

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO AGGEU MAGALHÃES
Doutorado em Biociências e Biotecnologia em Saúde

Tiago Pinheiro Vaz De Carvalho

**ESTUDO EXPERIMENTAL DA NEUROESQUISTOSSOMOSE: AVALIAÇÃO DA
RESPOSTA MORFOFISIOPATOLÓGICA**

Recife
2019

Tiago Pinheiro Vaz De Carvalho

**ESTUDO EXPERIMENTAL DAS FORMAS ECTÓPICAS DA
ESQUISTOSSOMOSE: AVALIAÇÃO DA RESPOSTA MORFOFISIOPATOLÓGICA**

Tese apresentada ao Curso de Doutorado em Biociências e Biotecnologia em Saúde do Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, como requisito para a obtenção do título em Doutor em Ciências.

Orientadoras: Dra. Constança Clara Gayoso Simões Barbosa.

Dra. Christina Alves Peixoto

Dra. Elaine Christine de Souza Gomes

Recife

2019

Catálogo na fonte: Biblioteca do Instituto Aggeu Magalhães

C331e Carvalho, Tiago Pinheiro Vaz.

Estudo experimental da neuroesquistossomose: avaliação da resposta morfofisiopatológica / Tiago Pinheiro Vaz Carvalho. - Recife: [s.n.], 2019.

89 p. : il., graf., tab. ; 30 cm

Tese (Doutorado em Biociências e Biotecnologia em Saúde) - Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, 2019.

Orientadoras: Constança Clara Gayoso Simões Barbosa, Christina Alves Peixoto, Elaine Christine de Souza Gomes.

1. Neuroesquistossomose. 2. Schistosoma mansoni. 3. Modelos Animais. 4. Medidas da dor. I. Barbosa, Constança Clara Gayoso Simões. II. Peixoto, Christina Alves. III. Gomes, Elaine Christine de Souza. IV. Título.

CDU 616.995.122

Tiago Pinheiro Vaz De Carvalho

**ESTUDO EXPERIMENTAL DAS FORMAS ECTÓPICAS DA
ESQUISTOSSOMOSE: AVALIAÇÃO DA RESPOSTA MORFOFISIOPATOLÓGICA**

Tese apresentada ao Curso de Doutorado em Biociências e Biotecnologia em Saúde do Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, como requisito para a obtenção do título em Doutor em Ciências.

Data de Aprovação: 08 / 03 / 2019

Banca Examinadora

Dra. Clarice Neuenschwander Lins de Morais
Instituto Aggeu Magalhães - FIOCRUZ

Dra. Sheilla Andrade de Oliveira
Instituto Aggeu Magalhães - FIOCRUZ

Dra. Karina Conceição G. Machado de Araújo
Universidade Federal de Sergipe - UFS

Dra. Amanda Karolina Soares e Silva
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Dra. Christina Alves Peixoto
Instituto Aggeu Magalhães - FIOCRUZ

AGRADECIMENTOS

Qual o motivo de se realizar um doutorado e por que sua duração é tão extensa? Não é porque se realiza um projeto mais elaborado, ou muitas vezes mais caro, o motivo de verdade é para que você conheça mais pessoas e adquira mais vivências. O resultado disso é o amadurecimento profissional e pessoal.

O início de minha trajetória nesta pós-graduação coincidiu também com a revelação de um Pai que não conhecia tão bem: Deus. Obrigado por todas as experiências vivenciadas nesses quatro anos, mesmo eu fugindo de ti, você sempre me aparou e me mostrou uma nova maneira de compreender a vida. Dentre tantas coisas boas, você me apresentou minha esposa Cecília Quintella, a quem devo imensa gratidão, compartilhamos muitas experiências boas e ruins e não há dúvida que seu amparo foi chave para mim. Agradeço também por minha família, peças chave para a formação de meu caráter e construção dos meus princípios. Minha mãe Simone Pinheiro, meu Pai Ney Carvalho, Tia Silvana Pinheiro, Avós José Pinheiro e Maria Anita Bispo e irmã Bruna Carvalho, saibam que nossa distância é apenas física, mas meu pensamento está e estará sempre com vocês.

Há também a família adquirida, agradeço a todos do Instituto Aggeu Magalhães que participaram desta jornada: toda a turma BBS de 2015, ao laboratório de esquistossomose, ao laboratório de ultraestrutura, ao biotério experimental, programa de pós graduação em BBS e todos os funcionários que fazem esta instituição funcionar. Obrigado também as minhas orientadoras Constança Barbosa, Christina Peixoto e Elaine Gomes por acreditarem em mim e tornarem este sonho possível, sou grato por todo o conhecimento passado por vocês.

Diante de tudo eu me questiono: qual o real valor de um doutorado? Não é o título, status ou auxílio financeiro temporário, mas sim o desejo de mudar a sociedade, de ajudar o próximo com seu conhecimento adquirido, formar cidadãos e pela convivência com pessoas, isso sim vale a pena. Irmãos, os levarei comigo aonde for.

Obrigado a todos!

“Para ser sábio, é preciso primeiro temer a Deus, o SENHOR. Os tolos desprezam a sabedoria e não querem aprender.”

Provérbios 1:7.

CARVALHO, Tiago Pinheiro Vaz. **Estudo experimental da neuroesquistossomose: avaliação da resposta morfofisiopatológica**. 2019. Tese (Doutorado em Biociências e Biotecnologia em Saúde) – Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2019.

RESUMO

Este é o primeiro estudo realizado para analisar se existe alguma relação entre o esforço físico e o surgimento da neuroesquistossomose, através de avaliações clínicas, moleculares e imunológicas. O estudo foi dividido em dois momentos: o primeiro investigou a causa de óbitos dos camundongos infectados com *S. mansoni*, já o segundo aborda o modelo de neuroesquistossomose em camundongos baseado em esforços físicos. O primeiro momento revelou que em um período de oito meses, 60% dos óbitos foram decorrentes de isquemia mesentérica e por isso reduziu a carga parasitária infecciosa dos camundongos para aumentar sua sobrevivência. Já no segundo momento utilizou-se 64 camundongos Balb/c *inbred* machos divididos em quatro grupos (n=16) de acordo com a presença ou ausência de infecção por *S. mansoni* e realização de esforço físico ou repouso. Aplicou-se o protocolo de esforço físico nos animais do grupo “esforço físico” e analisou-se a sensibilidade tátil, força e desempenho motor de todos os animais. Após a 13ª semana o sistema nervoso central (SNC) foi analisado pela imuno-histoquímica (anti *S. mansoni*, GFAP, IBA, IL1, IL10, TNF- α e TGF- β) e a investigação de DNA do parasito através da *Nested PCR conventional*. Os testes neurofuncionais e imunohistoquímicos foram analisados através do software GraphPad Prism V7.0 considerando o valor de $p < 0,05$. Os testes comportamentais não evidenciaram sintomas clínicos de neuroesquistossomose em animais submetidos a esforço físico ou em repouso, todavia o DNA de *S. mansoni* foi detectado no SNC em 30,43% dos animais infectados, além disso, as amostras positivas para *S. mansoni* mostraram marcação positiva para antígenos de *S. mansoni* no SNC, com uma evidente reação microglial, níveis elevados de IL-10 e diminuição da expressão de TNF- α . Este estudo demonstrou que neuroesquistossomose não depende do esforço físico, é amplamente assintomática e tende a apresentar um perfil de resposta imune Th2.

Palavras-chave: Neuroesquistossomose. *Schistosoma mansoni*. Modelos Animais. Teste de Nocicepção.

CARVALHO, Tiago Pinheiro Vaz. **Experimental study of neuroschistosomiasis: evaluation of the morphophysiological response.** 2019. Thesis (Doctor's Degree in Bioscience and Health Biotechnology) – Institute Aggeu Magalhães, Oswaldo Cruz Foundation, Recife, 2019.

ABSTRACT

This is the first study performed to analyze whether there is any relationship between physical effort and the onset of neuroschistosomiasis, through clinical, molecular and immunological evaluations. The study was divided in two moments: the first one investigated the cause of death of the *S. mansoni* infected mice, while the second one approaches the neuroschistosomiasis model in mice based on physical efforts. The first moment revealed that in a period of eight months, 60% of the deaths were due to mesenteric ischemia and therefore reduced the parasitic infectious load of the mice to increase their survival. In the second moment, 64 male Balb/c mice were divided into four groups (n = 16) according to the presence or absence of *S. mansoni* infection and physical exertion or rest. The physical effort protocol was applied to the animals of the "physical effort" group and the tactile sensitivity, strength and motor performance of all animals were analyzed. After the 13th week the central nervous system (CNS) was analyzed by immunohistochemistry (anti *S. mansoni*, GFAP, IBA, IL1, IL10, TNF- α and TGF- β) and DNA analysis of the parasite through Nested PCR conventional. Neurofunctional and immunohistochemical tests were analyzed using the GraphPad Prism V7.0 software considering the value of p <0.05. Behavioral tests did not show clinical symptoms of neuroschistosomiasis in animals submitted to physical or resting effort. However, *S. mansoni* DNA was detected in the CNS in 30.43% of the infected animals, in addition, *S. mansoni* positive samples showed positive marking for *S. mansoni* antigens in the CNS, with an evident microglial reaction, elevated levels of IL-10 and decreased expression of TNF- α . This study demonstrated that neuroschistosomiasis do not depend of physical effort, is largely asymptomatic and tends to present a Th2 immune response profile.

Keywords: Neuroschistosomiasis. *Schistosoma mansoni*. Models, Animals. Nociception Test.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Ciclo da esquistossomose.....	16
Figura 2- Conexão entre o plexo de Batson e a veia porta.	20
Figura 3- Representação do plexo de Batson.	21
Figura 4- Representação gráfica das populações celulares envolvidas na formação do granuloma hepático ao redor do ovo de <i>S. mansoni</i> em um camundongo.	26
Quadro 1- Classificação da morfologia intestinal de isquemia mesentérica.....	29
Figura 5- Divisão dos grupos do experimento por via percutânea com infecção estimada de 50 cercárias por animal.....	33
Figura 6- Linha do tempo esquemática do experimento.....	34
Figura 7- Testes neurofuncionais ao longo do tempo.....	39
Figura 8- NPCR para detectar DNA de <i>S. mansoni</i> no sistema nervoso central.	40
Figura 9- Análise imunohistoquímica para <i>S. mansoni</i> em tecido hepático do grupo controle.	42
Figura 10- Análise imunohistoquímica de GFAP no cérebro e medula espinhal.	44
Figura 11- Análise imunohistoquímica de IBA no cérebro e medula espinhal.	45
Figura 12- Análise imunohistoquímica de IL-1 no cérebro e medula espinhal.	46
Figura 13- Análise imunohistoquímica de TNF- α no cérebro e medula espinhal.	47
Figura 14- Análise imunohistoquímica de TGF- β no cérebro e na medula espinhal.	48
Figura 15- Análise imunohistoquímica de IL-10 no cérebro e medula espinhal.	49

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CONCEA	-	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
DP	-	Desvio Padrão
ECP	-	Proteína Catiônica do Eosinófilo
FGF	-	Fator de Crescimento Fibroblástico
GFAP	-	Proteína Ácida Fibrilar Glial
HE	-	Hematoxilina-eosina
IAM	-	Instituto Aggeu Magalhães
LCR	-	Líquido Cefalorraquidiano
MIN	-	Minutos
MMII	-	Membros Inferiores
MRE	-	Mielorradiculopatia Esquistossomótica
NPCR	-	Nested PCR conventional
PBS	-	Tampão fosfato-salino
S	-	Segundos
SBCAL	-	Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório
SNC	-	Sistema Nervoso Central
VEGF	-	Fator de Crescimento Endotelial Vascular
VIM	-	Vimentina
µl	-	microlitro

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REFERENCIAL TEÓRICO	15
2.1	A esquistossomose	15
2.2	Classificação Clínica	17
2.3	Formas Ectópicas	18
2.4	Neuroesquistossomose	19
2.5	Diagnóstico da Neuroesquistossomose	22
2.6	Imunopatogênese da Esquistossomose	23
2.7	Modelos Animais	26
3	OBJETIVO GERAL	29
4	MATERIAL E MÉTODOS	30
4.1	Metodologia do objetivo A	30
4.2	Metodologia dos objetivos B a D	32
4.2.1	Infecção	33
4.2.2	Grupos	34
4.2.3	Protocolo de treinamento físico	34
4.2.4	Testes comportamentais	35
4.2.5	Nested PCR	36
4.2.6	Análise Estatística	37
4.2.7	Considerações éticas	37
5	RESULTADOS	38
5.1	Resultados do objetivo A	38
5.2	Resultados dos objetivos B, C e D	38
5.2.1	Diagnóstico molecular de <i>S. mansoni</i>	40
5.2.2	Resposta neuroinflamatória	43
6	DISCUSSÃO	50
7	CONCLUSÃO	55
	REFERÊNCIAS	56
	APÊNDICE A – ARTIGO MODELO DE MRE	66
	APÊNDICE B – POP APARATO DE ISOMETRIA	72
	APÊNDICE C – ARTIGO DO OBJETIVO A	75

ANEXO A – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISAS ANIMAIS....89

1 INTRODUÇÃO

A esquistossomose é uma doença parasitária grave, de veiculação hídrica e evolução crônica e ocorre em áreas tropicais e subtropicais, sobretudo em comunidades com precárias condições de abastecimento de água e esgotamento sanitário. Trata-se de uma das doenças parasitárias mais prevalentes no mundo (ZHANG et al., 2010). Pernambuco é um dos estados mais endêmicos do país com prevalências de até 80% e evidências sugerem a expansão desta endemia (BARBOSA; SILVA, 1992; BRASIL, 2013).

Embora o aparelho digestivo seja o primeiro sistema humano a ser afetado pelos ovos do parasito *Schistosoma mansoni*, esses podem atingir outros sistemas causando as formas ectópicas, incluindo aquelas que comprometem o sistema nervoso central (SNC), apontada como uma das principais causas entre as mielopatias não traumáticas. As formas clínicas neurológicas, em que o sistema nervoso é comprometido pelo *S. mansoni* estão entre as mais graves da doença (STEINMANN et al., 2006).

Acredita-se que o aparecimento de formas ectópicas da esquistossomose no SNC seja facilitado pelo aumento da pressão intra-abdominal. Isso ocorre principalmente pelo uso da manobra de Valsalva, que é caracterizada pela compressão da expiração forçada com a glote fechada. Isso aumenta a pressão intratorácica, elevando a pressão arterial e a frequência cardíaca momentaneamente (DAWSON, 1943). Essa manobra é comumente realizada em momentos de alto esforço físico, defecação, tosse e etc. Até o momento não há nenhum estudo que comprove o surgimento na neuroesquistossomose com a realização de manobra de Valsalva.

A lesão neurológica na medula, mais conhecida como Mielorradiculopatia Esquistossomótica (MRE) é uma lesão neurológica parcial e não traumática e, a depender do local em que os ovos se instalam, diversos sintomas e incapacidades podem ocorrer, em sua grande maioria, a tríade inicial permanece e surgem sintomas como a disfunção vesical, déficit de força em MMII e impotência sexual com percentuais de 12%, 7% e 0,7%, respectivamente (SILVA et al., 2004).

Para um melhor entendimento dos mecanismos envolvidos na patogenia da esquistossomose e suas formas ectópicas, tem-se realizado estudos em animais com a infecção pelo *S. mansoni* (OLIVEIRA et al., 2004). Diversos estudos foram realizados na tentativa de desenvolver um modelo experimental viável, entretanto, nenhum conseguiu compreender o surgimento das formas ectópicas (FIORE; ALOE, 2001; SILVA; OLIVEIRA; ANDRADE, 2002). Em 2017 um grupo brasileiro iniciou pesquisas que correlacionaram as alterações histológicas no SNC com alterações quantitativas na motricidade e sensibilidade. Para a obtenção de dados quantitativos da avaliação clínica, foi necessária a utilização de equipamentos para a mensuração das variáveis sensibilidade tátil e térmica além da força muscular, pois a simples observação dos sinais e sintomas não garantem a precisão dos achados (CARVALHO et al., 2017).

O principal desafio para o desenvolvimento de um modelo animal de neuroesquistossomose é desenhar um protocolo de infecção que represente a etiopatogenia da doença de maneira confiável. Este modelo precisa apresentar uma baixa taxa de mortalidade e mimetizar as vias de infecção e progressão da doença. Um dos maiores desafios colocados pelo desenvolvimento de modelos animais é simular todos os aspectos de uma determinada doença em um ambiente fechado e obter resultados reprodutíveis. A aplicação de testes funcionais em modelos animais de lesão medular é passível de falhas e qualquer alteração ambiental pode interferir nos dados gerados. Algumas dessas dificuldades são a variabilidade no modelo da lesão, a espécie animal utilizada e a variabilidade influenciada pelo comportamento, atividade espontânea e variação na duração dos testes (FOUAD; HURD; MAGNUSON, 2013).

2 REFERENCIAL TEÓRICO

Esquistossomose é uma doença causada pelo *S. mansoni*, parasita que tem no homem seu hospedeiro definitivo, mas que necessita de caramujos de água doce como hospedeiros intermediários para desenvolver seu ciclo evolutivo.

2.1 A esquistossomose

A esquistossomose mansônica representa um grave problema de saúde pública, acometendo cerca de 78 países com 745 milhões de residentes em área endêmica, principalmente em comunidades rurais com expansão para os centros urbanos, relacionada com precárias condições de higiene e inadequados recursos sanitários. Estima-se que 218 milhões de pessoas realizaram tratamento preventivo em 2015 e mais de 66,5 milhões de pessoas teriam sido tratadas pela esquistossomose no mesmo ano (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2017). No Brasil, há condições ideais para o desenvolvimento e crescente expansão da doença tais como, elevadas temperaturas, precipitações e presença de caramujos.

