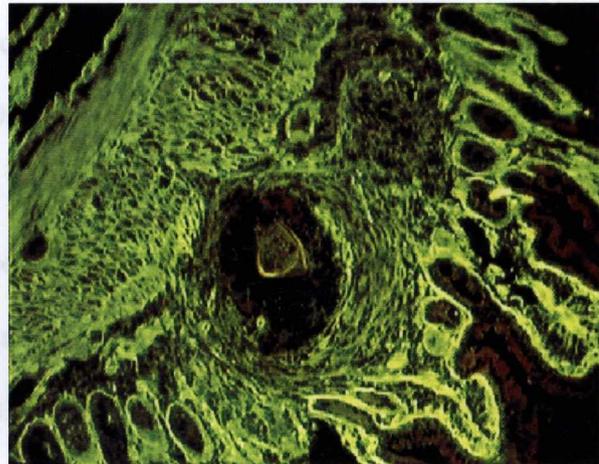
F - Fígado - colágeno tipo III. 400 X.

Prancha 7 - Reações de Imunofluorescência para os componentes da Matriz Extracelular

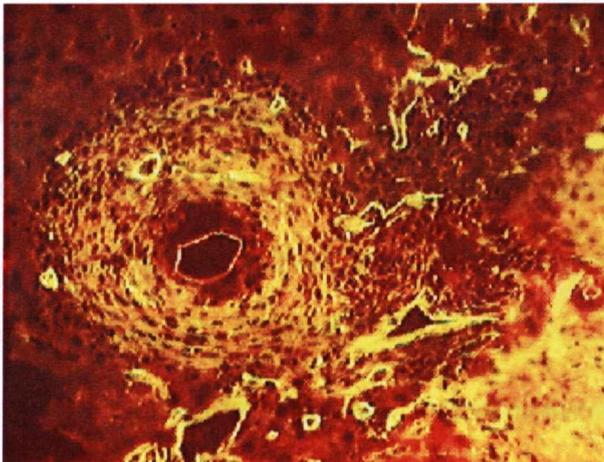
Fase Crônica - Granulomas menores, mais compactos, revelados através de marcação fluorescente para diversos elementos da matriz extracelular.



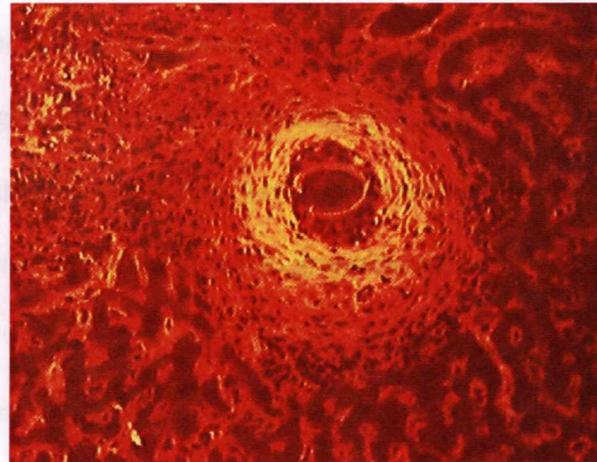
A - Intestino - fibronectina. 200 X.



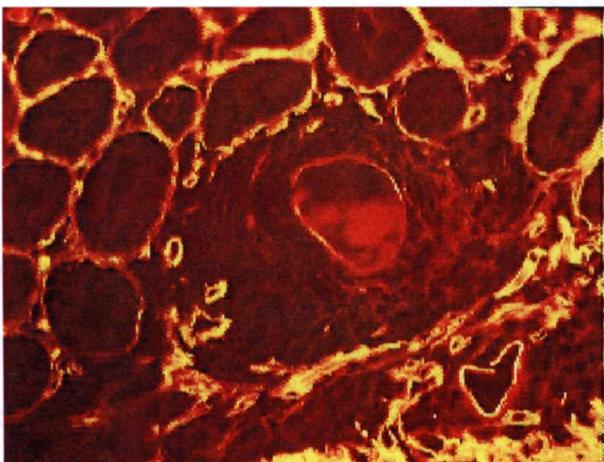
B - Intestino - laminina. 200 X.



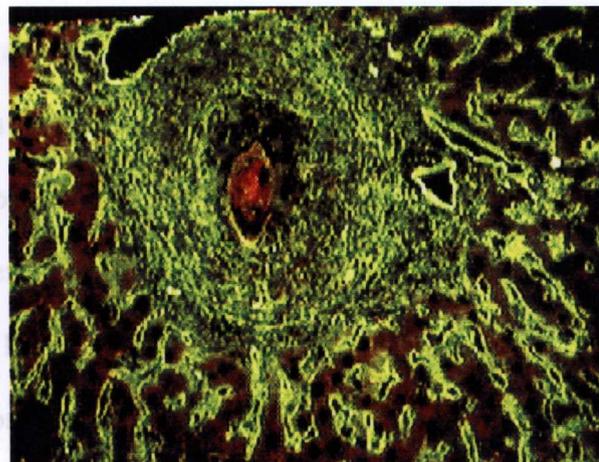
C - Fígado - laminina. 200 X.



D - Fígado - fibronectina. 200 X.



E - Intestino - colágeno tipo IV. 400 X.



F - Fígado - colágeno IV. 200 X.

5 DISCUSSÃO

A indicação de que o fenômeno denominado “modulação imunológica” do granuloma periovular esquistossomótico ocorre exclusivamente no fígado pode ser encontrada em vários trabalhos (WEINSTOCK & BOROS, 1981 e 1983; SOUZA VIDAL et al., 1992; GRIMAUD, 1987). O presente estudo confirma e estende estas observações, empregando o rigor de métodos morfométricos e estudando os granulomas periovulares em três órgãos diferentes e durante três períodos distintos da infecção do camundongo. Os granulomas pulmonares e intestinais não apresentaram modificações importantes ao longo das três fases estudadas. Não foram verificadas alterações importantes no padrão dessas reações. No pulmão os granulomas caracterizavam-se por ser uma reação basicamente celulosa contendo predominantemente eosinófilos e plasmócitos, além de neutrófilos, eosinófilos e macrófagos com escassez de fibras colágenas, poucas fibras reticulares e proteoglicanos ácidos e neutros distribuídos uniformemente em toda a reação. Esses resultados foram semelhantes aos encontrados por SOUZA VIDAL et al. (1992), demonstrando não haver imunomodulação do granuloma nesse órgão (ver tabelas 3b, 5b e 7b).

Os granulomas intestinais foram menores que os granulomas hepáticos nas fases aguda e intermediária apresentando volume, área e densidade de volume reduzidos (ver tabelas 3c, 5c e 7c). Com a cronicidade da infecção, os granulomas intestinais e hepáticos presentes na 22^a semana da infecção demonstraram valores muito próximos (ver tabela 3d). Fato esse já descrito na literatura por alguns autores tais como WEINSTOCK & BOROS (1981), ao verificarem que os granulomas presentes no íleo eram menores que os granulomas situados no fígado, cólon e placa de Peyer não sofrendo modulação com a cronicidade da infecção. Os estudos realizados por SANTOS et al. (1992) também concordam com nossos estudos ao demonstrar ausência de modulação na resposta granulomatosa intestinal.

Um outro aspecto que caracteriza os granulomas intestinais e a pouca reatividade destes com escassez de células e elementos extracelulares na sua maioria, característica essa muito diferente dos granulomas pulmonares que são bastante celulosos. O estudo da matriz extracelular adjacente ao ovo demonstrou uma composição escassa de fibras reticulares, ausência de fibras elásticas e escassez de fibras colágenas que se depositaram na periferia da reação representada pelo colágeno tipo I (prancha 3). Resultados estes semelhantes aos encontrados por GRIMAUD et al. (1987)

Pesquisas realizadas por WEINSTOCK & BOROS (1983) sobre diferenças na composição celular de granulomas hepáticos e intestinais isolados de camundongos demonstraram que as reações hepáticas continham grande número de linfócitos T e B, eosinófilos e mastócitos, ao passo que granulomas do íleo apresentaram muitos macrófagos.

O fígado foi de fato o único órgão no qual os granulomas em torno a ovos recentes (maduros) apresentaram modificações nos três períodos considerados. Os granulomas hepáticos na fase aguda apresentaram maior volume (tabela 3b), maior área (tabela 5b) e maior densidade de volume (tabela 7b) que os granulomas presentes nos demais fases. Embora na fase intermediária não tenha havido modificações quantitativas significantes, ocorreram mudanças qualitativas apreciáveis. Nesta fase os limites periféricos dos granulomas se tornaram mais nítidos, os elementos celulares apareceram mais compactamente arrumados e os mononucleares sobrepujaram os polimorfonucleares. Os dados mais evidentes ficaram mesmo para quando os granulomas da fase aguda foram comparados com os da fase crônica.

Todavia, o intuito principal do presente estudo não foi propriamente confirmar a modulação como um fenômeno exclusivamente hepático, mas sim, a partir daí, inferir que tal fenômeno depende fundamentalmente de fatores próprios dos locais onde o granuloma se forma. No passado, muitos estudos se concentraram em investigar fatores imunológicos do hospedeiro, tais como, anticorpos idiotípicos e anti-idiotípicos, células supressoras e por

último, mudanças de reatividade Th2 para Th1 sob o influxo de citocinas geradas por células auxiliaadoras CD4. Estes fatores podem ser importantes, mas não são suficientes *per se* para explicar o fenômeno da modulação. Do contrário, os granulomas pulmonares e intestinais deveriam também exibir o mesmo fenômeno, pois os fatores acima mencionados são circulantes e poderiam estar em toda a parte. Algo de peculiar ocorre no fígado, que condiciona o granuloma periovular formado em torno a um ovo maduro do *S. mansoni* a mudar de tamanho, textura, composição celular e quantidade e qualidade da matriz extracelular com o passar do tempo. Algo com capacidade de criar um ambiente adequado para o “homing” de alguns tipos celulares, para a expressão de receptores e ligantes, para mudanças fenotípicas em células e para estimular os elementos celulares à expressão de fatores solúveis, como citocinas, quimiocinas, etc. Estudar estes fatores em detalhes é uma tarefa gigantesca.

O presente estudo teve ambições mais modestas e procurou estudar comparativamente alguns fatores que compõem o ambiente local dos granulomas em diferentes órgãos e em diferentes tempos da infecção. Os diferentes componentes da matriz extracelular, estudados com técnicas histológicas, bioquímicas e de imunofluorescência (colágenos, glicoproteínas associadas e proteoglicanos) foram identificados em todos os granulomas, em todos os órgãos estudados. Todavia a quantidade foi sempre bem mais abundante ao nível do fígado. Não foi possível se avaliar o percentual de distribuição destes elementos devido a diferença de reatividade dos anticorpos. O colágeno tipo I tem menos potencial imunógeno que o colágeno de tipo III, sendo seus anticorpos em geral pouco reativos, gerando uma fluorescência mais fraca que o colágeno tipo III, principalmente quando produzido a partir do procolágeno tipo III, o qual é um imunógeno muito reativo. Não só a quantidade, mas a qualidade e a sequência de aparecimento destes vários elementos devem influenciar as reações locais. Tem-se afirmado, por exemplo que a elastina não está presente nos granulomas hepáticos

(ANDRADE & FREITAS 1991; JUNQUEIRA et al., 1986). Mas, nos granulomas da fase crônica, ela pode estar presente de maneira bem evidente, se bem que em poucos casos. Não ficou esclarecido o por que do aparecimento de elastina em tais casos, mas esta é uma modificação importante de um elemento da matriz extracelular, não observada fora do fígado e que pode estar relacionada com uma persistência demasiadamente longa do granuloma, se levarmos em conta dados sugeridos por SCHEUER & MAGGI (1980). Isto aponta para fatores de degradação da matriz extracelular como tendo também importância nas alterações morfológicas dos granulomas.

Os granulomas intestinais (SANTOS et al., 1992) e pulmonares (ALMEIDA & ANDRADE, 1983) se desintegram mais rapidamente que os hepáticos. Isto pode refletir um menor conteúdo em colágeno dos primeiros, mas pode também indicar um processo de degradação mais ativo nos mesmos.

A população celular do fígado, embora não tenha sido objeto de nossos estudos, demonstra características importantes que levam a crêr ser este o principal fator envolvido na maior deposição de elementos extracelulares nos granulomas hepáticos. Estudos realizados por ROJKIND (1994) demonstraram que na composição do fígado participam cinco tipos celulares distintos, os quais ocupam 80% do seu volume, os 20 % restantes sendo ocupados pela matriz extracelular. Os hepatócitos ocupam cerca de 50 a 60% do volume hepático e os quatro tipos celulares restantes correspondem às células não parenquimatosas. Uma destas, as células estreladas ou células armazenadoras de gordura (células de Ito) chama a atenção por ser a principal fonte de produção da matriz extracelular hepática, estando envolvida nos processos de fibrogênese e fibrólise (BLOMHOFF & WAKE, 1991; CASU et al., 1994; ENZAN et al., 1995). Quando mobilizadas estas células sintetizam colágenos, proteoglicanos, ácido hialurônico e glicoproteínas estruturais, tais como laminina, fibronectina, tenascina e

outras, as quais são depositadas na matriz fibrótica extracelular (GRESSNER & BACHEM, 1994).