Em Pernambuco, a esquistossomose encontra-se presente em todos os 43 municípios e três microregiões da Zona da Mata, sendo considerada uma doença endêmica na região (FAVRE et al., 2006; PERNAMBUCO, 2015). Tal situação epidemiológica se agrava ainda mais em virtude da presença de municípios em áreas urbanas e peridomiciliares, este tipo de exposição não intencional em fontes de transmissão da parasitose só proporciona o aumento do número de casos, a manutenção e criação de novos focos de transmissão (GOMES et al., 2016a).

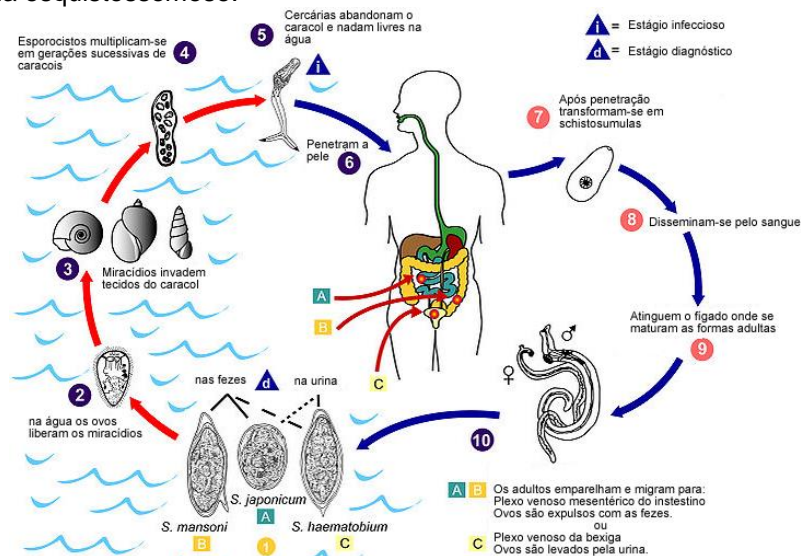
Esta doença é causada por um parasita trematódeo do gênero *Schistosoma*, tendo como principais agentes etiológicos o *S. mansoni*, o *S. haematobium* e o *S. japonicum* (PORDEUS, 2008). Dentre essas espécies, o *S. mansoni* tem sido especialmente estudado devido a sua importância na saúde pública e sua ampla distribuição geográfica, principalmente na África, Oriente Médio, Caribe, Brasil, Venezuela e Suriname (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2017). No Brasil, os principais hospedeiros intermediários são os caramujos pertencentes à família *Planorbidae* e gênero *Biomphalaria*. São caramujos gastrópodes aquáticos,

pulmonados e hermafroditas, que habitam coleções de água doce, com pouca correnteza ou parada que possibilitam a reprodução assexuada do helminto. As três espécies que são encontradas no Brasil são: *B. glabrata*, *B. straminea* e *B. tenagophila* (BRASIL, 2009). Esses moluscos encontram-se em regiões onde há grande circulação de pessoas tais como barragens, áreas de irrigação, rios, lagos, lagoas e brejos (YOSHIOKA et al., 2002).

O ciclo de contaminação da esquistossomose se inicia quando os ovos do parasita são eliminados através das fezes do indivíduo infectado, sendo disseminados no ambiente. Na água doce, os ovos eclodem em algumas horas, libertando os miracídeos. Estas larvas adentram no caramujo do gênero *Biomphalaria* para se multiplicar em centenas de cercárias, em cerca de quatro a seis semanas (Figura 1). Estas formas infecciosas para o homem emergem dos caramujos em condições especiais de luz e temperatura, podendo sobreviver na água por até 72 horas (BENNET; PLUM, 1997).

As cercárias em contato com a pele do hospedeiro através da água se transformam rapidamente em esquistossômulo, atingindo a circulação sanguínea e passando pelo coração, pulmões e fígado. Apenas os que chegam ao sistema porta-hepático podem se desenvolver até a fase adulta, onde se acasalam e migram para as vênulas da parede intestinal que é seu habitat definitivo. Neste local, as fêmeas depositam seus ovos que obstruem e desorganizam o fluxo sanguíneo local juntamente com a extrusão dos ovos para o tecido circundante (REY, 2011).

Figura 1- Ciclo da esquistossomose.



Fonte: Center for Disease Control and Prevention (2005).

2.2 Classificação Clínica

Grande parte dos casos de esquistossomose podem ser assintomáticos, esta característica dependerá da carga parasitária e estado de saúde do indivíduo. Já os casos sintomáticos são caracterizados clinicamente por uma fase inicial e tardia. A primeira se inicia com a própria penetração das cercárias através da pele, podendo ocasionar alterações dermatológicas alérgicas (dermatite cercariana) sendo mais intensas em reinfecções e indivíduos hipersensíveis (LAMBERTUCCI; SILVA; VOIETA, 2005).

De 3 a 7 semanas pós exposição é possível diagnosticar o indivíduo com febre de Katayama. Sua sintomatologia compreende desde cefaleia, febre e dor abdominal até linfadenopatia, diarreia, náuseas, vômitos e tosse seca. A eosinofilia associada a dados epidemiológicos auxiliam a confirmação do diagnóstico (SIQUEIRA-BATISTA; RAMOS JÚNIOR; FARIA, 1997). A fase aguda é dividida em dois períodos evolutivos do parasito: o pré-patente, etapa compreendida antes da oviposição e pós-patente que ocorre após a oviposição (SILVA; SANTANA; JESUS, 2008).

As formas crônicas iniciam-se aos seis meses de infecção e podem durar por vários anos. As manifestações clínicas variam, a depender da localização e intensidade do parasitismo, da capacidade de resposta do indivíduo ou do tratamento instituído. Apresentam-se principalmente nas seguintes formas:

- a) Hepatointestinal: normalmente ocorre no início da fase crônica e é caracterizada pela presença de diarreias e epigastralgia. O fígado apresenta-se palpável e com nodulações que corresponderão às áreas de fibrose decorrentes de granulomatose periportal ou fibrose de Symmers nas fases mais tardias;
- b) Hepática: seu curso é semelhante à primeira e ao exame físico o fígado apresenta-se palpável e endurecido. No exame de imagem (ultrassonografia), é possível visualizar fibrose hepática de moderada a intensa;
- c) Hepatoesplênica compensada: A principal característica desta fase é a presença de hipertensão portal e por conseguinte esplenomegalia e varizes esofágicas. A sintomatologia predominante compreende dores abdominais

atípicas, alterações das funções intestinais e sensação de peso ou desconforto no hipocôndrio esquerdo, devido ao aumento do baço;

- d) Hepatoesplênica descompensada: esta forma está entre as mais graves da esquistossomose e é a grande responsável pela maioria dos óbitos. O fígado encontra-se com sua funcionalidade bastante diminuída e com isquemia, o baço apresenta-se endurecido e indolor à palpação e a probabilidade de hemorragia digestiva em virtude do rompimento das varizes esofágicas é elevada (BRASIL, 2014).

2.3 Formas Ectópicas

Estima-se que no Brasil há de quatro a seis milhões de pessoas infectadas por *S. mansoni* (BRASIL, 2014). Com um número tão elevado de casos é plausível que hajam casos não diagnosticados de esquistossomose ectópica. Isto serve de alerta para que os profissionais e serviços da saúde direcionem sua atenção para este problema e a obtenção de maior compreensão da fisiopatologia dessa forma ectópica da doença.

Há grande possibilidade do acometimento de outros órgãos que não são alvos originais da esquistossomose, em 2007, Bacelar e outros apresentaram um caso de um adenocarcinoma de próstata que possuía ovos viáveis de *S. mansoni* com granulomas (BACELAR et al., 2007). No mesmo ano, Lopes et al. apresentou a primeira descrição de acometimento da vesícula seminal por *S. mansoni*. Foi possível a visualização de ovos calcificados sem evidência de fibrose ou formação granulomatosa em meio ao estroma fibromuscular. Através deste achado é possível hipotetizar uma associação entre esquistossomose mansônica genital com casos de infertilidade, hemospermia e câncer de próstata (LOPES; ALMEIDA; JACOBINO, 2007).

O primeiro relato de esquistossomose em próstata de Pernambuco foi realizado em 2016. Realizou-se uma prostatectomia parcial por suspeita de neoplasia e evidenciou-se ovos de *S. mansoni* no tecido prostático em um paciente com 51 anos de idade (GOMES et al., 2016b). No mesmo estado, uma paciente de 45 anos apresentou como sintomatologia, fortes dores na região ilíaca esquerda e após a

investigação clínica identificou-se aumento do ovário esquerdo. O exame histopatológico do órgão revelou processos granulomatosos em torno de ovos de *S. mansoni* sem a presença de tecido neoplásico (GOMES et al., 2017). Outro caso de acometimento do sistema genitourinário foi relatado por Leite et al em 2014 que constatou a presença de ovos de *S. mansoni* na bexiga urinária. Foi possível identificar diversos ovos com o miracídio em seu interior e o granuloma ao redor, o mais intrigante é que estavam coexistindo com um carcinoma urotelial da bexiga (LEITE; HOLANDA; MEDEIROS, 2014).

No mesmo ano Amorim e outros publicaram dois casos de carcinomas em ovário que possuíam ovos de *S. mansoni* (AMORIM et al., 2014). Os processos neoplásicos descritos no artigo supracitado produzem naturalmente o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), fator de crescimento fibroblástico (FGF) e outras substâncias que permitem a proliferação, sobrevivência e diferenciação das células endoteliais, gerando uma neovascularização que é fundamental para a sobrevivência e progressão das células neoplásicas (DUARTE; LONGATTO FILHO; SCHMITT, 2007). Possivelmente as neoplasias servem como uma via migratória para o verme adulto e o processo de embolização de ovos. Aliado a isso, a presença de ovos intensifica o processo patológico e estresse oxidativo, levando a um pior prognóstico em tumores ovarianos. No entanto, não há evidências suficientes para confirmar a malignização de uma lesão benigna devido à presença de ovos *S. mansoni* (AMORIM et al., 2014).

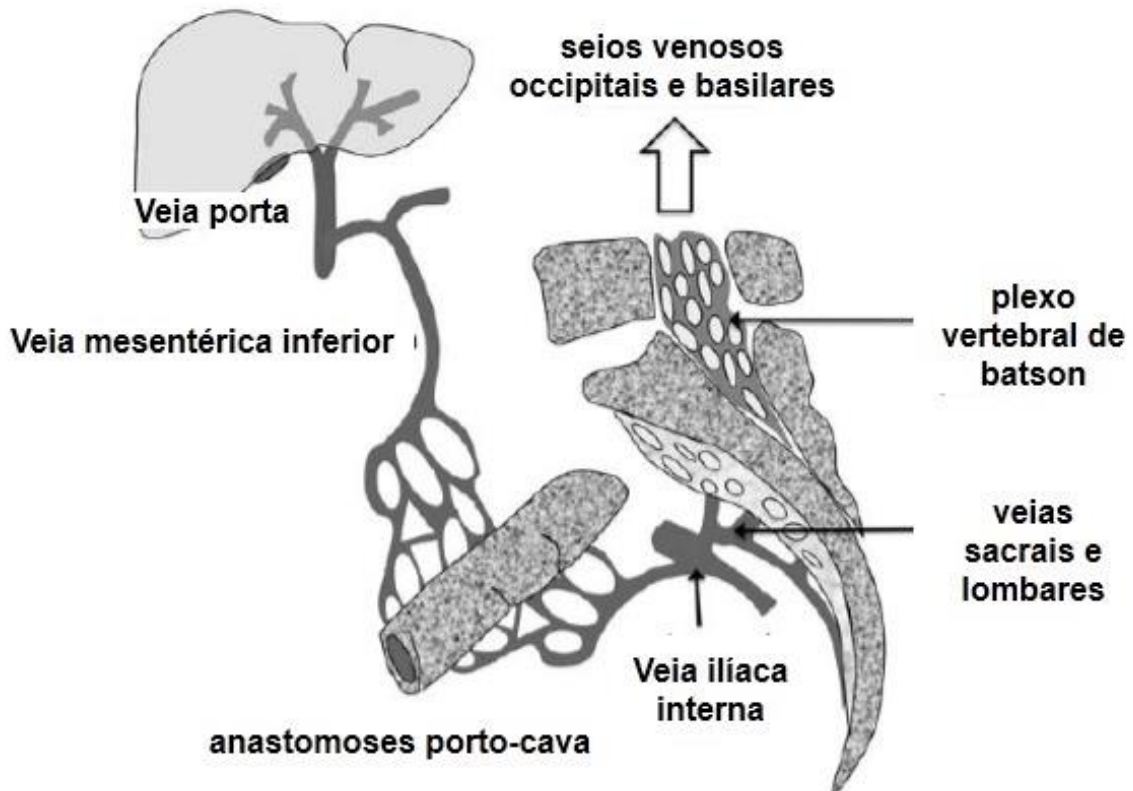
2.4 Neuroesquistossomose

Estes achados incomuns levantam teorias a respeito da neuroesquistossomose. A mais amplamente aceita envolve a migração dos vermes adultos para as veias pélvicas seguindo o fluxo sanguíneo contrário para que possa atingir as terminais do sistema porta. A outra teoria aborda a migração de helmintos e embolização dos ovos através da rede arterial como consequência da presença de defeitos cardiovasculares congênitos ou derivações arteriovenosas (NUNES et al., 2013).

Em relação ao SNC, o principal mecanismo de deposição de ovos ocorre a partir da intercomunicação do sistema mesentérico inferior com o sistema venoso

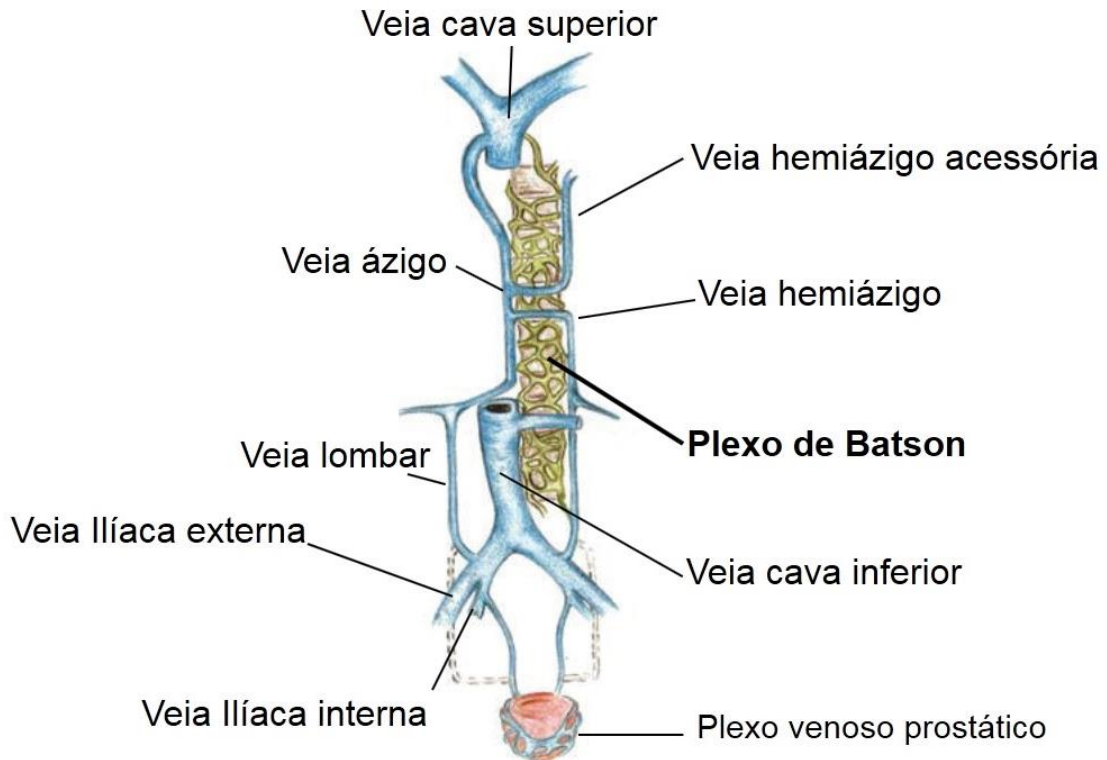
espinal que seria a principal porta de entrada dos ovos de *S. mansoni*. A circulação de ovos no sistema venoso pode ocasionar as formas ectópicas da esquistossomose e episódios como estes são frequentes. De acordo com Pitella et al., necropsias de pacientes que morreram por esquistossomose hepatoesplênica apresentaram ovos do parasito no encéfalo em cerca de 25% dos casos (PITTELLA; LANA-PEIXOTO, 1981). Os ovos seguem o trajeto venoso em direção ao plexo avalvular de Batson, plexo com pressão em torno de zero que facilita o fluxo retrógrado ao longo da medula espinal (Figura 2) (BRUIJNING, 1964; CAROD ARTAL et al., 2004; KATCHANOV; NAWA, 2010). Esta região faz comunicação das veias intercostais com as veias íliacas internas, lombares e sacrais (Figura 3) (VAN DER KUIP; HOOGLAND; GROEN, 1999). Há também, a possibilidade de eliminação direta dos ovos nos vasos medulares, devido à migração anormal dos vermes adultos, hipótese reforçada pelo achado ocasional de vermes adultos enfileirados dentro dos vasos vertebrais (CAROD ARTAL et al., 2004; PAZ et al., 2002).

Figura 2- Conexão entre o plexo de Batson e a veia porta.



Fonte: Adaptado de Katchanov e Nawa (2010).