Outro elemento peculiar e muito importante no fígado são as células de Kupffer, estas quando envolvidas no processo reacional podem induzir a liberação direta ou indireta de polipeptídeos reguladores do crescimento, estimulando as células armazenadoras de gordura a proliferarem e a se transformar em miofibroblastos. Cada tipo celular induz uma resposta em células vizinhas e em células circulantes que seriam recrutadas para o local da inflamação e expressariam um arranjo de fatores de crescimento peptídicos, os quais teriam ação pleiotrópica sobre a diferenciação celular, proliferação, migração, contração, expressão de receptores de superfície, síntese e degradação da matriz (GRESSNER & BACHEM, 1994).

Várias funções têm sido descritas para as células estreladas e os miofibroblastos delas derivadas; como células armazenadoras de gordura elas englobam, estocam e armazenam retinóides e, como miofibroblastos, elas sintetizam e secretam proteínas da matriz extracelular tais como: colágenos I, II, III, IV, V e VI, fibronectina, laminina, tenascina, indulina, hialurônico e proteoglicanos. Estas células também sintetizam metaloproteinases, responsáveis pela degradação da matriz extracelular e o inibidor tissular de metaloproteinases (TIMP1 e TIMP2). Em ambas as formas elas sintetizam e secretam citocinas e, especialmente como miofibroblastos, elas estão aptas a contração em resposta a substâncias vasoativas e deste modo estão potencialmente envolvidas na regulação do tonus sinusoidal (HAUTEKEETE & GEERTS, 1997).

Segundo LENZI et al. (1991), a secreção simultânea de citocinas e de fatores específicos dos ovos atuam sobre as células do tecido conjuntivo e induziriam à secreção local de múltiplos componentes do tecido conjuntivo, tais como fibronectina, laminina e isotipos de colágeno.

Na fase aguda fibras elásticas, colágeno tipo IV e laminina foram conspícuos, principalmente em vasos neoformados, na periferia do granuloma, confirmando dados já vistos na literatura (PARISI et al. 1985 e GRIMAUD, 1987). Os proteoglicanos corados pelo Alcian Blue em pH ácido e neutro foram visíveis, tanto na periferia da reação, quanto no interior do ovo de *S. mansoni*, evidenciando a presença de proteoglicanos no interior do miracídio. Na 16^a e 22^a semana pós infecção esses elementos foram encontrados no interior da reação, apresentando a mesma intensidade de coloração, porém em menor quantidade devido provavelmente ao processo imunomodulatório pelo qual passa a reação granulomatosa, não sendo possível uma avaliação quantitativa e sim apenas qualitativa. NISHIMURA et al. (1985) revelaram que a quantidades de ácido hialurônico, dermatan sulfato e condroitin 6-sulfato aumenta significativamente nas lesões isoladas de ovos, concomitante com a deposição extensa de fibronectina e do proteoglicano heparan sulfato. No estágio tardio o conteúdo de glicosaminoglicanos decresce. Para JUNQUEIRA et al. (1986) o dermatan sulfato foi a principal glicosaminoglicana detectada nos granulomas e sua concentração aumenta durante a evolução da doença (50-100 dias após infecção). Isto sugere a participação de células perisinusoidais na gênese do granuloma hepático, uma vez que estas são conhecidas como fonte de dermatan e condroitin sulfatos, enquanto os hepatócitos sintetizam apenas heparan sulfato (GRESSNER & ZERBE, 1987).

Muitos proteoglicanos funcionam como moduladores de fatores de crescimento. O heparan sulfato por exemplo, funciona como ligante do fator de crescimento de fibroblastos (FGFs) (BURGESS & MACIAG, 1989). O ligante FGF, a cadeia de heparina ou o heparan sulfato parecem proteger o fator de crescimento da degradação (SAKSELA & KIFKIN, 1990; ISHAI-MICHAELI et al., 1990).

A fibronectina, uma glicoproteína não colágena, esteve presente em grande quantidade no interior da reação granulomatosa, resultados estes semelhantes aos encontrados em estudos

desenvolvidos por NISHIMURA, (1985) e GRIMAUD et al (1987). Sua distribuição foi reduzida gradativamente com a cronicidade da infecção nos granulomas mais recentemente formados (pranchas 5, 6 e 7). ANDRADE (1991) alegou que a fibronectina pode servir como marcador dos estágios do granuloma. Os dados deste trabalho sugerem que haja uma associação entre o percentual de células recrutadas e a quantidade de fibronectina presente nos granulomas, devido a redução gradual desses elementos nos granulomas hepáticos presentes nas fases intermediária e crônica.

Com a cronicidade da infecção, os granulomas centrados por ovos maduros sofreram um processo de organização gradativo que culminou com redução no número de células recrutadas para o local da reação e compactação de fibras colágenas (Prancha 1, figura C). O conteúdo de elementos da matriz extracelular passou por um processo gradual de reorganização; como pode ser visto nos granulomas presentes na fase intermediária (prancha 1, figura B), muito embora análises morfométricas não terem revelado diferenças significantes entre a 8^a e 16^a semana pós infecção (ver tabelas 3a, 5a e 7a).

No processo de modulação da reação granulomatosa as fibras colágenas e aquelas reveladas após impregnação argêntica para reticulína, sofreram um processo de condensação e deposição concêntrica na região periovular (prancha 4, figura A). O colágeno tipo I esteve presente em toda a extensão da reação, disposto sob a forma de fibras compactas, bem como o colágeno tipo III, muito embora tenha havido redução do espaço ocupado por essas fibras. Muitos estudos correlacionam a presença de fibras colágenas com o processo contínuo de produção e degradação desses elementos, onde os fatores responsáveis pela síntese e degradação dessas fibras estariam atuando conjuntamente. Vários fatores estariam presentes tais como collagenases, sob a forma ativa e inativa, TIMP e a maior ou menor concentração de “cross-linkings” do colágeno.

A dosagem de hidroxiprolina, realizada no fígado de camundongos normais e de

camundongos infectados com 50 cercárias em três períodos da infecção, demonstrou elevação significativa no teor desse elemento nos animais infectados pelo *S. mansoni* quando comparados com animais normais; embora não houvesse diferenças significantes entre os grupos de animais infectados nas diferentes fases estudadas.

Teores de hidroxiprolina também foram correlacionados com o número de ovos de *S. mansoni* no fígado, ao longo da infecção, sendo verificado correlação positiva desses elementos apenas na fase aguda da infecção, com valor de $p < 0,05$ (gráfico 1). Esses resultados sugerem que, na 8^a semana pós infecção, há uma deposição maciça de fibras colágenas em torno dos ovos depositados no tecido hepático que, com a cronicidade da infecção, passa por uma desaceleração no grau de deposição. Dados similares foram encontrados em trabalhos desenvolvidos por CHEEVER et al. (1994) ao estudarem a evolução natural da infecção pelo *S. mansoni* em camundongos C57Bl/6 e BALB/c. Eles verificaram que o conteúdo de hidroxiprolina, avaliado em μmoles de hidroxiprolina/10.000 ovos, passou por uma elevação de sua quantidade no tecido a partir da 7^a semana atingindo um pico máximo na 12^a, quando então o nível da deposição sofreu uma diminuição gradual até a 20^a semana do estudo.

A análise morfométrica da quantidade de fibras colágenas coradas pelo sirius vermelho também demonstrou aumento expressivo desse elemento no fígado de animais infectados quando comparado com animais normais. Nessa análise não encontramos diferenças significantes entre a fibrose presente nas fases estudadas, o que está de acordo com os resultados obtidos com a dosagem de hidroxiprolina.

Devemos analisar esses resultados levando-se em conta determinados critérios que são: imunomodulação do granuloma esquistossomótico, fatores responsáveis pela degradação da matriz extracelular tais como colagenases, TIMP e a existência de "cross-linking" nas moléculas do colágeno. Em um artigo publicado por CHEEVER (1997) sobre a diferenciação

na regulação do tamanho de granulomas hepáticos e fibrose hepática na infecção pelo *S. mansoni*, nota-se claramente a dissociação entre esses elementos nos diversos trabalhos citados, por levar em conta apenas a média acumulada do aumento de colágeno total, desconsiderando-se os demais parâmetros para sua avaliação.

Estudos realizados em camundongos infectados tratados com excesso de vitamina A por BARBOSA JÚNIOR et al. (1993), demonstraram que muitos fibroblastos e miofibroblastos presentes no granuloma periovular esquistossomótico continham gotículas de gordura no citoplasma e reagiam positivamente para desmina, um marcador para células armazenadoras de gordura, caracterizando o envolvimento dessas células na reação granulomatosa periovular (BOULOUKHERE et al., 1993). Posteriormente MONTEIRO et al. (1995) ao estudarem células isoladas de granulomas hepáticos de camundongos C3H, reconheceram a participação de células não parenquimatosas que seriam mobilizadas durante a agressão tecidual e que estariam envolvidas no processo de reparo tecidual, embora o grupo não tivesse caracterizado o tipo celular envolvido, foi feita uma correlação com o mesmo tipo celular responsável pelo desenvolvimento da fibrose em doenças crônicas hepáticas. As células de Ito situadas espaço de Disse sob a camada de células endoteliais, tendo a capacidade de expressar dois fenótipos. Um fenótipo quiescente no fígado normal que contém gotículas de gordura no seu interior, ricas em vitamina A, com poucas organelas e com baixo nível de proliferação. Na casos de agressão hepática e principalmente na doença hepática crônica, esta célula adquire um fenótipo ativo; diferenciando-se em células semelhantes a miofibroblastos com elevada capacidade proliferativa. Essas células apresentam então retículo endoplasmático proeminente, microtúbulos numerosos e filamentos de actina com condensação sub-membranar (HAUTEKEETE & GREERTS, 1997).

Embora células conjuntivas, armazenadoras de gorduras, tenham sido encontradas isoladas aqui e ali, em diversos órgãos, elas adquirem uma situação e quantidade toda especial

ao nível do fígado. A sua quantidade, posicionamento, relacionamento com os hepatócitos e com as células de Kupffer no fígado cria uma condição toda especial para o microambiente hepático. É aí que possivelmente reside o fator primordial para se compreender o fenômeno da “modulação” do granuloma periovular.

7 COMENTÁRIOS FINAIS

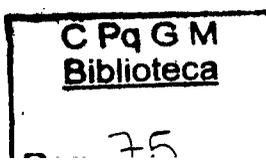
- Nosso estudo confirma que os granulomas periovulares intestinais e pulmonares não variam na composição e na quantidade de elementos da matriz extracelular durante as três fases da infecção.
- A “modulação” é de fato um processo que se passa nos granulomas hepáticos. Estes apresentam maior quantidade de matriz extracelular, demonstrando variação quantitativa e qualitativa desses elementos nos diferentes períodos da infecção.
- A presença de fibras elásticas foi constatada unicamente em alguns granulomas hepáticos presentes na fase crônica.
- O microambiente hepático peculiar cria condições especiais de fundamental importância para explicar o fenômeno da modulação dos granulomas esquistossomóticos e outros fatores (imunológicos, parasitários, etc) exercem uma participação secundária.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABE, T. & COLLEY, D. G. Modulation of *Schistosoma mansoni* egg-induced granuloma formation. III. Evidence for an anti-idiotypic, I-J-positive, I-I-restricted, soluble T suppressor factor. **J. Immunol.**, **132**: 2084-88, 1984.
- AL ADANANI, M.S. Concomitant immunohistochemical localization of fibronectin and collagen in chistosome granuloma. **J. Pathol.**, **147**:77-85, 1985.
- ALMEIDA, M. A. C. & ANDRADE, Z. A. Effect of chemotherapy on experimental pulmonary chistosomiasis. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, **32**: 1049-54, 1983.
- ANDRADE, Z.A. Extracellular matrix and schistosomiasis. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, **86**: 61-73, 1991. Suppl. III.
- ANDRADE, Z.A. Extracellular matrix degradation in parasitic disease. **Brazilian J. Med. Biol. Res.**, **27**:2273-81, 1994.
- ANDRADE, Z. A. & FREITAS, L. A. R. Hyperplasia of elastic tissue in hepatic schistosomal fibrosis. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, **86**: 447-56, 1991.
- ANDRADE, Z. A. & REIS, M. G. Estudo sobre o papel dos eosinófilos na destruição dos esquistossômulos do *Schistosoma mansoni* in vivo. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, **79**: 371-73, 1984
- ANDRADE, Z. A. & SADIGURSKY, M. Um estudo comparativo das cepas de Feira de Santana (Bahia) e Porto Rico do *Schistosoma mansoni* na infecção experimental do camundongo. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, **30**: 37-40, 1985.
- ANDRADE, Z. A. & WARREN, K.S. Mild prolonged Schistosomiasis in mice: alterations in host response with time and the development of portal fibrosis. **Trans. R. Soc. Med. Hyg.**, **58**: 53-7, 1964.
- BARBOSA JÚNIOR, A. A.; PFEIFER, V.; ANDRADE, Z. A. Role of fat-storing cells in schistosomal hepatic fibrosis of mice. **Virchows Arch. B. Cell. Pathol.**, **64**: 91-6, 1993.
- BENTLEY, A. G.; DOUGHTY, B. L.; PHILLIPS, S. M. Ultrastructural analysis of the cellular responses to *Schistosoma mansoni*. I. The *in vitro* granuloma. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, **31**: 1168-80, 1982.
- BENTLEY, A. G.; PHILLIPS, S. M.; KANER, R. J.; THEODORIDES, V.J.; LINETTE, G. D.; DOUGHTY, B. L. *In vitro* delayed hypersensitivity granuloma formation: development of an antigen coated bead model. **J. Immunol.**, **134**: 4163-69, 1985.
- BERGMAN, I. & LOXLEY, R. Two improved and simplified methods for the spectrophotometric determination of hydroxyproline. **Anal. Chem.**, **35**: 1961-65, 1963.