Figura 3- Representação do plexo de Batson.



Fonte: Adaptado de Elhammady et al. (2011)

Em se tratando de manifestações clínicas neurológicas, cerca de 95% dos indivíduos com MRE apresentam uma tríade inicial característica: dor lombar, alterações de sensibilidade em membros inferiores (MMII) e disfunção urinária (PEREGRINO et al., 2002b). Estas manifestações ocorrem na fase aguda ou subaguda da doença, havendo a piora progressiva dos sinais e sintomas em cerca de 15 dias do início dos sinais e sintomas, todavia, há casos em que a evolução do quadro é lenta e sua instalação se dá ao longo de meses ou anos. A MRE é uma lesão neurológica parcial e não traumática e, a depender do local em que os ovos se instalam, diversos sintomas e incapacidades podem ocorrer, em sua grande maioria, a tríade inicial permanece e surgem sintomas como a disfunção vesical, déficit de força em MMII e impotência sexual com percentuais de 12%, 7% e 0,7%, respectivamente (SILVA et al., 2004). Eventualmente, há uma melhora clínica espontânea decorrente da diminuição do processo inflamatório e modulação do granuloma.

Os ovos podem atingir regiões ectópicas em decorrência ao aumento da pressão intra-abdominal, principalmente devido a Manobra de Valsalva. Essa

manobra é caracterizada pela compressão da expiração forçada com a glote fechada que aumenta a pressão intratorácica, elevando momentaneamente a pressão sanguínea e frequência cardíaca (DAWSON, 1943). Ela é comumente realizada em esforços físicos elevados, defecação, tosse e outras situações e nos indivíduos com esquistossomose, esta manobra pode ser uma facilitadora da passagem de ovos ao sistema nervoso central. Sua relação com o sistema circulatório deve ser levada em conta para a compreensão dos episódios ectópicos de esquistossomose (PAZ et al., 2002; SILVA; OLIVEIRA; ANDRADE, 2002; UEKI; PARISI; ONOFRIO, 1995).

2.5 Diagnóstico da Neuroesquistossomose

Quanto mais cedo o diagnóstico é concluído, mais cedo será iniciado o tratamento e conseqüentemente melhor será o prognóstico do indivíduo. O diagnóstico é baseado na sintomatologia clínica, na demonstração da infecção esquistossomótica por técnicas microscópicas ou sorológicas e na exclusão de outras causas de mielopatia. Com o advento de novas técnicas complementares, especialmente as reações no líquido cefalorraquidiano e os exames por imagem da medula espinhal, houve grande avanço na detecção precoce da doença, isto acarreta na descoberta de novos casos, o que tem sido observado atualmente com o aumento do relato de número de casos de MRE (CAROD ARTAL et al., 2004; PEREGRINO et al., 2002a).

A neuroesquistossomose é portanto uma doença subnotificada, de prevalência desconhecida e morbidade subestimada. A dificuldade do reconhecimento do quadro clínico e a limitação de acesso aos métodos complementares diagnósticos contribuem para o seu subdiagnóstico. O principal elemento que sofre com essas conseqüências é a população portadora da doença.

Um dos instrumentos para o fechamento do quadro clínico é a análise do líquido cefalorraquiano. Este exame revela alterações inespecíficas: elevação discreta a moderada do conteúdo protéico em 95% dos casos (média de $161,4 \pm 191,9$ mg/dl), níveis normais de glicose, pleocitose em 91% dos casos (média de $91,9 \pm 113,8$ céls/mm³), com predomínio de linfomononucleares, presença de eosinófilos em 41 a 90% dos casos e elevação de gamaglobulina em 76% dos casos (LIVRAMENTO;

MACHADO; SILVA, 1985). Observa-se também acentuada redução da celularidade líquórica com a melhora dos sintomas, mas com persistência da hiperproteinorraquia em 66% dos casos (ANDRADE FILHO et al., 1996).

Anticorpos anti-*Schistosoma* foram identificados em 85 a 90% do Líquido Cefalorraquidiano (LCR) testados com utilização das técnicas de ELISA, imunofluorescência indireta ou hemaglutinação. Um estudo desenvolvido por Moreno-Carvalho e outros (2003) analisou o LCR de 377 pacientes com suspeita clínica de neuroesquistossomose e positividade líquórica para o *S. mansoni* nas reações de inibição da hemaglutinação e imunofluorescência indireta. Os autores concluíram que a presença de anticorpos no LCR para *S. mansoni* associada à celularidade > 4 cels/mm³, à taxa de proteína > 40 mg/dl e à presença de eosinófilos sugerem alta probabilidade de MRE (MORENO-CARVALHO et al., 2003).

Em relação aos exames de imagem revelam um processo inflamatório no SNC que se caracteriza por aumento irregular do diâmetro medular e defeito de enchimento com ou sem bloqueio do canal medular, além de espessamento de raízes nervosas da cauda equina. Mielografias e mielotomografias computadorizadas revelam alterações em 63% dos casos de MRE. A forma granulomatosa da doença medular é a mais frequentemente diagnosticada por esses métodos de imagem, porque causa aumento do volume medular (PEREGRINO et al., 2002a), podendo ocorrer atrofia do órgão em indivíduos com doença de longa duração.

Por se tratar de uma doença com diagnóstico de exclusão sendo necessário uma combinação de diversos instrumentos de avaliação, é crucial que o processo semiológico na neuroesquistossomose seja minucioso. Somado a isso se deve correlacioná-lo com os principais fatores ambientais da esquistossomose mansônica: presença de saneamento básico no local de moradia, contato com coleções hídricas, área endêmica para esquistossomos e mansônica, além da presença de hospedeiros intermediários (CARVALHO et al., 2015).

2.6 Imunopatogênese da Esquistossomose

A patogênese da esquistossomose é dependente de fatores intrínsecos ao hospedeiro (constituição genômica, órgão lesado, padrão alimentar, infecções

associadas e etc.), fatores relacionados ao parasita (fase evolutiva, linhagem e carga parasitária) e da interação parasita-hospedeiro (CAVALCANTI; FERNANDES; CARVALHO, 1998).

Aproximadamente dois dias após a passagem do parasita através da pele, há a presença de infiltrado de polimorfonucleares, mononucleares, células de Langerhans e produção local das citocinas IL1, IL6, IL12 e IL10 (HOGG et al., 2003). De quatro a cinco dias pós penetração do verme, há um influxo de linfócitos TCD4⁺ e produção de IL4, IL12 e IFN- γ . Durante a fase pré-patente, há um predomínio da resposta imune do tipo Th1 com alta concentração de TNF, IL2 e IL6 responsáveis pelas lesões teciduais e manifestações clínicas de fase aguda, com substituição pela resposta Th2 na fase pós-patente (SILVA; SANTANA; JESUS, 2008). Todavia, é necessário que haja um mecanismo regulatório para que não haja descontrole da doença pela exacerbação da resposta Th2, para isso, existe uma associação das células Th1 e Th17 que amenizam a gravidade da infecção. As CD4, Tregs, CD25 e FoxP3 associados ao intestino, aumentam seu número durante a inflamação colítica crônica induzida pelos ovos e são capazes de modular a resposta Th2 através da supressão da IL-4 (TURNER et al., 2011).

A principal mudança da resposta Th1 para Th2 ocorre em virtude da produção de ovos pela fêmea de *Schistosoma*. Em média são 300 ovos por dia que cada fêmea produz e os vermes adultos possuem uma expectativa de vida entre cinco e dez anos. Os ovos são organismos viáveis, altamente antigênicos e metabolicamente ativos, eles aderem ao endotélio vascular, provocam inflamação que gera uma resposta granulomatosa essencial para sua passagem ao lúmen intestinal para serem excretados com as fezes (DEFRANCO; LOCKSLEY; ROBERT-SON, 2007). A região onde há mais passagem de ovos para o intestino é a placa de Peyer. Esta região é mais numerosa e apresenta maiores dimensões no íleo e localizam-se principalmente na região oposta ao mesentério, além disso regulam a homeostase e secreção de imunoglobulina A (IgA) como resposta a patógenos (TURNER et al., 2012).

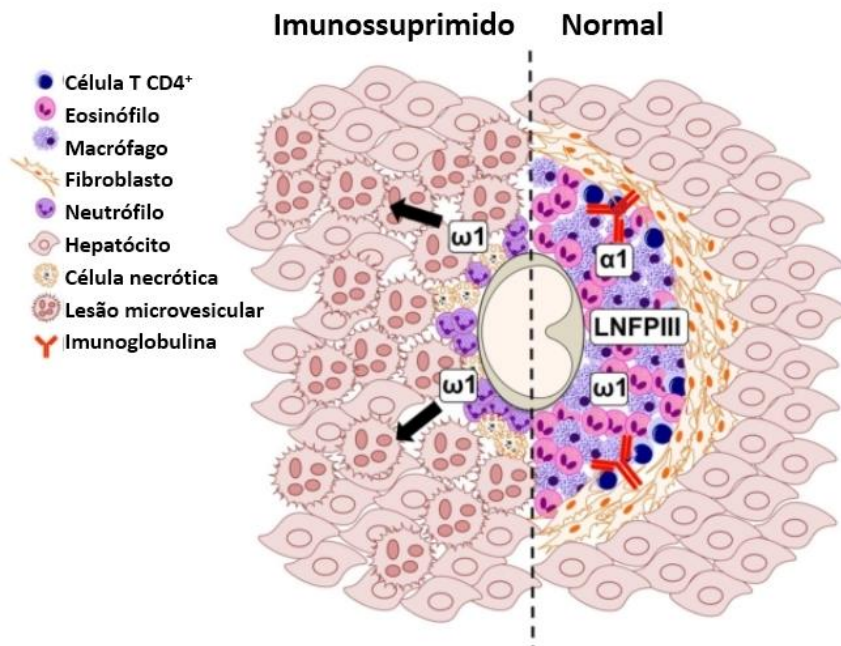
O evento que deve ser destacado no aspecto imunológico da esquistossomose é a formação granulomatosa no fígado e o processo de fibrose periportal (CARVALHO; MARTINS FILHO; OLIVEIRA, 2008; WARREN, 1972). Cerca de 60% dos ovos produzidos pelo *S. mansoni* alcançam a luz intestinal e vão para as fezes,

os outros 40% mantêm-se aderidos nos capilares da mucosa intestinal e nos sinusóides hepáticos. Estes ovos liberam antígenos solúveis que mobilizam macrófagos, eosinófilos, linfócitos e plasmócitos mediados por TNF, Células Th1, Th2 e linfócitos TCD₈. Há um acúmulo de células ao redor do ovo, aumento no número de fibroblastos e produção de colágeno e por conseguinte, formação do granuloma esquistossomótico (HERBERT et al., 2004; LENZI et al., 1998).

Apesar de contraditório, a principal função do granuloma é proteger o tecido do hospedeiro. Isto foi inicialmente demonstrado por Bryan e Lichtenberg em 1977 e Doenhoff em 1981 que apresentaram a formação ineficaz do granuloma em animais deficientes em células T, intensificando o dano celular circundante no ovo (BYRAM; VON LICHTENBERG, 1977; DOENHOFF et al., 1981). E posteriormente Fallon em 1998 concluiu que animais sem células TCD4 morreram de quatro a seis semanas após a infecção por *S. mansoni*, período que coincide com a fase pós-patente (FALLON; SMITH; DUNNE, 1998).

A Figura 4 ilustra a diferença de resposta inflamatória frente ao ovo de *S. mansoni*. Na ausência de células TCD4 há limitação da formação do granuloma, com o infiltrado celular em torno do ovo e com neutrófilos ao redor uma extensa lesão microvesicular nos hepatócitos e uma consequente elevação dos níveis séricos de transaminases consistentes com danos nos hepatócitos. Em contrapartida, no organismo com um percentual normal de células TCD4 apresenta o granuloma funcional com diversos tipos celulares ao redor, imunoglobulinas e tecido fibrótico (HAMS; AVIELLO; FALLON, 2013). Portanto, percebe-se que a formação de um granuloma em torno do ovo atua como protetor da inflamação e isola o tecido das secreções do ovo que podem gerar hepatotoxicidade (DUNNE; JONES; DOENHOFF, 1991).

Figura 4. Representação gráfica das populações celulares envolvidas na formação do granuloma hepático ao redor do ovo de *S. mansoni* em um camundongo.



Fonte: Hams *et al.* (2013).

Legenda: LNFPIII (Lacto-N-fucopentaose III); $\alpha 1$ (alfa 1); $\omega 1$ (ômega 1)

2.7 Modelos Animais

O principal obstáculo no desenvolvimento de um modelo animal para formas ectópicas de esquistossomose é o desenvolvimento de um protocolo de infecção que retrate com fidedignidade a fisiopatologia da doença, entretanto, sabe-se que a infecção por *S. mansoni* em camundongos não se equipara fielmente a todos os aspectos da esquistossomose humana (FALLON *et al.*, 2000).

2.7.1 Primatas

O primeiro achado de deposição de ovos no sistema nervoso central (SNC) ocorreu por volta de 1970 quando Cheever e Duvall identificaram a formação de granulomas associada à encefalite e convulsões em macacos do gênero *Cercopithecus* (CHEEVER; DUVALL, 1974).

2.7.2 Coelho

Wang e outros (2011) estabeleceram um modelo de neuroesquistossomose como ferramenta de análise morfológica, observação clínica além de investigação sobre a imunologia e patogênese da reação inflamatória. Infectou-se o cérebro de coelhos com ovos de *S. japonicum* e baseados nas manifestações clínicas realizaram a eutanásia 3, 5, 7, 10, 20 e 30 dias após a cirurgia de estereotaxia. A análise histológica apresentou todas as fases da fisiopatologia: início do processo inflamatório com aumento progressivo ao longo dos dias, agregação de neutrófilos, granulócitos e eosinófilos, formação de granuloma ao redor dos ovos e modulação do granuloma. A técnica simulou os mesmos sinais e sintomas da doença em menor prazo e com maior padronização do grupo experimental, ideal para estudos em ambiente controlado (WANG et al., 2011).

2.7.3 Murinos

Já o desenvolvimento de modelos em murinos permeia a década de 90, mais especificamente em 1996 quando Aloe e outros encontraram ovos de *S. mansoni* com agregação granulomatosa em cérebros de camundongos. Os espécimes estudados apresentaram redução da expressão do fator de crescimento nervoso (ALOE et al., 1996). Em decorrência desse achado, Fiore identificou distúrbios comportamentais em camundongos infectados com ovos de *S. mansoni*, este fato está associado com as alterações no fator de crescimento neural e citocinas induzidas pelos granulomas (FIORE et al., 1996). Uma das possíveis falhas entre estes dois estudos, é que ambos não indicam a frequência que os ovos atingiram o SNC. Posteriormente, Silva e outros infectaram 39 camundongos com diferentes cargas parasitárias de cercárias e não encontraram nenhum sinal clínico ou histológico de acometimento do SNC. Eles concluíram que o modelo murino simulando a infecção por *S. mansoni* em humanos é inadequado para estudos experimentais sobre a neuroesquistossomose (SILVA; OLIVEIRA; ANDRADE, 2002).

No Instituto René-Rachou - FIOCRUZ, dos 100 animais infectados (espécie *Swiss Webster*) com 50 cercárias (cepa LE) um apresentou hemiplegia direita quatro meses após a infecção. Um procedimento similar ocorreu no Instituto Gonçalo Moniz – FIOCRUZ com a mesma carga parasitária entretanto a linhagem do camundongo era BALB/c e a cepa de *Schistosoma* era de Feira de Santana - BA. Após 8 meses de

infecção, um animal apresentou hemiplegia direita e movimentos giratórios. O estudo histopatológico indicou granulomas na meninge no primeiro animal e no cérebro em ambos, todavia, os autores não conseguiram identificar a região do cérebro na qual os ovos estavam fixados para relacionar com a sintomatologia dos animais (LAMBERTUCCI et al., 2014).

Atualmente o único grupo de pesquisa que vem estudado a neuroesquistossomose, sua relação com achados histológicos e a sintomatologia clínica dos animais é laboratório e serviço de referência de esquistossomose do Instituto Aggeu Magalhães (IAM). No primeiro trabalho de Carvalho et al. 2017 desenvolveu-se um modelo experimental de MRE no qual 25% dos animais infectados com ovos de *S.mansoni* por via intratecal apresentaram alterações histológicas entre o segmento medular de T10 a L5 (Apêndice A). Ademais, foi constatada hipossensibilidade tátil assimétrica, redução da sensibilidade térmica e redução da força muscular em até 20 dias após a infecção (CARVALHO et al., 2017). O presente estudo é uma continuação desta linha de pesquisa do grupo e estes achados reforçam a viabilidade no desenvolvimento de um modelo de formas ectópicas da esquistossomose que simule o processo natural de infecção do parasita.

3 OBJETIVO GERAL

Desenvolver modelo experimental em murinos para a indução da neuroesquistossomose.

3.1 Objetivos Específicos

- a) Investigar e identificar qual a principal causa de morte dos animais infectados com *S. mansoni*;
- b) Identificar alterações fisiológicas e funcionais no modelo animal, relacionadas às formas ectópicas de infecção por *S. mansoni*;
- c) Caracterizar as alterações neurológicas e morfológicas (danos teciduais) em camundongos infectados com *S. mansoni*;
- d) Analisar se existe alguma relação entre o esforço físico e o surgimento da neuroesquistossomose.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Trata-se de um estudo experimental e controlado que foi dividido em dois momentos: o primeiro trata-se da investigação da causa de óbitos dos camundongos infectados com *S. mansoni* (objetivo A), já o segundo aborda o modelo de neuroesquistossomose em camundongos baseado em esforços físicos (objetivos B, C e D). Com o intuito de minimizar o número de animais por experimento, obter resultados significativos ($p < 0,05$) e com coeficiente de variação entre 15% e 20%, utilizamos a tabela extraída de Eckelman e outros para determinar o número de animais por grupo (ECKELMAN et al., 2007).