- BIEMPICA, L.; TAKAHASHI, S.; BIEMPICA, S.; KOBAYASHI, M. Immunohistochemical localization of collagen in hepatic murine schistosomiasis. **J. Histochem-Cytochem.**, **31**: 488-94, 1983.
- BLOMHOFF, R. & WAKE, K. Perinusoidal stellate cells of the liver: important roles in retinol metabolism and fibrosis. **FASEB**, **5**: 271-77, 1991.
- BOGEN, E.A.; FLORES VILLANUEVA, P. O.; McCUSKER, M. E.; FOGELMAN, I.; GARIFALLOU, M.; EL-ATTAR, E. R.; KWAN, P.; STADECKER, M. J. *In situ* analysis of cytokine responses in experimental murine schistosomiasis. **Lab. Invest.**, **73**: 252-58, 1995.
- BOLOUKHERE, M.; BALDO-CORREA, E.; BOROJEVIC, R. Experimental schistosomiasis mansoni: characterization of connective tissue cells in hepatic periportal granulomas. **J. Submicrosc. Cytol. Pathol.**, **25**: 505-17, 1993.
- BOROJEVIC, R. Experimental murine schistosomiasis mansoni: establishment of the chronic phase of the disease. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, **87**: 171-4, 1992. Suppl. IV
- BOROS, D. L.; PELLELY, R. P.; WARREN, K. S. Spontaneous modulation of granulomatous hypersensitivity in schistosomiasis mansoni. **J. Immunol.**, **144**: 1437-41, 1975.
- BOROS, D. L. & WARREN, K. S. Characterization of a model system for infectious and foreign body granulomatous inflammation using soluble mycobacterial, histoplasma, and schistosoma antigens. **Immunology**, **24**: 511-29, 1973.
- BOROS, D. L.; WARREN, K. S.; PELLELY, R. P. The secretion of migration inhibitory factor by intact schistosome egg granulomas maintained *in vitro*. **Nature**, **246**: 224-26, 1973.
- BRYRAN, J. E. & LICHENBERG, F. Von, Altered schistosome granuloma formation in nude mice. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, **26**: 944-56, 1977.
- BURGESS, W.H. & MACIAG, T. The heparin-binding (fibroblast) growth factor family of proteins. **Ann. Rev. Biochem.**, **58**: 575-606, 1989.
- CASU, A.; CANEPA, M.; NANNI, G. Le cellule stellate perisistolali o cellule di Ito ed il loro ruolo nella fibrosi epatica. **Pathologica.**, **86**: 467-99, 1994.
- CHEEVER, A. W. Relative resistance of the eggs of human schistosomes to digestion in potassium hydroxide. **Bull. World Health Organ.**, **43**: 601-03, 1970.
- CHEEVER, A. W. Differential regulation of granuloma size and hepatic fibrosis in schistosome infections. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, **92**: 689-92, 1997.
- CHEEVER, A. W.; DUNN, M. A.; DEAN, D.A.; DUVALL, R. H. Differences in hepatic fibrosis in ICR, C3H, and C57BL/6 mice infected with *Schistosoma mansoni*. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, **32**: 1364-69, 1983.

- CHEEVER, A. W.; MOSIMANN, J. E.; DEB, S.; CHEEVER, E. A.; DUVALL, R. H. Natural history of *Schistosoma mansoni* infections, egg passage in the feces, and contribution of host and parasite death to changes in worm numbers. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** **50**: 269-80, 1994.
- CHENSUE, S. W. & BOROS, D. L. Modulation of granulomatous hypersensitivity I. Characterization of T lymphocytes involved in the adoptive suppression of granuloma formation in *Schistosoma mansoni*-infected mice. **J. Immunol.**, **123**: 1409-14, 1979.
- CHENSUE, S. W.; BOROS, D. L.; DAVID, C. S. Regulation of granulomatous inflammation in murine schistosomiasis. *In vitro* characterization of T-lymphocyte subsets involved in the production and suppression of migration inhibitor factor. **J. Exp. Med.**, **151**: 1398-412, 1980.
- CHENSUE, S. W.; WARMINGTON, K.S.; HERSHEY, S. D. TEREBUH, P. D.; OTHMAN, M.; KUNKEL, S.L. Evolving T-cell responses in murine schistosomiasis. Th2 cells mediate secondary granulomatous hypersensitivity and are regulated by CD8+ T cell *in vivo*. **J. Immunol.**, **151**: 1391-400, 1993.
- CHENSUE, S. W.; WARMINGTON, K.S.; RUTH, J.; LINCOLN, P. M.; KUNKEL, S. L. Cross-regulatory role of interferon-gamma (INF-gamma), IL-4 and IL-10 in chistosome egg granuloma formation: *in vivo* regulation of Th activity and inflammation **Clin. Exp. Immunol.**, **98**: 395-400, 1994.
- CHENSUE, S. W.; WELLHAUSEN, S. R.; BOROS, D. L. Modulation of granulomatous hypersensitivity. II. Participation of Lyt1+ and Lyt2+ T lymphocytes in the suppression of granuloma formation and lymphokine production in *Schistosoma mansoni*-infected mice. **J. Immunol.**, **127**: 363-67, 1981.
- COLLEY, D. G. Adoptive suppression of granuloma formation. **J. Exp. Med.**, **143**: 696-700, 1976.
- COLLEY, D. G. T lymphocytes that contribute to the immunoregulation of granuloma formation in chronic murine schistosomiasis. **J. Immunol.**, **126**: 1465-68, 1981.
- COLLEY, D. G.; LEWIS, F. A.; TODD, C. W. Adoptive suppression of granuloma formation by lymphoid cells sensitive to cyclophosphamide. **Cell Immunol.**, **46**: 192-200, 1979.
- COLLEY, D. G.; PARRA, J.C.; MONTESANO, M. A. Immunoregulation in human schistosomiasis by idiotypic interactions and lymphokine mediated mechanisms. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, **82**: 105-09, 1987.
- COUISSINIER, P. P. & DESSEIN, A. J. Schistosoma-specific helper T cell clones from subjects resistant to infection by *Schistosoma mansoni* are Th0/2. **Eur. J. Immunol.**, **25**: 2295-302, 1995.
- COUTINHO, E. M.; SOUZA, M. M.; SILVA, L. M.; CAVALCANTI, R. E. A.; BARBOSA JÚNIOR, A.; CHEEVER, A.W.; ANDRADE, Z. A. Pathogenesis of schistosomal "pipstem" fibrosis: a low-protein diet inhibits the development of "pipstem" fibrosis in mice. **Int. J. Exp. Pathol.** **78**: 337-42, 1997.