Tabela 1. Animais necessários para se obter resultados estatisticamente significantes.

Diferença de percentagem entre os grupos controle e tratado	Percentagem do coeficiente de variação devido à variabilidade biológica	Número de animais	Significância ($p < 0,05$)
20	20	2-7	Não significativa
20	20	8	Significante
20	15	5	Significante
25	20	5	Significância limítrofe
30	20	5	Significante
25	15	5	Significante

Fonte: Adaptado de Eckelman et al. (2007).

4.1 Metodologia do objetivo A

Foram estudados 220 animais infectados de outubro/2016 a maio/2017, sendo 110 da linhagem BH e 110 da linhagem LE. De acordo com as normas estabelecidas pelo Procedimento Operacional Padrão (POP) do SRE, após seis meses de infecção ou havendo qualquer indício de sofrimento decorrente da infecção os animais devem ser eutanasiados. Todo animal que foi a óbito ou precisou ser eutanasiado foi submetido à necropsia. Para tanto, foi realizada uma incisão longitudinal no abdome para expor as vísceras abdominais, possibilitando a visualização do intestino e demais vísceras abdominais. Fragmentos de seus intestinos, vasos mesentéricos e fígados foram removidos imediatamente após a morte e foram submetidos à análise histopatológica e morfométrica.

Foram retirados fragmentos do intestino, vaso mesentérico e fígado e estes foram submetidos à análise histopatológica e morfométrica, sendo submetido a coloração pela técnica de hematoxilina e eosina. Nos cortes histológicos analisou-se o número de células inflamatórias no granuloma com a magnitude de 40x. A morfologia foi estudada através de microscopia óptica (quadro 1). Para tanto, foi utilizado um microscópio Nikon Eclipse E200 nos aumentos com magnitude de 10x e 40x. As amostras foram avaliadas quanto do grau de lesão da túnica mucosa conforme a classificação modificada de CHIU e outros (LONGO; BALLANTYNE; GUSBERG, 1992).

Quadro 1. Classificação da morfologia intestinal de isquemia mesentérica.

Classificação modificada de CHIU et al. 1970	
Grau 0	Mucosa sem alterações.
Grau 1	Vilosidades bem constituídas, sem lise celular ou processo inflamatório, porém com formação do espaço subepitelial de Gruenhagen.
Grau 2	Presença de lises celulares, formação do espaço subepitelial de Gruenhagen e espaçamento aumentado entre as vilosidades.
Grau 3	Destruição da porção livre das vilosidades, presença de capilares dilatados e de células inflamatórias.
Grau 4	Destruição estrutural das vilosidades, havendo apenas esboço de algumas, formadas por células inflamatórias e material necrótico, com hemorragia e ulceração glandular basal.
Grau 5	Destruição de toda túnica mucosa, não mais sendo observado qualquer estrutura glandular, mas apenas material amorfo depositado sobre a tela submucosa.

Fonte: adaptado de Chiu et al. (1970).

As amostras também foram analisadas de acordo com a escala de isquemia aguda intestinal que caracteriza-se por três estágios. O estágio I é patologicamente caracterizado por necrose, erosão, ulcerações, edema e hemorragia localizadas na mucosa, esta etapa ainda é reversível. O estágio II representa a necrose que se estende para as camadas da submucosa e muscular própria e o estágio III que possui altos índices de mortalidade e compreende um envolvimento de todas as três camadas (JATOBÁ et al., 2008).

Dividiu-se os óbitos em duas classes: isquemia mesentérica, quando foram identificados sinais macroscópicos de necrose em partes do intestino; e causa

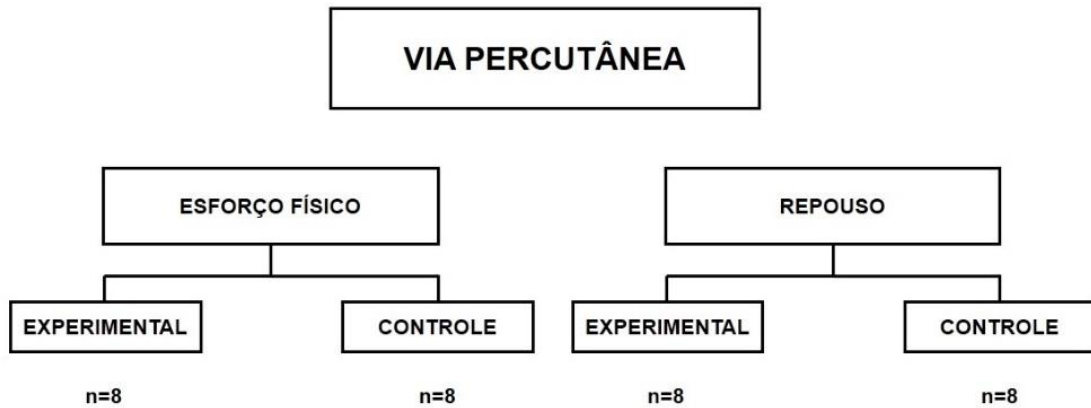
desconhecida, quando não haviam sinais clínicos e/ou macroscópicos da causa morte ou quando o estado de conservação dos tecidos não permitissem a identificação da causa do óbito. As fezes foram coletadas e analisadas através da reação com peróxido de hidrogênio baseado no protocolo aplicado por Jatobá e outros, para a investigação de sangue oculto no material fecal (LINS et al., 2008).

Realizou-se a documentação da data de óbito, data de infecção, linhagem da cepa de *S. mansoni* e causa da morte de todos os animais que foram a óbito e os dados foram tabulados no *software Microsoft Excel 2013* e analisados através do *Graphpad Prisma V6*.

4.2 Metodologia dos objetivos B a D.

Foram utilizados 64 camundongos machos da linhagem Balb/c inbred, pesando inicialmente entre 20 e 25 gramas, com 4-6 semanas de idade e com condições gerais e de motricidade normais. O uso de camundongos machos reduz o número de animais necessários para o experimento, pois o ciclo estral das fêmeas pode alterar os testes comportamentais e sensitivos, exigindo um maior número amostral a fim de minimizar o viés causado pela alteração hormonal (TANNO; BIANCHI; MARCONDES, 2002). Os animais foram provenientes do biotério do IAM/FIOCRUZ, e foram mantidos em caixas padronizadas (4 animais por caixa), sob condições ideais de temperatura (22 a 23°C), luminosidade (ciclos de 12 h de claro e 12 h de escuro) e receberam comida e água *ad libitum*. A Figura 5 ilustra a divisão dos grupos esforço físico e repouso com infecção por via percutânea (n=8), cada subgrupo (experimental e controle) continha 8 animais e foi realizada duplicata. A taxa de mortalidade do modelo foi de 14,06%.

Figura 5. Divisão dos grupos do experimento por via percutânea com infecção estimada de 50 cercárias por animal.



Fonte: O autor

4.2.1 Infecção

A infecção dos camundongos Balb/c ($n=8$) foi realizada pelo método de imersão (via percutânea) com uma réplica (Figura 5) e utilizando a linhagem LE de *S. mansoni* isolada de *S. mansoni* mantida no Laboratório de Esquistossomose. O método de imersão consiste em colocar os animais em um recipiente contendo uma quantidade mínima de água morna para que eliminem fezes e urina. Em seguida, foram colocados individualmente em frascos de vidro de boca larga, com furos na tampa contendo 50ml de água desclorada, quantidade suficiente para cobrir as patas e a cauda. Foram adicionadas 50 cercárias por um período de 60 minutos, sob fonte de luz artificial direta e temperatura de 25°C (processo que facilita a penetração do parasito).

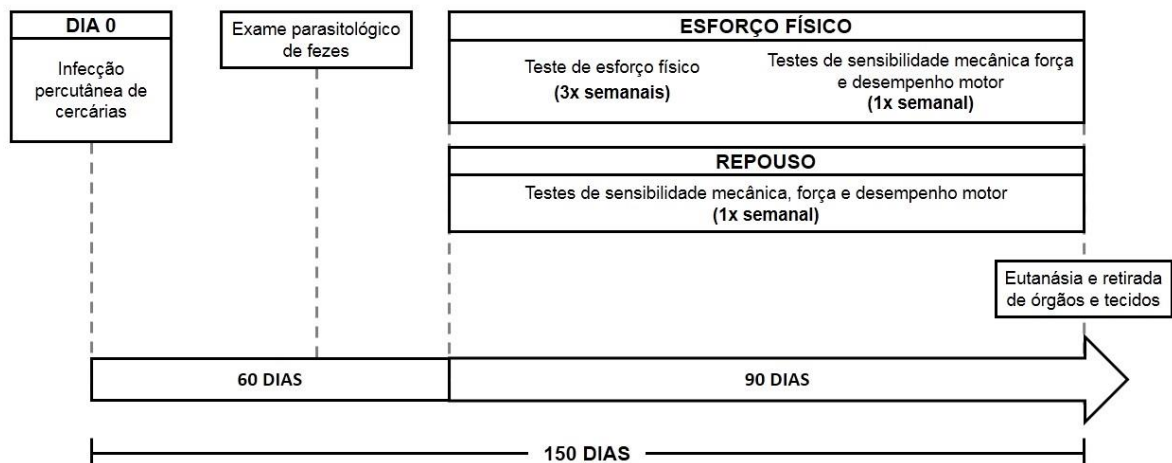
A taxa de infecção em ambos os grupos foi definida como 50 cercárias/animal a partir do protocolo estabelecido no Serviço de Referência em Esquistossomose do IAM e através de um estudo de mortalidade prévio ao atual trabalho.

Aos 60 dias pós infecção, as fezes de camundongos (10mg/animal) foram coletadas em gaiolas sem maravalha e revestidas com papel absorvente úmido para evitar o ressecamento das fezes. Os animais foram deixados nas gaiolas de uma a duas horas. Em seguida, foram enxugados com uma flanela para retirar a umidade e recolocados em suas gaiolas de origem. As fezes coletadas foram analisadas através do exame parasitológico pelo método de Kato-Katz, visando determinar a carga parasitária (ovos por grama de fezes – OPG) de cada animal pós-infecção (KATZ; CHAVES; PELLEGRINO, 1972).

4.2.2 Grupos

Os animais foram agrupados em duas categorias: repouso e esforço físico. Após infecção, os grupos da categoria “repouso” não realizaram o teste de esforço físico, ao contrário da categoria “esforço físico” (Figura 6). Para esta etapa foi utilizado um aparato de treinamento de força isométrica padronizado para camundongos (KRUGER et al., 2013). Trata-se de uma estrutura retangular de alumínio com uma grade central de 8x5 cm. Com o instrumento na posição horizontal, o animal era colocado na grade, em seguida com o aparato posicionado na vertical, o camundongo segurava a grade com as patas dianteiras e traseiras. Este modelo de isometria simula o comportamento natural do animal em escalar e agarrar-se, possui baixo nível de estresse quando comparado aos testes de força usuais e o pesquisador possui maior controle das variáveis a serem analisadas (KRUGER et al., 2013). Foram realizadas três séries de três minutos com intervalo de um minuto entre cada, na frequência de três vezes semanais.

Figura 6. Linha do tempo esquemática do experimento.



Fonte: O autor

4.2.3 Protocolo de treinamento físico

Para o treinamento físico, foi utilizado um aparelho de treinamento de força isométrica padrão para camundongos (KRUGER et al., 2013). Trata-se de uma estrutura de alumínio retangular com uma grade central de 8x5 cm (Apêndice B). Com

o instrumento na posição horizontal, o animal foi colocado na grade e mantido com as patas dianteiras e traseiras. Esse modelo isométrico simula o comportamento natural do animal em escalar e agarrar, proporciona um baixo nível de estresse comparado aos testes de força usuais e permite ao pesquisador ter maior controle sobre as variáveis a serem analisadas (KRUGER et al., 2013). Foram realizados três vezes por semana três séries de exercícios de três minutos cada, com intervalos de um minuto entre elas. É preciso enfatizar que apenas os animais do grupo de esforço físico participaram desse estágio.

4.2.4 Testes comportamentais

Para caracterizar as alterações neurológicas entre os animais infectados com *S. mansoni*, todos os grupos foram submetidos a testes de sensibilidade mecânica, força muscular e desempenho motor, uma vez por semana. A sensibilidade mecânica foi avaliada por meio do analgesímetro digital (Insight®, Ribeirão Preto, SP, Brasil). A média aritmética das três aplicações do analgesímetro digital foi tomada como o limiar mecânico secundário e as diferenças (oscilações) nos valores entre os diferentes tempos do experimento foram avaliadas (GOPALKRISHNAN; SLUKA, 2000).

A força muscular foi avaliada por meio do *Grip Strength Meter* (Insight®, São Paulo, SP, Brasil). O objetivo deste teste foi avaliar o tônus neuromuscular e/ou a força muscular dos membros anteriores e posteriores ao mesmo tempo ou separadamente. Alterações na força de preensão foram interpretadas como evidência de aumento ou diminuição da força muscular (ISHIYAMA et al., 2004; MAHMOOD et al., 2010).

O Rota-rod (Insight®, São Paulo, SP, Brasil) foi utilizado para avaliar o desempenho motor. Rodou a velocidades constantes de 6 a 15 rotações por minuto (rpm) durante 120 segundos e depois durante mais 30 segundos a 18 rpm (SLUKA; KALRA; MOORE, 2001). Para resultados confiáveis, os animais foram treinados por dois dias antes da avaliação. A performance motora, em segundos, foi registrada como o tempo que a animal atingiu na esteira até a dificuldade em permanecer no cilindro rotatório, ou no máximo 150 segundos.

Aos 90 dias após a infecção, todos os animais foram eutanasiados por meio do método químico de injeção de overdoses anestésicas. Parte da medula espinhal e do

cérebro foram analisadas por *Nested PCR Convencional* (NPCR) para investigar a presença de DNA parasita no tecido nervoso e através de Análise imuno-histoquímica para os anticorpos *S. mansoni*, GFAP, Iba1, IL1, TNF- α , TGF- β e IL10.

4.2.5 Nested PCR

Parte do cérebro e medula espinhal foram analisadas utilizando a NPCR formada pelo seguinte conjunto de *primers* externos: Schfo11 (5' '-GTTACGATCAGGACCAGTGT-3') e Unvre16 (5' '-CCGGACATCTAAGGGCATCA-3'); e o seguinte conjunto de *primers* internos: Schfo17 (5'-GTGCTGGT GGGTTGACGAGTTC-3 ') e Schre19 (5' - CTAAACGAGCACAGAGGAC-3 '). Estes são específicos para *S. mansoni*, com exceção de Unvre16, que é uma região conservada de várias espécies (ABATH et al., 2002). O procedimento foi realizado de acordo com o protocolo descrito por Bruscky em 2016 (BRUSCKY et al., 2016).

Após a anestesia, realizou-se perfusão transcardíaca utilizando 100 ml de solução salina tamponada com fosfato (PBS), a pH 7,2. O cérebro e a medula espinhal de cada animal foram imediatamente removidos e parte deste material foi fixado durante a noite em paraformaldeído a 4% (Sigma-Aldrich) em tampão fosfato 0,1 M (PBS), a pH 7 (fosfato monobásico e dibásico de sódio hepta-hidrato; Sigma-Aldrich). As amostras foram desidratadas em uma série de lavagens com etanol (Isofar Chemical Co., RJ, Brasil), clarificadas em xileno e embebidas em parafina (Merck, EUA). Secções com espessura de 5 μ m foram cortadas usando um micrótomo RM 2035 (Reichert S, Leica), reidratadas e tratadas com tampão citrato 20 mM (pH 6,0), a 100 ° C, por 30 min. A peroxidase endógena foi bloqueada por meio de peróxido de hidrogênio a 3% (H₂O₂) e as seções foram bloqueadas utilizando albumina de soro bovino a 1% (BSA, fração V) (Miles, Naperville, IL, EUA) por 1 h em temperatura ambiente.

Todos os grupos foram incubados com os seguintes anticorpos primários policlonais de camundongo: GFAP (Novus Biological, número de catálogo NB300-141, EUA) a uma diluição de 1: 1000; IBA (Wako, número de catálogo 016-20001, EUA) a uma diluição de 1: 100; IL1-? (Genway, número de catálogo 18-732-292194, CA, EUA) a uma diluição de 1: 100; TNF-a (Peprotech, número de catálogo # 500-P64, EUA) a

uma diluição de 1:50; TGF- β (Abcam, número de catálogo ab66043, EUA) a uma diluição de 1:50; e IL10 (Abcam, número de catálogo: ab189392, EUA) a uma diluição de 1:50.

O Anti-*S. mansoni* de camundongo foi obtido de camundongos infectados com uma carga parasitária de 96 ovos por grama de fezes. Da mesma forma, o Anti-*S. mansoni* de humano foi obtido de um paciente infectado com uma carga parasitária de 96 ovos por grama de fezes.

Todos os anticorpos foram adicionados durante a noite a 4 ° C. Após a lavagem, os cortes foram incubados com anticorpo secundário conjugado à biotina por 1 h (DakoCytomation, Biotinylated Link Universal HRP; número de catálogo: K0690, CA, EUA), e foram então revelados utilizando 30-3-diaminobenzidina (DAB) com cromogénio. Os cortes foram contra-corados com hematoxilina de Carrazi e foram montadas em Entellan (Merck, número de catálogo: 1079610100, EUA). A densidade de pixels foi medida em cinco áreas coradas utilizando o software GIMP 2.10.4 (software GNU Image Manipulation Program, CNET Networks, Inc., Austrália).

4.2.6 Análise Estatística

Para a imuno-histoquímica, a densidade de pixels foi medida em cinco áreas coradas usando o *software* (GIMP 2.10.4). Os testes neurofuncionais e imunohistoquímica foram analisados através do *software GraphPad Prism V7.0* (San Diego, CA, EUA). O two-way ANOVA fez comparações múltiplas entre os grupos dos testes neurofuncionais e a análise do teste T foi usada para comparar os grupos da imunohistoquímica. Os resultados foram expressos como média \pm DP. Todas as análises foram realizadas com valor de $p < 0,05$ significância estatística.

4.2.7 Considerações éticas

Todos os estudos in vivo foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais do IAM (nº 89/2015/ Anexo A) e seguiram estritamente as normas vigentes estabelecidas pela Comissão de Ética no Uso de Animais do IAM e cumpriu todas as exigências da “Lei Arouca” (Lei 11.794, de 08.10.2008) e normativas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

5 RESULTADOS

Para melhorar o entendimento dos resultados encontrados e compreensão dos momentos do trabalho os resultados foram divididos de acordo com os objetivos.

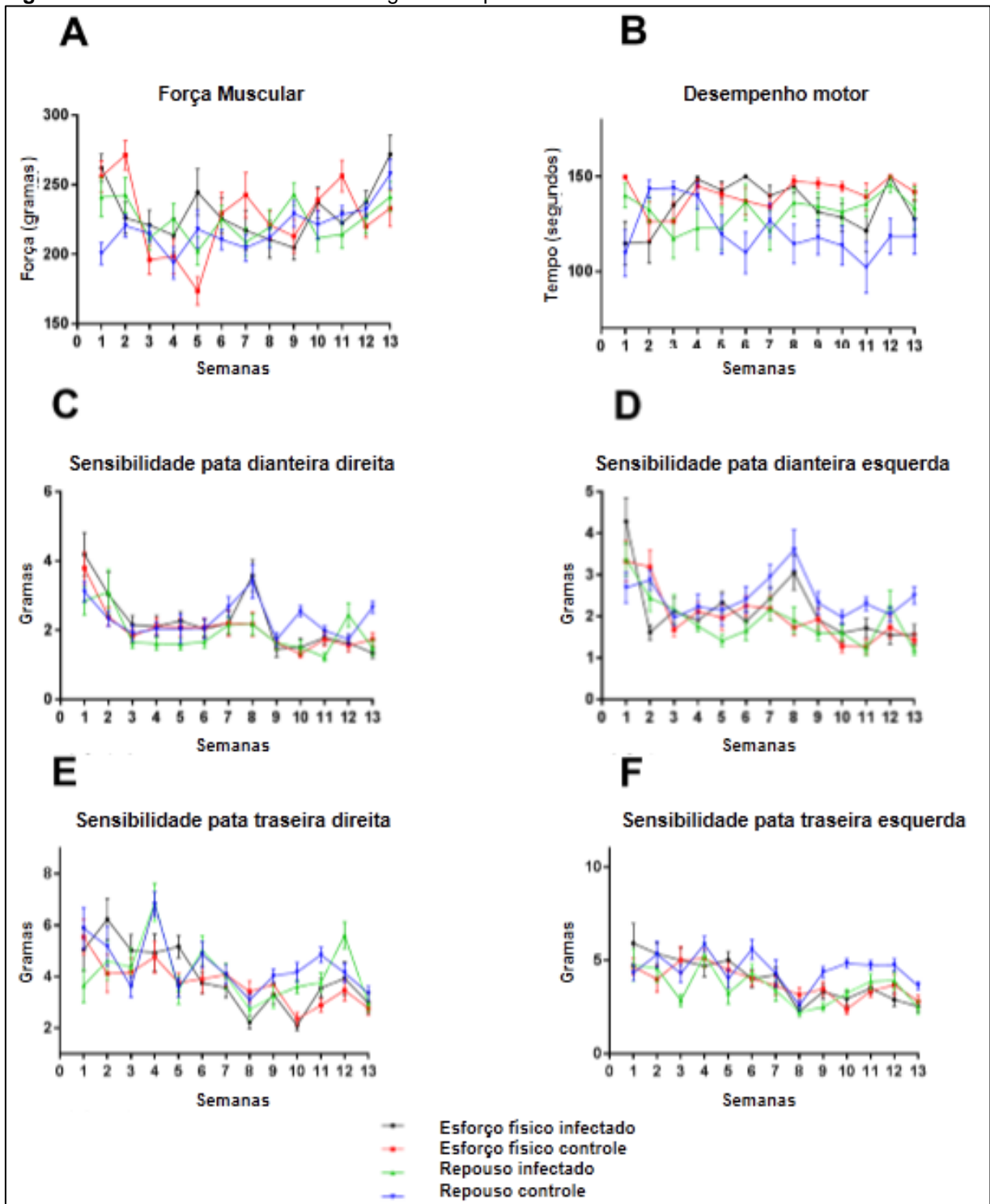
5.1 Resultados do objetivo A

A primeira parte do trabalho na qual foi investigada qual a principal causa de morte dos animais infectados com *S. mansoni* (objetivo A) foi publicada e os resultados e discussão estão no artigo em anexo (Apêndice C).

5.2 Resultados dos objetivos B, C e D

Inicialmente, os animais foram divididos nos seguintes grupos: controle de repouso, controle do esforço físico, repouso infectado e esforço físico infectado. Os resultados obtidos com o *Grip Strength Meter* (avaliação da força muscular) indicaram que não houve diferenças significativas entre os grupos estudados (Figura 7A). Da mesma forma, o desempenho motor avaliado pelo teste Rota-Rod não mostrou diferenças significativas entre os grupos (Figura 7B). Em relação à sensibilidade da pata, nas análises utilizando o analgesímetro digital, os grupos tiveram desempenho semelhante (Figuras 7C, D, E, F). Assim, os resultados obtidos indicaram que o esforço físico não influenciou no aparecimento dos sintomas da neuroesquistossomose.

Figura 7. Testes neurofuncionais ao longo do tempo.



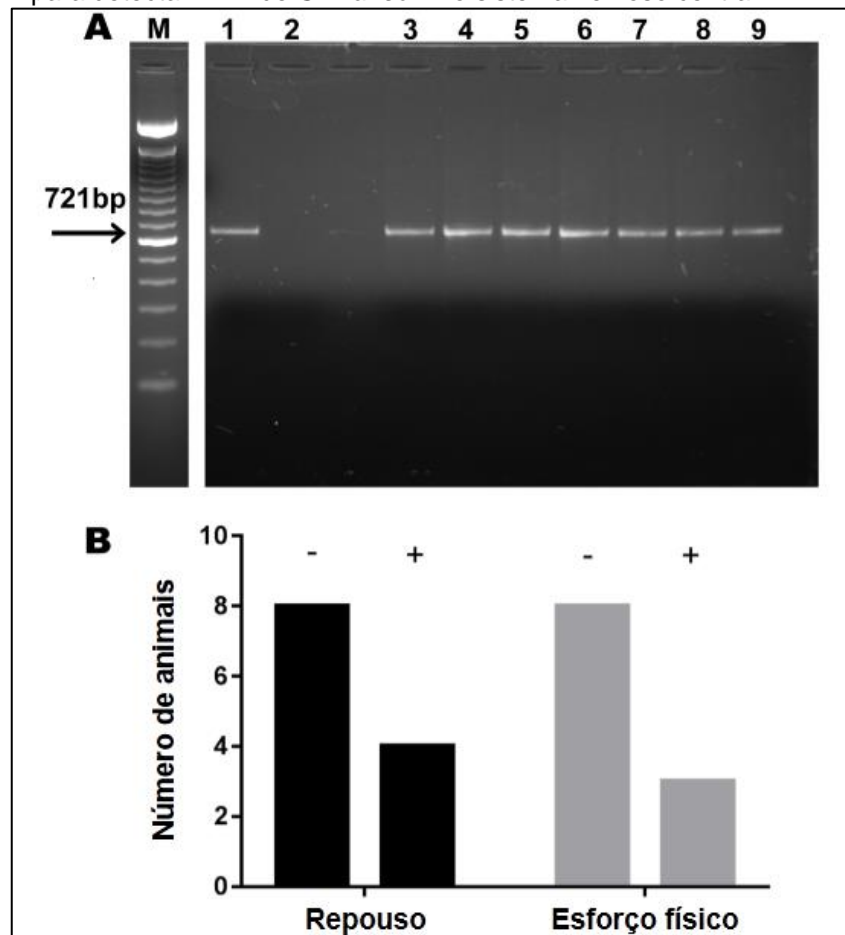
Fonte: O autor

Legenda: **A.** Comparação das variações na força muscular ao longo do tempo. **B:** Comparação das variações no desempenho do motor ao longo do tempo. **C:** Comparação das variações na sensibilidade da pata dianteira direita ao longo do tempo. **D:** Comparação das variações na sensibilidade da pata dianteira esquerda ao longo do tempo. **E:** Comparação das variações na sensibilidade da pata traseira direita ao longo do tempo. **F:** Comparação das variações na sensibilidade da pata traseira esquerda ao longo do tempo. Os resultados são expressos como média \pm desvio padrão de dez animais diferentes por grupo (Two-way ANOVA).

5.2.1 Diagnóstico molecular de *S. mansoni*

A fim de confirmar que o esforço físico não influenciou o desenvolvimento da neuroesquistossomose, realizamos NPCR para detectar o DNA de *S. mansoni* no sistema nervoso central. Quatro animais do grupo de animais infectados em repouso e três do grupo de esforço físico infectado foram positivos para a presença de DNA de *S. mansoni* no cérebro e na medula espinhal. Esses dados corroboram o achado de que o esforço físico não influenciou o desenvolvimento da neuroesquistossomose (Figura 8). Curiosamente, apesar de sete animais do total de 23 animais (30,43%) apresentarem DNA de *S. mansoni* no sistema nervoso central, nenhum deles desenvolveu sintomas de neuroesquistossomose.

Figura 8. NPCR para detectar DNA de *S. mansoni* no sistema nervoso central.



Fonte: O autor

Legenda: **M**: marcador molecular; **1**: controle positivo; **2**: controle negativo; **3**: medula espinhal do grupo esforço físico; **4**: medula espinhal do grupo repouso; **5**: medula espinhal do grupo repouso; **6**: cérebro do grupo repouso; **7**: cérebro do grupo repouso; **8**: medula espinhal do grupo repouso (o mesmo animal que em 7); **9**: medula espinhal do grupo esforço físico; **10**: cérebro do grupo de esforço físico; **B**. As diferenças entre os números de animais negativos e positivos nos grupos de descanso e esforço físico. **(+)** Animal positivo NPCR. **(-)** animal negativo NPCR.

A fim de excluir a possibilidade de quaisquer falsos positivos de DNA de *S. mansoni* obtidos da NPCR, análises imunohistoquímicas específicas foram realizadas para antígenos de *S. mansoni* no cérebro e medula espinhal. Amostras de fígado de animais infectados com *S. mansoni* e controles foram usadas como controles positivo e negativo, respectivamente. Usamos soro de um paciente infectado (com uma carga parasitária de 96 ovos por grama de fezes), a fim de excluir a possibilidade de não-especificidade da imunodeteção. As amostras de fígado de controle não mostraram qualquer marcação (Figura 9A), enquanto que o grupo infectado com *S. mansoni* mostrou imunorreatividade evidente, principalmente dentro de células de Kupffer em redor de ovos de *S. mansoni* (Figura 9B). Resultados semelhantes foram obtidos quando usamos soro obtido de camundongos infectados com *S. mansoni* (com uma carga parasitária de 96 ovos por grama de fezes) (Figuras 9C e D). Cérebro e amostras de medula espinhal que tinham sido encontrados para ser positivo para *S. mansoni* e negativo em NPCR DNA análises foram então avaliadas por meio de análise imuno-histoquímica. Apenas as amostras positivas para *S. mansoni* de análises de DNA de NPCR mostraram marcação positiva para antígenos de *S. mansoni* no cérebro e no material da medula espinhal, com uma reação impressionante dentro da micróglia (Figuras 9E, F, G e H).

Figura 9. Análise imunohistoquímica para *S. mansoni* em tecido hepático do grupo controle.

(continua)

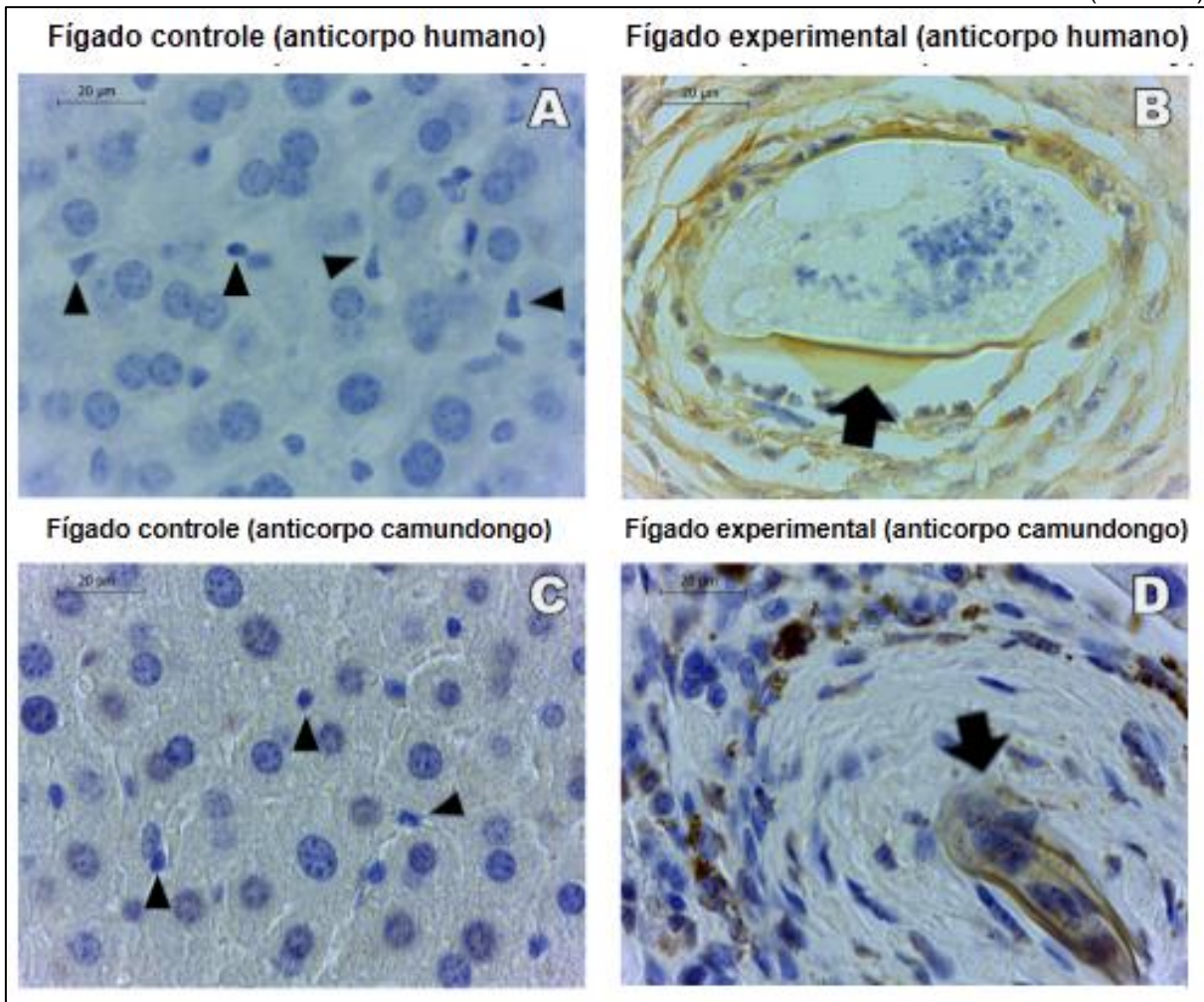
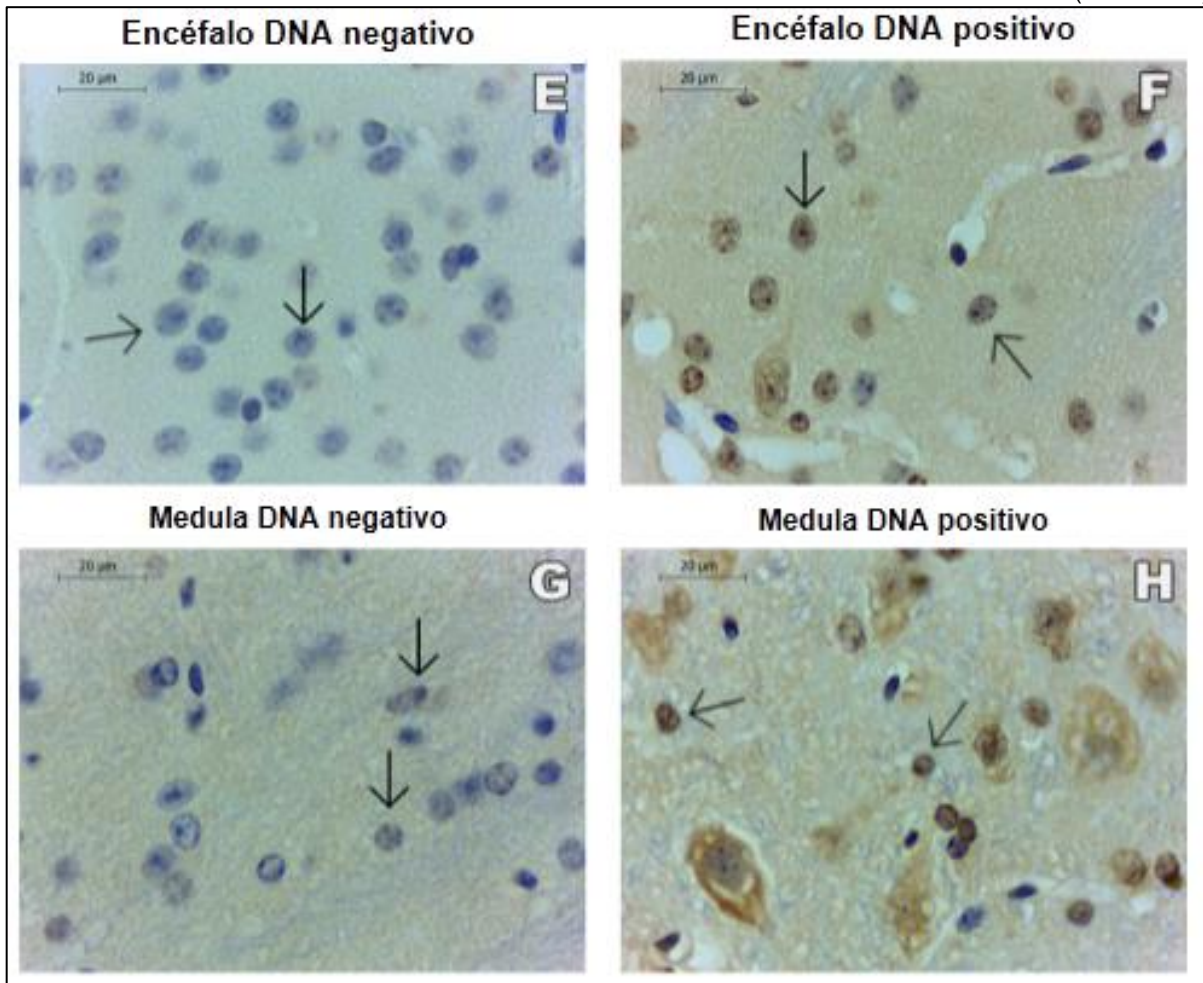