- DOENHOFF, M. J.; MUSALLAM, R.; BAIN, J.; MCGREGOR, A. Studies on the host-parasite relationship in *Schistosoma mansoni*-infected mice: the immunological dependence of parasite egg excretion. **Immunology**, **35**: 771-78, 1978.
- DOMINGO, E. O.; COWAN, R. B. T.; WARREN, K. S. The inhibition of granuloma formation around *Schistosoma mansoni* eggs. I. Immunosuppressive drugs. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, **16**: 284-92, 1967.
- DOMINGO, E. O. & WARREN, K. S. The inhibition of granuloma formation around *Schistosoma mansoni* eggs: II. Thymectomy. **Am. J. Pathol.**, **51**: 757-67, 1967.
- DOMINGO, E. O. & WARREN, K. S. The inhibition of granuloma formation around *Schistosoma mansoni* eggs: III. Heterologous antilymphocyte serum. **Am. J. Pathol.**, **52**: 613-31, 1968.
- DOUGHTY, B. L.; GOES, A. M.; PARRA, J. C.; ROCHA, R.; CONE, J. C.; COLLEY, D. G.; GAZZINELI, G. Anti-idiotypic T cells in human schistosomiasis. **Immunol. Invest.**, **18**: 373-88, 1989.
- DOUGHTY, B. L. & PHILLIPS, S. M. Delayed hypersensitivity granuloma formation around *Schistosoma mansoni* eggs *in vitro*. I. Definition of the model. **J. Immunol.**, **128**: 30-6, 1982.
- DOUGHTY, B. L. & PHILLIPS, S. M. Delayed hypersensitivity granuloma formation and modulation around *Schistosoma mansoni* eggs *in vitro*. I. Regulatory T cell subsets. **J. Immunol.**, **128**: 37-42, 1982a.
- EDUNGBOLA, L. D. & SCHILLER, L. E. Histopathology of hepatic and pulmonary granulomata experimentally induced with eggs of *Schistosoma mansoni*. **J. Parasitol.**, **65**: 253-61, 1979.
- ENZAN, H.; HIMENO, H.; IWAMURA, T.; SAIBARA, T.; ONISHI, S.; YAMAMOTO, Y.; MIYAZAKI, E.; HARA, H. Sequential changes in human Ito cells and their relation to postnecrotic liver fibrosis in massive and submassive hepatic necrosis. **Virchows Arch.**, **426**: 95-101, 1995.
- FLORES VILLANUEVA, P. O.; CHIKUNGOWO, S. M.; HARRIS, T. S.; STADECKER, M. J. The role of IL-10 on antigen-presenting cell function for schistosomal egg-specific monoclonal T helper cell responses *in vitro* and *in vivo*. **J. Immunol.**, **151**: 3192-98, 1993.
- FLORES VILLANUEVA, P.O.; HARRIS, T. S.; RICKLAN, D.E.; STADECKER, M. J. Macrophages from schistosomal egg granulomas induce responsiveness in specific cloned Th-1 lymphocytes *in vitro* and downregulate schistosomal granulomatous disease *in vivo*. **J. Immunol.**, **152**: 1847-55, 1994.
- GAJEWSKI, T. F.; JOYCE, J.; FITCH, F. W. Anti-proliferative effect of INF- γ in immune regulation. I. IFN- γ inhibits the proliferation of Th2 but not Th1 murine helper T lymphocyte clones. **J. Immunol.**, **140**: 4245-52, 1989.

- GRESSNER, A. M & BACHEM, M. G. Cellular communications and cell-matrix interactions in the pathogenesis of fibroproliferative diseases: liver fibrosis as a paradigm. **Ann. Biol. Clin.**, **52**: 205-226, 1994.
- GRESSNER, A. M. & ZERBE, O., Kupffer cell-mediated induction of synthesis and secretion of proteoglycans by rat liver fat-storing cells in culture. **J. Hepatol.**, **5**: 299-310, 1987.
- GRIMAUD, J. A.; BOROS, D. L.; TAKIYA, C.; MATHEW, R. C. EMONARD, H. Collagen isotypes, laminin, and fibronectin in granulomas of liver and intestines of *Schistosoma mansoni*-infected mice. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, **37**: 335-44, 1987.
- GRIMAUD, J. A. Cell-matrix interactions in schistosomal portal fibrosis: a dynamic event. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, **82**: 55-65, 1987. Suppl. IV.
- GRZYCH, J. M.; PEARCE, E. J.; CHEEVER, A. W.; CAULADA, Z.A.; CASPAR, P.; HEINY, S.; LEWIS, F.; SHER, A. Egg deposition is the major stimulus for the production of the Th2 cytokines in murine Schistosomiasis mansoni. **J. Immunol.**, **146**: 1322-27, 1991.
- HAUTEKEETE, M. & GEERTS, A. The hepatic stellate (Ito) cell: its role in human liver disease. **Virchow Arch.** **430**: 195-207, 1997.
- HENDERSON, G. S.; LU, X., McCURLEY, T. L.; COLLEY, D. G. *In vivo* molecular analysis of lymphokines involved in the murine immune response during *Schistosoma mansoni* infection: II. Quantitation of IL-4 mRNA, IFN- γ mRNA, and IL-2 mRNA levels in the granulomatous livers, mesenteric lymph nodes, and spleens during the course of modulation. **J. Immunol.**, **148**: 2261-69, 1992.
- HSÜ, S. Y. L.; HSÜ, H. F.; DAVIS, J. R.; LUST, G. L. Comparative studies on the lesions caused by eggs of *Schistosoma japonicum* and *Schistosoma mansoni* in liver of albino mice and rhesus monkeys. **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, **66**: 89-97, 1972.
- ISHAI-MICHAELI, R.; ELDOR, A.; VLODAVSKY, I. Heparanase activity expressed by platelets, neutrophils, and lymphoma cells release active fibroblast growth factor from extracellular matrix. **Cell Regul.** **1**: 833-42, 1990.
- JAMES, S. L. & COLLEY, D. G. Eosinophilic and immune mechanisms. Production of the lymphokine eosinophil stimulation promoter (ESP) *in vitro* by isolated intact granulomas. **J. Rediculoendothel. Soc.**, **18**: 283-93, 1975.
- JANKOVIC, D. & SHER, A. Initiation and regulation of CD4+ T-cell function in host-parasite models. **Chem. Immunol.**, **63**: 51-65, 1996.
- JOSEPH, A.L. & BOROS, D. L. Tumor Necrosis Factor plays a role in *Schistosoma mansoni* egg-induced granulomatous inflammation. **J. Immunol.**, **151**: 5461-71, 1993.
- JUNQUEIRA, L. C. U.; BIGNOLAS, G.; BRENTANI, R. Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. **Histochemistry**, **1**: 447-55, 1979.