Figura 9. Análise imunohistoquímica para *S. mansoni* em tecido hepático do grupo controle. (conclusão)



Fonte: O autor

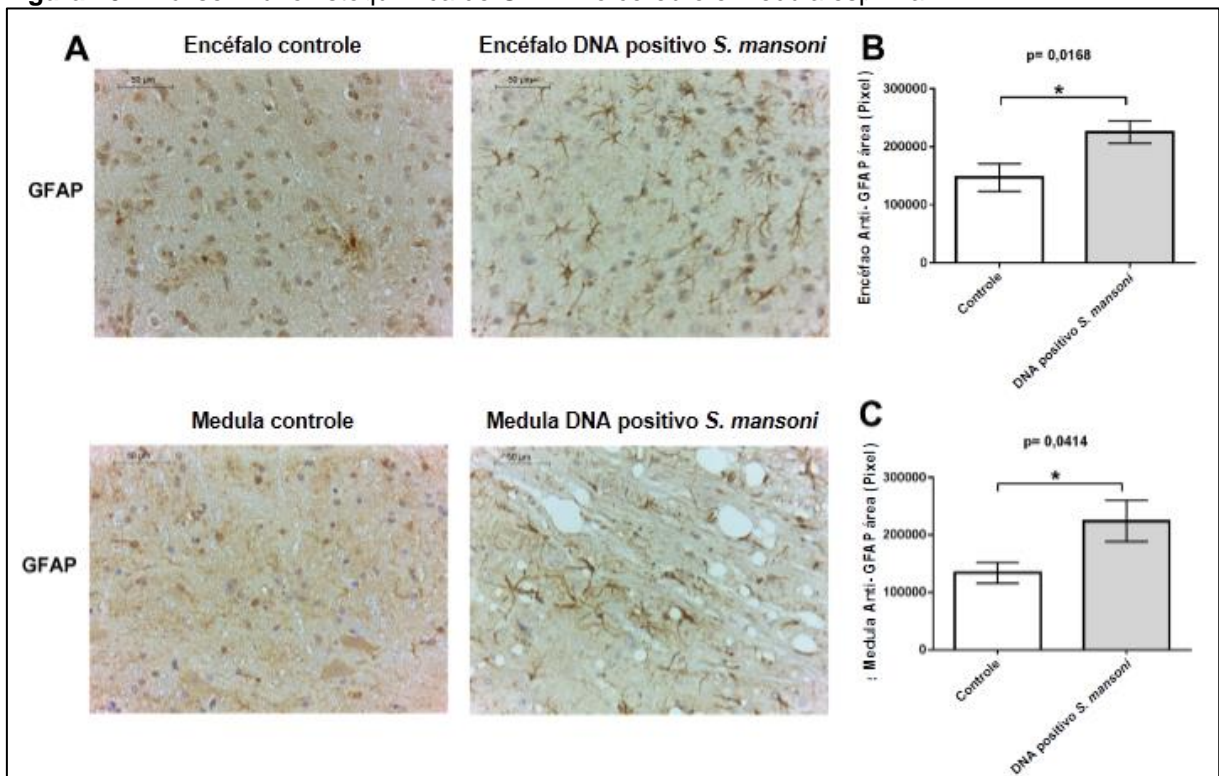
Legenda: **(A)** e grupo experimental **(B)** utilizando soro de paciente humano infectado com carga parasitária de 96 ovos por grama de fezes. **C e D.** Análise imuno-histoquímica para *S. mansoni* em tecido hepático do grupo controle (C) e experimental (D) utilizando soro de camundongos infectados com carga parasitária de 96 ovos por grama de fezes. **E e F.** Análises imuno-histoquímicas para *S. mansoni* em tecido cerebral do grupo experimental com resultado negativo para PCR (E) e grupo experimental com resultado positivo para PCR (F) utilizando soro de camundongos infectados com uma carga parasitária de 96 ovos por grama de fezes. **G e H.** Análise imuno-histoquímica para *S. mansoni* em tecido medular do grupo experimental com resultado negativo para PCR (G) e grupo experimental com resultado positivo para PCR (H) usando soro de camundongos infectados com uma carga parasitária de 96 ovos por grama de fezes. Ovos de *S. mansoni* (setas pretas curtas); Células de Kupffer (cabeças de setas); microglia (setas pretas finas). Barra de escala = 20 µm.

Assim, como os dados analisados a partir dos testes comportamentais, diagnósticos moleculares e ensaios imunohistoquímicos demonstraram que o esforço físico não influenciou no desenvolvimento da neuroesquistossomose, os animais foram agrupados em grupos "DNA positivo para *S. mansoni*" e "não-infectado".

5.2.2 Resposta neuroinflamatória

O próximo passo foi investigar se havia algum processo inflamatório nos animais com neuroesquistossomose. Os astrócitos são importantes marcadores inflamatórios no SNC, pois são altamente reativos a qualquer ataque ao SNC, através de um processo chamado astrogliose reativa (SOFRONIEW; VINTERS, 2010). A GFAP é um constituinte proteico do citoesqueleto de astrócitos que, quando ativado, superexpressa a GFAP em filamentos espessos e alongados (ENG; GHIRNIKAR; LEE, 2000). Os dados imunohistoquímicos revelaram que os astrócitos no grupo não infectado mostraram um fenótipo normal e uma expressão de linha de base de GFAP no tecido do cérebro e da medula espinhal. Em contraste, nas amostras de cérebro e medula espinhal com DNA positivo de *S. mansoni*, os processos astrocíticos foram mais espessos e mais intensamente rotulados para GFAP, indicando assim a astrogliose reativa (Figura 10A), que foi confirmada por análises densitométricas de pixels (Figuras 10B e C).

Figura 10. Análise imunohistoquímica de GFAP no cérebro e medula espinhal.

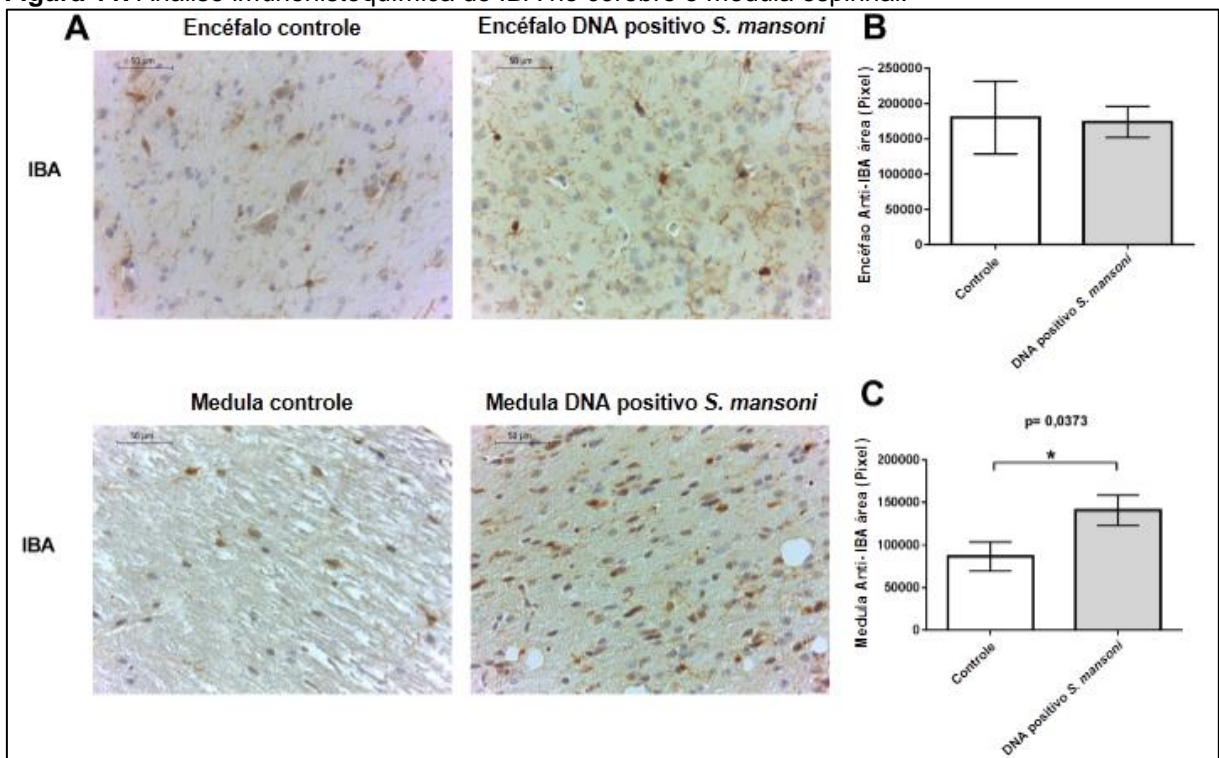


Fonte: O autor

Legenda: **A.** Fotomicrografia do tecido nervoso com marcação imunohistoquímica de GFAP. **B.** Análise densitométricas de GFAP no cérebro. **C.** Análise densitométrica de GFAP na medula espinhal. Os resultados são expressos como média \pm desvio padrão de cinco animais diferentes por grupo (testes t de Student não pareados). Barra de escala = 50 μ m.

Outro marcador importante foi o IBA, que é uma proteína cuja expressão é restrita à microglia (OHSAWA et al., 2004). Quando o cérebro está lesionado ou doente, a microglia muda de um estado ativo para um estado de repouso, migra para o local da lesão, prolifera e libera várias citocinas pró-inflamatórias e se torna fagocítica (KREUTZBERG, 1996; RAIVICH et al., 1999). Nenhuma diferença estatisticamente significativa foi observada nas amostras de cérebro (Figura 11B). Em contraste, o tecido da medula espinal de camundongos infectados com *S. mansoni* mostrou microglia que foram intensamente marcados com IBA (Figuras 11A e C), indicando assim a presença de microgliose reativa.

Figura 11. Análise imunohistoquímica de IBA no cérebro e medula espinal.



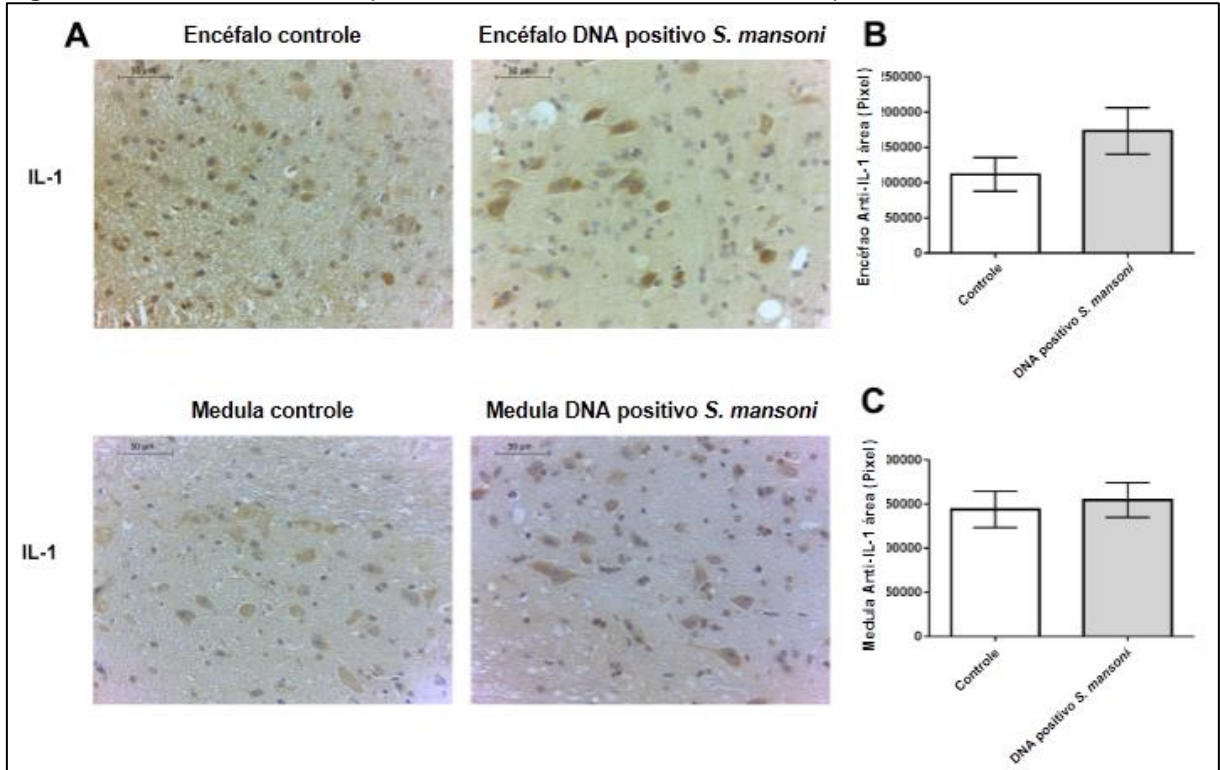
Fonte: O autor

Legenda: **A.** Fotomicrografia do tecido nervoso com marcação imunohistoquímica de IBA **B.** Análise densitométrica de IBA no cérebro. **C.** Análise densitométrica de IBA na medula espinal. Os resultados são expressos como média \pm desvio padrão de cinco animais diferentes por grupo (testes t de Student não pareados). Barra de escala = 50 μ m.

Embora IL1- β e TNF- α sejam importantes citocinas pró-inflamatórias, no SNC têm outro papel fisiológico (WANG et al., 2015). Não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos em relação à análise imunohistoquímica para IL1- β (Figura 12). Por outro lado, os grupos de DNA positivos para *S. mansoni* mostraram

reduções significativas na imunopressão de TNF- α , tanto na medula espinhal quanto no tecido cerebral (Figura 13).

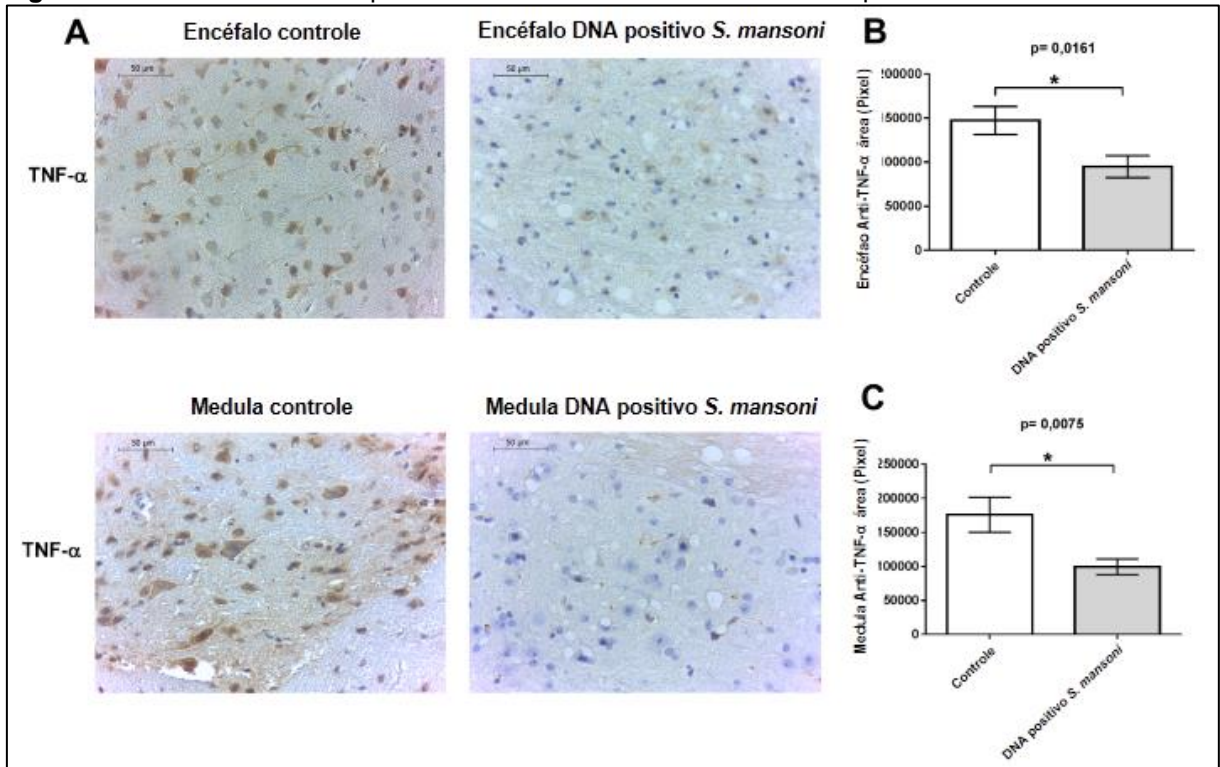
Figura 12. Análise imunohistoquímica de IL-1 no cérebro e medula espinhal.