- JUNQUEIRA, L. C. U.; MONTES, G. E.; TOLEDO, O. M. S.; JOAZEIRO, P. P. morphological, histochemical and biochemical observations on the connective tissue matrix of in situ and isolated hepatic granulomas in experimental murine schistosomiasis. **Ann. Trop. Med. Parasit.**, **80**: 27-41, 1986.
- KULLBERG, M. C.; PEARCE, E. J.; HIENY, S. E.; SHER, A.; BERZOFSKY, J. A. Infection with *Schistosoma mansoni* alters Th1/Th2 cytokine responses to a non-parasite antigen. **J. Immunol.**, **148**: 3264-70, 1992.
- LAMMIE, P. J.; LINETTE, G. P.; PHILLIPS, S. M. Characterization of *Schistosoma mansoni* antigen-reactive T cell clones that form granulomas *in vitro*. **J. Immunol.**, **134**: 4170-75, 1985.
- LENZI, H. L.; LENZI, J. A.; KERR, I. B.; ANTUNES, S. L. G.; MOTA E. M.; OLIVEIRA, D. N. Extracellular matrix in parasitic and infectious diseases. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, **86**: 77-90, 1991. Suppl. III.
- LEPTAK, C. & McKERROW, J. H. Schistosome eggs granulomas and hepatic expression of TNF- α are dependent on immune priming during parasite maturation. **J. Immunol.**, **158**: 301-07, 1997.
- LICHTENBERG, F. Von. Host response to eggs of *S. mansoni* I. Granuloma formation in the unsensitized laboratory mouse. **Am. J. Pathol.**, **41**: 711-13, 1962.
- LUKCAS, N.W. & BOROS, D.L. Lymphokine regulation of granuloma formation in murine schistosomiasis mansoni. **Clin. Immunol. Immunopathol**, **68**: 57-63, 1993.
- MAJNO, G. & JORIS, I. Cell, Tissue, and Disease. Principles of General Pathology. Chronic Inflammation. Oxford: Blackwell Science, 1996. p.429-63.
- MARCOS, S.H.; KHAYAL, M. T.; MANSOUR, M. M.; SALEH, S.; ISHAK, E. A.; GIRGIS, N. I.; DUNN, M.A. Reversal of hepatic fibrosis after praziquantel therapy of murine schistosomiasis. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, **34**: 314-321, 1985.
- MARTINEZ-HERNANDEZ, A. & AMENTA, P. S. The extracellular matrix in hepatic regeneration. **FASEB**, **9**: 1401-10, 1995.
- MATHEW, R. C. & BOROS, D. L. Anti L3T4 antibody treatment suppresses hepatic granuloma formation and abrogates antigen-induced interleukin 2 production in *Schistosoma mansoni* infection. **Infect. Immun.**, **54**: 820-26, 1986.
- McKERROW, J. H. Cytokine induction and exploitation in schistosome infections. **Parasitology**, **115**: 107-12, 1997.
- METWALI, A.; ELLIOTT, D.; MATHEW, R.; BLUM, A.; WEISTOCK, J. IL-2 contributes to the IL-5 response in granulomas from mice infected with *Schistosoma mansoni*. **J. Immunol.**, **150**: 536-42, 1993.
- MONTEIRO, A. N.; GEREMIAS, A. T.; BOROJEVIC, R. Clonal heterogeneity in murine liver myofibroblasts. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, **28**: 457-66, 1995.

- MOORE, D. L.; GROVE, D. I.; WARREN, K. S. The *Schistosoma mansoni* egg granuloma: quantitation of cell populations. **J. Pathol.**, **121**: 41-50, 1977.
- MURPHY, D.G. & REYNOLDS, J.J. Extracellular matrix degradation. In: BOYCE P. M. & STEINMANN, B. (Editors), Connective tissue and its heritable disorders. **Wiley-Liss, Inc., New York**, 287-316, 1993.
- OSWALD, I. P.; WYNN, T.A.; SHER, A.; JAMES, S. L. Interleukin 10 inhibits macrophages microbicidal activity by blocking the endogenous production of tumor necrosis factor alpha required as a costimulatory factor for interferon gamma-induced activation. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A** **89**: 8676-80, 1992.
- NISHIMURA M.; ASAH, M.; HAYASHI, M.; TAKAZONO, I.; TANAKA, Y. KOHDA, H; URABE, H. Extracellular matrix in hepatic granulomas of mice infected with *Schistosoma mansoni*. **Arch. Pathol. Lab. Med.**, **109**: 813-18, 1985.
- PAPADIMITRIOU, J. M. & BRUGGENI Van, Evidence that multinucleate giant cell are examples of mononuclear phagocytic differentiation. **J. Pathol.**, **148**: 149-57, 1986.
- PAPADIMITRIOU, J.M.; ROBERTSON, T. A.; WALTERS, M. N-I. An analysis of the phagocytic potential of multinucleate foreign body giant cells. **Am. J. Pathol.**, **78**: 343-58, 1975.
- PARISI, E. R.; SUMMERFIELD, D.A.; HAHN, E. WIEDMANN, K. H.; DOENHOFF, M. J. Basement membrane proteins and type III procollagen in murine schistosomiasis. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, **79**: 663-70, 1985.
- PARRA, J. C. GAZZINELLI, G.; GOES, A. M.; MOYES, R. B.; ROCHA, R.; COLLEY, D. G.; DOUGHTY, B. L. Granulomatous hypersensitivity to *Schistosoma mansoni* egg antigens in human schistosomiasis. II. *In vitro* granuloma modulation induced by polyclonal idiotypic antibodies. **J. Immunol.**, **147**: 3949-54, 1991.
- PEARCE, E. J.; CHEEVER, A. W.; LEONARD, S.; COVALESKY, M.; FERNANDEZ-BOTRAN, R.; KOHLER, G.; KOPF, M. Schistosomiasis in IL-4 deficient mice. **Int. Immunol.**, **8**: 435-44, 1996.
- PERROTO, J. L. & WARREN, K. S. The inhibition of granuloma formation around *Schistosoma mansoni* eggs: IV. X-irradiation. **Am. J. Pathol.**, **56**: 279-91, 1969.
- PHILLIPS, S. M. ; DICONZA, I. J.; GOLD, J. A; REID, A. W. Schistosomiasis in the congenitally athymic (nude) mouse. I. Thymic dependency of eosinophilia granuloma formation, and host morbidity. **J. Immunol.**, **118**: 594-99, 1977.
- PHILLIPS, S. M.; REID, W. A.; DOUGHTY, B. L. The immunologic modulation of morbidity in schistosomiasis studies in athymic mice and *in vitro* granuloma formation. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, **29**: 820-31, 1980.
- PRATA, A. **Biopsia retal na esquistossomose mansoni: bases e aplicações no diagnóstico e tratamento.** São Paulo: Serviço Nacional de Educação Sanitária, 1957.