Fonte: O autor

Legenda: **A.** Fotomicrografia do tecido nervoso com marcação imunohistoquímica para IL-1. **B.** Análise densitométrica de IL-1 no cérebro. **C.** Análise densitométrica de IL-1 na medula espinhal. Os resultados são expressos como média \pm desvio padrão de cinco animais diferentes por grupo (testes t de Student não pareados). Barra de escala = 50 μ m.

Figura 13. Análise imunohistoquímica de TNF- α no cérebro e medula espinhal.

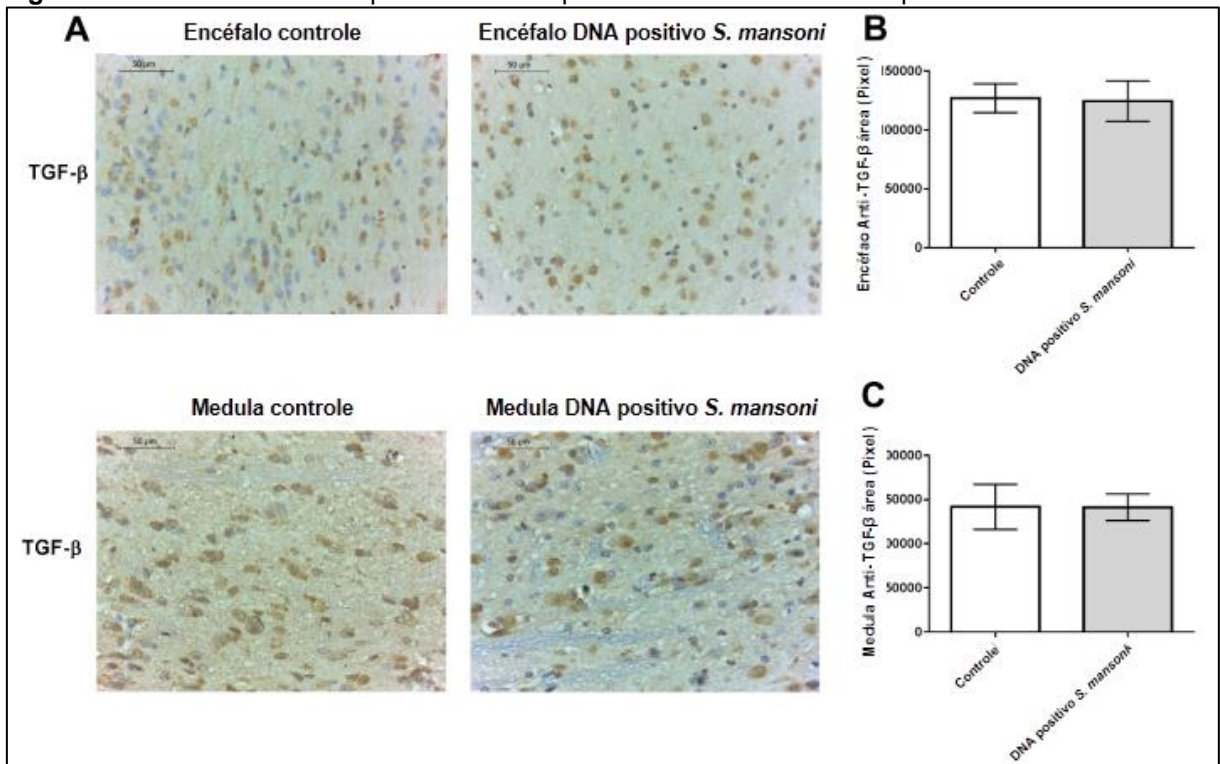


Fonte: O autor

Legenda: **A.** Fotomicrografia do tecido nervoso com marcação imunohistoquímica para TNF- α . **B.** Análises densitométricas de TNF- α no cérebro. **C.** Análise densitométrica de TNF- α na medula espinhal. Os resultados são expressos como média \pm desvio padrão de cinco animais diferentes por grupo (testes t de Student não pareados). Barra de escala = 50 μ m.

TGF β e IL10 são citocinas envolvidas em doenças inflamatórias crônicas. A imunomarcação para TGF β não mostrou qualquer diferença estatisticamente significativa entre os grupos (Figura 14), enquanto o grupo de DNA positivo para *S. mansoni* mostrou expressão elevada de IL10 nos neurônios da medula espinhal, em comparação com o grupo não infectado (Figura 15). Esses dados indicaram que o DNA positivo para *S. mansoni* apresentou um perfil crônico de citocinas.

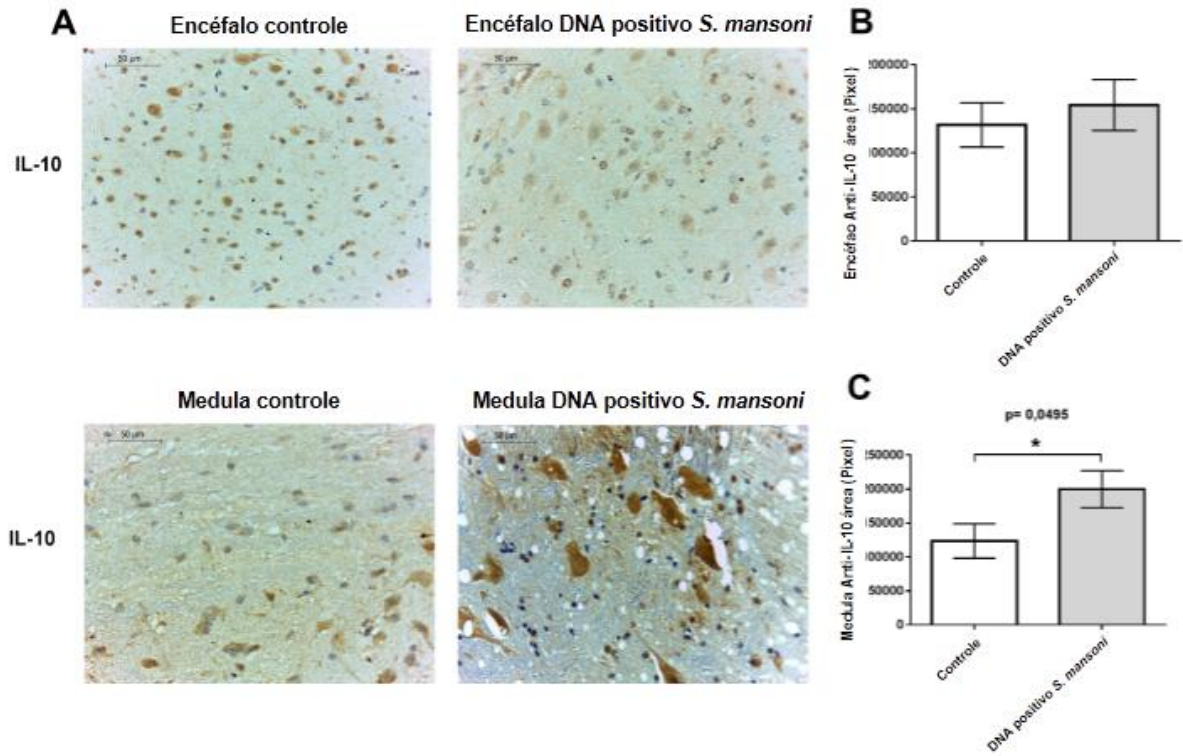
Figura 14. Análise imunohistoquímica de TGF- β no cérebro e na medula espinhal.



Fonte: O autor

Legenda: **A.** Fotomicrografia do tecido nervoso com marcação imunohistoquímica para TGF- β **B.** Análise densitométrica de TGF- β no cérebro. **C.** Análise densitométrica de TGF- β na medula espinhal. Os resultados são expressos como média \pm desvio padrão de cinco animais diferentes por grupo (testes t de Student não pareados). Barra de escala = 50 μ m.

Figura 15. Análise imunohistoquímica de IL-10 no cérebro e medula espinhal.



Fonte: O autor

Legenda: **A.** Fotomicrografia do tecido nervoso com marcação imunohistoquímica para IL-10. **B.** Análise densitométrica de IL-10 no cérebro. **C.** Análise densitométrica de IL-10 na medula espinhal. Os resultados são expressos como média \pm desvio padrão de cinco animais diferentes por grupo (testes t de Student não pareados). Barra de escala = 50 μ m.

6 DISCUSSÃO

A primeira questão que foi investigada no presente estudo foi se o esforço físico poderia estar relacionado ao desenvolvimento da neuroesquistossomose no modelo murino. Embora menos frequente, os ovos de *S. mansoni* podem entrar na medula espinhal através da circulação do plexo avalvular de Batson (FERRARI; MOREIRA; CUNHA, 2008). O sistema nervoso também pode ser embolizado pela circulação sistêmica por meio da migração anterógrada do ovo devido a anastomoses portopulmonares, como resultado da hipertensão portal (FERRARI, 2004; KATCHANOV; NAWA, 2010; PITTELLA, 1997). Acredita-se que a neuroesquistossomose seja facilitada pelo aumento da pressão intra-abdominal, principalmente pelo uso da manobra de Valsalva, que é comumente realizada em situações de alto esforço físico. Portanto, investigamos se o esforço físico pode influenciar o surgimento da neuroesquistossomose. Os resultados obtidos por meio de testes de sensibilidade mecânica, força muscular e desempenho motor indicaram que os esforços físicos não influenciaram o aparecimento dos sintomas da neuroesquistossomose. Estes resultados foram confirmados por PCR Nested para detectar DNA de *S. mansoni* no sistema nervoso central.

A NPCR demonstrou que alguns animais cronicamente infectados apresentaram DNA de *S. mansoni* no sistema nervoso central. No entanto, nenhum desses animais desenvolveu sintomas de neuroesquistossomose, como avaliado através de testes neurofuncionais. Curiosamente, os casos clínicos de mielopatia aguda sintomática não foram correlacionados com as formas mais crônicas de esquistossomose (FERRARI; MOREIRA; CUNHA, 2004; SCRIMGEOUR; GAJDUSEK, 1985). Em contraste, sabe-se que formas assintomáticas de neurosistocitose cerebral são freqüentemente associadas a formas crônicas da doença. Além disso, Pitella e Lana-Peixoto (1981) investigaram os cérebros de 46 pacientes com esquistossomose mansoni crônica e identificaram ovos em 12 cérebros (26%). (PITTELLA; LANA-PEIXOTO, 1981). Essa alta frequência de neuroesquistossomose-assintomática foi confirmada pelos presentes resultados, uma vez que 30,43% dos animais cronicamente infectados apresentaram DNA de *S. mansoni* no sistema nervoso central.

Outra questão que precisa ser mencionada é o tipo de lesão nervosa e sua influência na função motora. A motricidade é produzida através de uma rede complexa e adaptativa de tratos neuronais e vias de reflexo, juntamente com circuitos geradores de padrões. Todos esses mecanismos interferem diretamente na plasticidade neural e com sistemas altamente compensatórios (HURD; WEISHAUP; FOUAD, 2013). Os animais são frequentemente capazes de compensar ou até mesmo de reaprender tarefas ou comportamentos. Nos mamíferos, o mecanismo de preensão funciona através das fibras corticospinais e / ou do trato espinhal (KANAGAL; MUIR, 2007; MORRIS et al., 2011; STACKHOUSE; MURRAY; SHUMSKY, 2008).

Previamente, desenvolvemos um modelo de mielorradiculopatia para esquistossomose e observamos que, mesmo após a inoculação direta dos ovos de *S. mansoni* na medula espinhal de ratos Wistar, as alterações sensoriais e motoras não foram suficientes para afetar a funcionalidade dos animais, indicando a possibilidade de alta neuroplasticidade pode existir (CARVALHO et al., 2017). Outros autores mostraram que, mesmo em situações de lesões mecânicas da medula espinhal, a recuperação das funções comportamentais geralmente ocorre além da primeira semana após a lesão e, portanto, nenhum estímulo constante é necessário para ativar a função neural (BAREYRE et al., 2004). Portanto, no presente estudo, além da possibilidade de os animais terem a forma assintomática da doença, o mecanismo de plasticidade pode ter prevalecido e impedido a apresentação de sinais e sintomas.

Existe, portanto, a possibilidade de que, mesmo com um padrão assintomático, os ovos possam ter se alojado no tecido nervoso e liberado antígenos, desencadeando uma cascata inflamatória. Existem agora evidências mostrando que imunocomplexos contendo antígenos estão presentes no líquido cefalorraquidiano de pacientes com esquistossomose espinhal (BRUSCKY et al., 2016; FERRARI et al., 2011). Embora processos patológicos possam comprometer o desempenho da barreira hematoencefálica, a passagem de moléculas grandes não se tornaria possível. Portanto, imunocomplexos detectados no sistema nervoso central seriam decorrentes de processos inflamatórios locais e não de inflamação sistêmica (FERRARI et al., 2011). Os dados apresentados mostraram que apenas os tecidos do cérebro e medula espinhal com DNA positivo para *S. mansoni* mostraram reatividade aos antígenos de *S. mansoni* em ensaios imunohistoquímicos. Esses resultados

sugerem que, embora não tenha sido possível identificar ovos de *S. mansoni* no SNC, foram liberados antígenos que puderam ser identificados com imunomarcadores.

Em relação à resposta imune, sabe-se que a esquistossomose apresenta uma reação devido ao estágio de desenvolvimento do granuloma, uma vez que sequestra antígenos secretados pelos ovos, prevenindo uma resposta inflamatória descontrolada e dano tecidual. Esse processo envolve eosinófilos, linfócitos T CD4 e monócitos, com evolução de uma resposta do perfil Th1 para uma resposta de citocinas Th2 (GRYSEELS, 2012; PEARCE, 2005; WYNN et al., 2004). Através dos resultados apresentados, sinais claros de inflamação foram detectados no SNC, no entanto, é necessário saber qual é o perfil de citocinas relacionadas à neuroesquistossomose murina. Em um estudo desenvolvido por Ferrari et al., 2006 os níveis de IL-1, IL-4, IL-6 e IL-10 foram significativamente elevados no líquido cefalorraquidiano e no soro de pacientes com esquistossomose medular, mas apenas IL-1 e IL-10 níveis foram elevados no soro (FERRARI et al., 2006).

É importante discutir o perfil inflamatório apresentado pelos animais com neuroesquistossomose. Após o dano tecidual, a ação dos macrófagos M1 facilita a cascata inflamatória e ajuda na remoção de detritos do local da lesão. Posteriormente, os macrófagos M2 podem realizar o reparo. Nesta fase, ocorre a elevação de citocinas imunossupressoras. A IL-10 é aquela que se torna altamente elevada nesse estágio (GALLI; BORREGAARD; WYNN, 2011; MOSSER; EDWARDS, 2008; VAN ASSCHE et al., 2011). Quando a doença se torna crônica, a fase de remodelação começa. Este é dominado principalmente pelo TGF β e CD206 (LECH; ANDERS, 2013; NOVAK; KOH, 2013). No presente estudo, a alta imunoexpressão de IL10 indicou a presença de um processo inflamatório crônico, embora a expressão de TGF β não tenha sido elevada nos animais com DNA positivo para *S. mansoni*. Isso provavelmente sugere que o processo de remodelação do tecido está em uma fase inicial.

A IL-1 β é geralmente conhecida como uma citocina pró-inflamatória. É principalmente produzido por monócitos, macrófagos e células dendríticas. No entanto, há evidências de que ele apoia a plasticidade sináptica e a transmissão neural, o que amplia seu papel de mediador inflamatório para um neuromodulador importante (VITKOVIC; BOCKAERT; JACQUE, 2001). No SNC, a IL-1 β apresenta níveis basais, que podem ser supra-regulados em resposta a inflamação sistêmica,

dano cerebral isquêmico e infecções. Desempenha um papel como importante mediador inflamatório (MARTIN, 1995). O SNC é composto por até cinco tipos diferentes de células (células endoteliais, astrócitos, microglia, oligodendrócitos e neurônios que podem produzir IL-1 β). Entretanto, a microglia é a principal fonte de produção dessa citocina em situações de inflamação (PINTEAUX; TROTTER; SIMI, 2009). Seus efeitos auxiliam na angiogênese e na plasticidade dos vasos, pois induzem a produção do fator de crescimento endotelial vascular pelos astrócitos (ARGAW et al., 2006) e também induzem a astrogliose (JOHN et al., 2004).