- ROJKIND, M. & GREENWEL, P. The extracellular matrix of the liver. *The Liver: Biology and Pathology*. Third Edition, **Raven Press, Ltd., New York**, 1994.
- SABIN, E. A. & PEARCE, E.J. Early IL-4 production by non-CD4+ cells at the site of antigen deposition predicts the development of a T helper 2 cell response to *Schistosoma mansoni* eggs. **J. Immunol.**, **155**: 4844-53, 1995.
- SAKSELA, O. & RIFKIN, D. B. Release of basic fibroblast growth factor-heparn sulfate complexes from endothelial cell by plasminogen activator-mediated proteolytic activity. **J. Cell Biol.**, **110**: 767-75, 1990.
- SANTOS, R. O.; BARBOSA JÚNIOR, A. A.; ANDRADE, Z. A. Dynamics of fibrosis production and resorption in intestinal schistosomiasis of mice. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.**, **87**: 25-31, 1992.
- SCHEUER, P. & MAGGI. Hepatic fibrosis and collapse: histological distinction by orcein staining. **Histopatology**, **4**: 487-90, 1980.
- SHER, A.; FIORENTINO, D.; CASPAR, P.; PEARCE, E.; MOSMANN, T. Production of IL-10 by CD4+ T lymphocytes correlates with downregulation of Th1 cytokine synthesis in helminth infection. **J. Immunol.**, **147**: 2713-16, 1991.
- SILVA, T. D.; FERREIRA, M. G.; NOGUEIRA, M. J. A.; DOUGHT, B. L.; GOES, A. M. Human giant cell formation induced *in vitro* by *Schistosoma mansoni* antigens. **Braz. J. Med. Res.**, **26**: 609-13, 1993.
- SOUZA VIDAL, M. R. F.; BARBOSA JÚNIOR, A. A.; ANDRADE, Z.A. Experimental pulmonary schistosomiasis: lack of morfological evidence of modulation in schistosomal pulmonary granulomas. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo**, **33**: 423-29, 1992.
- STENGER, R. J. ; WARREN, K. S.; JOHNSON, E. A. An ultrastructural study of hepatic granulomas and schistosome egg shells in murine hepatosplenic Schistosomiasis mansoni. **Exp. Mol. Pathol.**, **7**: 116-32, 1967.
- TAKAHASHI, S. DUNN, M. A.; SEIFTER, S. Liver collagenase in murine schistosomiasis. **Gastroenterology**, **78**: 1425-31, 1980.
- TAKIYA, C.; LENOIR, J.; GRIMAUD, J. A. Isolation and preparation of acellular schistosomal granuloma (periovular matricial complex, PMC). **Cell. Mol. Biol.**, **32**: 647-53, 1986.
- WARREN. K. S. Pathophysiology and pathogenesis of hepatosplenic schistosomiasis. **Bull. N. Y. Acad. Med.**, **44**: 280-94, 1968.
- WARREN, K. S. DOMINGO, E. O.; COWAN, R. B. T. Granuloma formation around schistosome eggs as a manifestation of delayed hypersensitivity. **Am. J. Pathol.**, **51**: 735-56, 1967.
- WARREN, K. S.; MERGENHAGEN, S. E. Collagenase production by endotoxin-acheived macrophages. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, **71**: 3598-602, 1974.

- WEIBEL, E. Stereological principles for morphometry in electron microscopic cytology. **Int. Rev. Cytol.**, **26**: 235-302, 1969.
- WEINSTOCK, J. V. & BOROS, D. L. Heterogeneity of the granulomatous response in the liver, colon, ileum, and ileal Peyer's patches to schistosome eggs in murine schistosomiasis mansoni. **J. Immunol.**, **127**: 1906-09, 1981.
- WEINSTOCK, J. V. & BOROS, D. L. Organ-Dependent differences in composition and function observed in hepatic and intestinal granulomas isolated from mice with schistosomiasis mansoni. **J. Immunol.**, **130**: 418-22, 1983.
- WU, C. H.; GROMBRONE, M. A.; HOWARD, D. J.; ROJKIND, M.; WU, G. J. The nature of the collagen in hepatic fibrosis in advanced schistosomiasis. **Hepatology**, **2**: 366-71, 1982.
- WYNN, T. A. & CHEEVER, A.W. Cytokine regulation of granuloma formation in schistosomiasis. **Curr. Opin. Immunol.**, **7**: 505-01, 1995.
- WYNN, T. A.; ELTOUM, I.; CHEEVER, A.W.; LEWIS, F.A.; GAUSE, W.C.; SHER, A. Analysis of cytokine mRNA expression during primary granuloma formation induced by eggs of *Schistosoma mansoni*. **J. Immunol.**, **151**: 1430-40, 1993.
- WYNN, T. A.; ELTOUM, I.; OSWALD, I.P.; CHEEVER, A. W.; SHER, A. Endogenous interleukin 12 (IL-12) regulates granuloma formation induced by eggs of *Schistosoma mansoni* and exogenous IL-12 both inhibits and prophylactically immunizes against egg pathology. **J. Exp. Med.**, **179**: 1551-61, 1994.
- WYNN, T. A.; JANKOVIC, D.; HIENY, S.; ZIONCHECK, K.; JARDIEU, P.; CHEEVER, A. W.; SHER, A.. IL-12 exacerbates rather than suppresses the T-helper-2-dependent pathology in the absence of endogenous IFN-gamma. **J. Immunol.**, **154**: 3999-4009, 1995.
- XU, Y.; MACEDONIA, J.; SHER, A.; PEARCE, E.; CHEEVER, A. W. Dynamic analysis of splenic Th1 and Th2 lymphocyte function in mice infected with *Schistosoma japonicum*. **Infect. Immun.**, **59**: 2934-40, 1991.
- YAMASHITA, T. & BOROS, D. L. IL-4 influences IL-2 production and granulomatous inflammation in murine schistosomiasis mansoni. **J. Immunol.**, **149**: 3659-64, 1992.
- ZHU, Y.; LUCKAS, N. W.; BOROS, D.L. Cloning of Th0 and Th2-type helper lymphocytes from liver granulomas of *Schistosoma mansoni*-infected mice. **Infect. Immunol.**, **62**: 994-9, 1994.