Em condições fisiológicas, o TNF- α circula em níveis baixos no SNC e exerce um papel excitatório nele (BOULANGER, 2009). Além desse papel excitatório, o TNF- α ativa a micróglia e os astrócitos, mediados por lesão, regulação da permeabilidade da barreira hematoencefálica, respostas febris, transmissão glutamatérgica e plasticidade sináptica (BEATTIE et al., 2002; CHUNG et al., 2005; LEON, 2002; SEDGWICK et al., 2000). Além disso, citocinas antiinflamatórias incluindo IL-10, IL-13 e IL-4 podem inibir a produção de TNF- α (GERARD, 1993; MALEFYT et al., 1991). O fato de que IL-1 β e TNF- α não apresentaram expressão significativa em DNA positivo para *S. mansoni* indica que a resposta imunológica não apresentou perfil Th1.

A IL-10 inibe a produção de citocinas pró-inflamatórias na micróglia e, conseqüentemente, protege os astrócitos dos efeitos prolongados da inflamação (BALASINGAM; WEE YONG, 1996; LEDEBOER et al., 2002). Além disso, a IL-10 derivada da microglia aumenta a produção de TGF- β pelos astrócitos, que se alimenta como atenuante da ativação da microglia, atuando assim como um mediador principal de crosstalk entre microglia e astrócitos (NORDEN et al., 2014). Encontramos elevada expressão de IL-10 nos animais com DNA positivo para *S. mansoni*, caracterizando infecção por um perfil inflamatório crônico.

Pacientes com lesão medular traumática expressam níveis de RNAm de TGF β que podem ser correlacionados com os resultados observados entre animais experimentais (LAGORD; BERRY; LOGAN, 2002; MCTIGUE et al., 2000). Um estudo clínico conduzido por Buss em 2008, demonstrou que após a lesão traumática da medula espinhal, os níveis de TGF β permaneceram regulados positivamente em neurônios, astrócitos e macrófagos invasores. Eles mostraram imunorreatividade 24 dias após a lesão e permaneceram elevados por cerca de um ano em macrófagos e

astrócitos (BUSS et al., 2008). Curiosamente, no presente estudo, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos, o que possivelmente pode ser explicado pela imunorreatividade diferencial específica da espécie.

Em geral, a neuroesquistossomose ocorre na fase crônica da esquistossomose e, portanto, pode-se esperar que um perfil Th2 seja prevalente. Isso foi demonstrado em um estudo clínico conduzido por Ferrari et al. (2006) em que líquido cefalorraquidiano e soro apresentaram baixos níveis de TNF- α e IFN- γ , enquanto IL-4 e IL-10 foram suprarregulados (FERRARI et al., 2006). No entanto, não foi possível indicar a partir destes resultados se a inflamação sistêmica interferiu na resposta imune local, ou vice-versa, através da barreira hematoencefálica (BHE). É importante ressaltar que a BHE é altamente seletiva: nem todas as citocinas são transportadas e as taxas de passagem dependem da região e das circunstâncias patognomônicas (BANKS, 2005). Os presentes resultados corroboram essas observações prévias, uma vez que as citocinas pró-inflamatórias, como o TNF- α , apresentaram baixa expressão, enquanto a citocina anti-inflamatória IL-10 apresentou níveis elevados. Esses achados sugerem que houve uma mudança inflamatória para uma resposta imune do tipo 2, que provavelmente ocorre localmente na patogênese da neuroesquistossomose.

7 CONCLUSÃO

O primeiro momento do estudo mostrou que a principal causa de óbito precoce na infecção murina por *S. mansoni* é a isquemia mesentérica, além de auxiliar a delimitação da carga parasitária a ser utilizada na infecção do segundo momento, diminuir a mortalidade, reduzir o número de animais por experimento, recursos financeiros e operacionais.

Este trabalho foi o primeiro estudo a demonstrar experimentalmente que a neuroesquistossomose não é influenciada pelo esforço físico. Além disso, verificou-se um percentual de 30,43% de animais com neuroesquistossomose. Todos os animais foram assintomáticos sua resposta inflamatória característica tende a um perfil Th2.

Este trabalho gera o questionamento se realmente o exercício físico e a manobra de Valsalva influenciam o surgimento da neuroesquistossomose em humanos, pois até o momento esta hipótese é sustentada por inferências que atrasam a intervenção fisioterapêutica e pioram o prognóstico dos pacientes acometidos por esta afecção. Novos estudos são necessários para identificar e compreender as vias biológicas da neuroesquistossomose e promover o desenvolvimento de seu diagnóstico precoce.

REFERÊNCIAS

- ABATH, F. G. C. et al. Single-Tube Nested PCR Using Immobilized Internal Primers. **BioTechniques**, London, v. 33, n. 6, p. 1210–1214, dez. 2002.
- ALOE, L. et al. Chronic parasite infection in mice induces brain granulomas and differentially alters brain nerve growth factor levels and thermal responses in paws. **Acta neuropathologica**, Berlin, v. 92, n. 3, p. 300–305, set. 1996.
- AMORIM, A. G. et al. Genital Schistosomiasis: A Report on Two Cases of Ovarian Carcinomas Containing Viable Eggs of *Schistosoma mansoni*. **Case Reports in Obstetrics and Gynecology**, London, v. 2014, p. 1-5, 2014. Disponível em: < <https://www.hindawi.com/journals/crivam/2011/108215/>> Acesso em: 7 abr. 2017.
- ANDRADE FILHO, S. A. et al. Neuroesquistossomose mansônica: Aspectos clínicos, laboratoriais e terapêuticos. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, São Paulo, v. 54, n. 2, p. 232–237, 1996.
- ARGAW, A. T. et al. IL-1 Regulates Blood-Brain Barrier Permeability via Reactivation of the Hypoxia-Angiogenesis Program. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 177, n. 8, p. 5574–5584, 15 out. 2006.
- BACELAR, A. et al. Association between prostate cancer and schistosomiasis in young patients: a case report and literature review. **Brazilian journal of infectious diseases**, Salvador, v. 11, n. 5, p. 520–522, 2007.
- BALASINGAM, V.; WEE YONG, V. Attenuation of Astroglial Reactivity by Interleukin-10. **Journal of Neuroscience**, Baltimore, v. 16, n. 9, p. 2945–2955, 1996.
- BANKS, W. Blood-Brain Barrier Transport of Cytokines: A Mechanism for Neuropathology. **Current Pharmaceutical Design**, Schiphol, v. 11, n. 8, p. 973–984, 2005.
- BARBOSA, C. S.; SILVA, C. B. Epidemiologia da esquistossomose mansônica no engenho Bela Rosa, Município de São Lourenço da Mata, PE. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 8, n. 1950, p. 83–87, 1992.
- BAREYRE, F. M. et al. The injured spinal cord spontaneously forms a new intraspinal circuit in adult rats. **Nature Neuroscience**, New York, v. 7, n. 3, p. 269–277, 15 mar. 2004.
- BEATTIE, E. C. et al. Control of Synaptic Strength by Glial TNFalpha. **Science**, Washington DC, v. 295, n. 5563, p. 2282–2285, 22 mar. 2002.
- BENNET, J.; PLUM, F. **Tratado de Medicina Interna**. 20. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997.
- BOULANGER, L. M. Immune Proteins in Brain Development and Synaptic Plasticity. **Neuron**, Cambridge, v. 64, n. 1, p. 93–109, 2009.

BRASIL, Ministério da Saúde. **Guia de Vigilância Epidemiológica**. 6. ed. Brasília, DF, 2005.816 p. (Série A. Normas e Manuais Técnicos).

BRASIL, Ministério da Saúde. **Vigilância da Esquistossomose Mansonii**: diretrizes técnicas. 4. ed. Brasília, DF, 2014.

BRUIJNING, C. F. The mechanism of the passage of the schistosoma mansonii egg through the wall of the blood vessel. **Tropical and geographical medicine**, Chicago, v. 16, p. 159–163, 1964.

BRUSCKY, I. S. et al. Nested polymerase chain reaction in cerebrospinal fluid for diagnosing spinal cord schistosomiasis: A promising method. **Journal of the Neurological Sciences**, New Orleans, v. 366, p. 87–90, 2016.

BUSS, A. et al. TGF- b 1 and TGF- b 2 expression after traumatic human spinal cord injury. **Spinal Cord**, Houndmills, v. 46, n. 5, p. 364–371, 2008.

BYRAM, J. E.; VON LICHTENBERG, F. Altered schistosome granuloma formation in nude mice. **American journal of tropical medicine and hygiene**, Baltimore, v. 26, n. 5 Pt 1, p. 944–956, 1977.

CAROD ARTAL, F. J. et al. Schistosoma mansonii myelopathy: clinical and pathologic findings. **Neurology**, New York, v. 63, n. 2, p. 388–391, 2004.

CARVALHO, A.; MARTINS FILHO, A.; OLIVEIRA, R. A resposta imune na forma crônica da esquistossomose mansonii. In: CARVALHO, O.; COELHO, P.; LENZI, H. (Eds.). **Schistosoma mansonii e esquistossomose: uma visão multidisciplinar**. 20 ed. Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz, 2008. p. 670–716.

CARVALHO, T. P. V. et al. Development of an experimental model of schistosomal myeloradiculopathy. **Acta Tropica**, Basel, v. 167, p. 142–147, 2017.

CARVALHO, T. P. V. DE et al. Aplicação da CIF na mielorradiculopatia esquistossomótica: estudo de casos. **Revista CIF Brasil**, Jandira, v. 2, n. 2, p. 2–10, 2015.

CAVALCANTI, M.; FERNANDES, E.; CARVALHO, M. Imunologia. In: HUGGINS, D.; SIQUEIRA-BATISTA, R.; MEDEIROS, L. (Ed.). **Esquistossomose mansonii**. São Paulo: Moreira Jr., 1998. p. 33–38.

CHEEVER, A.; DUVALL, R. Single and repeated infections of grivet monkeys with Schistosoma mansonii: parasitological and pathological observations over a 31-month period. **American journal of tropical medicine and hygiene**, Baltimore, v. 23, p. 884–894, 1974.

CHUNG, C. Y. et al. Cell type-specific gene expression of midbrain dopaminergic neurons reveals molecules involved in their vulnerability and protection. **Human Molecular Genetics**, Oxford, v. 14, n. 13, p. 1709–1725, 2005.

DAWSON, P. M. An historical sketch of the Valsalva experiment. **Bulletin of the**

History of Medicine, Baltimore, v. 14, p. 297–305, 1943.

DEFRANCO, A.; LOCKSLEY, R.; ROBERT-SON, M. **Immunity: The immune response in infectious and inflammatory disease**. Northants: New Sciences Press, 2007.

DOENHOFF, M. J. et al. Immunological control of hepatotoxicity and parasite egg excretion in *Schistosoma mansoni* infections: stage specificity of the reactivity of immune serum in T-cell deprived mice. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 75, n. 1, p. 41–53, jan. 1981.

DUARTE, M.; LONGATTO FILHO, A.; SCHMITT, F. C. Angiogenesis, haemostasis and cancer: new paradigms and old concerns. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, Rio de Janeiro, v. 43, n. 6, p. 441–449, dez. 2007.

DUNNE, D. W.; JONES, F. M.; DOENHOFF, M. J. The purification, characterization, serological activity and hepatotoxic properties of two cationic glycoproteins (alpha 1 and omega 1) from *Schistosoma mansoni* eggs. **Parasitology**, London, v. 103, Pt 2, p. 225–236, out. 1991.

ECKELMAN, W. C. et al. Justifying the number of animals for each experiment. **Nuclear medicine and biology**, Oxford, v. 34, n. 3, p. 229–232, 2007.

ELHAMMADY, G. et al. Postmortem demonstration of the source of pulmonary thromboembolism: the importance of the autopsy. **Case reports in vascular medicine**, London, v. 2011, 2011. Disponível em: <
<https://www.hindawi.com/journals/crivam/2011/108215/>> Acesso em: 5 dez. 2018.

ENG, L. F.; GHIRNIKAR, R. S.; LEE, Y. L. Glial fibrillary acidic protein: GFAP-thirty-one years (1969-2000). **Neurochemical research**, New York, v. 25, n. 9–10, p. 1439–1451, 2000.

FALLON, P. G. et al. Schistosome infection of transgenic mice defines distinct and contrasting pathogenic roles for IL-4 and IL-13: IL-13 is a profibrotic agent. **Journal of immunology**, Baltimore, v. 164, n. 5, p. 2585–2591, 1 mar. 2000.

FALLON, P. G.; SMITH, P.; DUNNE, D. W. Type 1 and type 2 cytokine-producing mouse CD4+ and CD8+ T cells in acute *Schistosoma mansoni* infection. **European Journal of Immunology**, Weinheim, v. 28, n. 4, p. 1408–1416, abr. 1998.

FAVRE, T. C. et al. Reliability of current estimates of schistosomiasis prevalence in the Rainforest Zone of the state of Pernambuco, Northeastern Brazil. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 101, p. 73–78, set. 2006.

FERRARI, T. C. A. et al. Intrathecal cytokines in spinal cord schistosomiasis. **Journal of Neuroimmunology**, Amsterdam, v. 177, n. 1/2, p. 136–141, 1 ago. 2006.

FERRARI, T. C. A. et al. Identification and characterization of immune complexes in the cerebrospinal fluid of patients with spinal cord schistosomiasis. **Journal of Neuroimmunology**, Amsterdam, v. 230, n. 1/2, p. 188–190, 2011.

FERRARI, T. C. A.; MOREIRA, P. R. R.; CUNHA, A. S. Spinal cord schistosomiasis: a prospective study of 63 cases emphasizing clinical and therapeutic aspects. **Journal of clinical neuroscience**, Melbourne, v. 11, n. 3, p. 246–253, abr. 2004.

FERRARI, T. C. A.; MOREIRA, P. R. R.; CUNHA, A. S. Clinical characterization of neuroschistosomiasis due to *Schistosoma mansoni* and its treatment. **Acta tropica**, Basel, v. 108, n. 2/3, p. 89–97, jan. 2008.

FERRARI, T. C. DE A. Involvement of central nervous system in the schistosomiasis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 99, suppl 1, p. 59–62, ago. 2004.

FIORE, M. et al. *Schistosoma mansoni*: influence of infection on mouse behavior. **Experimental parasitology**, New York, v. 83, n. 1, p. 46–54, jun. 1996.

FIORE, M.; ALOE, L. Neuroinflammatory implication of *Schistosoma mansoni* infection in the mouse. **Archives of physiology and biochemistry**, Lisse, v. 109, n. 4, p. 361–364, 2001.

FOUAD, K.; HURD, C.; MAGNUSON, D. S. K. Functional testing in animal models of spinal cord injury: not as straight forward as one would think. **Frontiers in integrative neuroscience**, Lausanne, v. 7, p. 1-8, jan. 2013.

GALLI, S. J.; BORREGAARD, N.; WYNN, T. A. Phenotypic and functional plasticity of cells of innate immunity: macrophages, mast cells and neutrophils. **Nature Immunology**, New York, v. 12, n. 11, p. 1035–1044, 19 nov. 2011.

GERARD, C. Interleukin 10 reduces the release of tumor necrosis factor and prevents lethality in experimental endotoxemia. **Journal of Experimental Medicine**, New York, v. 177, n. 2, p. 547–550, 1 fev. 1993.

GOMES, E. C. S. et al. Ovarian Manson's Schistosomiasis: Rare Diagnosis or Underestimated Prevalence? **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, Rio de Janeiro, v. 39, n. 5, p. 249–254, 31 maio 2017.

GOMES, E. C. S. et al. Transmissão urbana da esquistossomose: novo cenário epidemiológico na Zona da Mata de Pernambuco. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, São Paulo, v. 19, n. 4, p. 822–834, 2016a.

GOMES, E. C. S. et al. First Record of Prostatic Schistosomiasis in Pernambuco, Brazil: Signs of Chronicity in an Endemic Disease. **Revista de Patologia Tropical**, Goiânia, v. 45, n. 1, p. 132, 2016b.

GOPALKRISHNAN, P.; SLUKA, K. A. Effect of varying frequency, intensity, and pulse duration of transcutaneous electrical nerve stimulation on primary hyperalgesia in inflamed rats. **Archives of physical medicine and rehabilitation**, Chicago, v. 81, n. 7, p. 984–990, 7 jul. 2000.

GRYSEELS, B. Schistosomiasis. **Infectious disease clinics of North America**,

Philadelphia, v. 26, n. 2, p. 383–397, jun. 2012.

HAMS, E.; AVIELLO, G.; FALLON, P. G. The *Schistosoma* granuloma: Friend or foe? **Frontiers in Immunology**, Lausanne, v. 4, p. 1–8, 2013. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2013.00089/full>>. Acesso em: 20 maio 2017.

HERBERT, D. R. et al. Alternative macrophage activation is essential for survival during schistosomiasis and downmodulates T helper 1 responses and immunopathology. **Immunity**, Cambridge, v. 20, n. 5, p. 623–635, maio 2004.

HOGG, K. G. et al. Interleukin-12 p40 secretion by cutaneous CD11c⁺ and F4/80⁺ cells is a major feature of the innate immune response in mice that develop Th1-mediated protective immunity to *Schistosoma mansoni*. **Infection and immunity**, Washington, v. 71, n. 6, p. 3563–3571, jun. 2003.

HURD, C.; WEISHAUP, N.; FOUAD, K. Anatomical correlates of recovery in single pellet reaching in spinal cord injured rats. **Experimental neurology**, New York, v. 247, p. 605–614, set. 2013.

ISHIYAMA, T. et al. Riluzole slows the progression of neuromuscular dysfunction in the wobbler mouse motor neuron disease. **Brain research**, Amsterdam, v. 1019, n. 1/2, p. 226–236, 3 set. 2004.

JATOBÁ, M. P. et al. Fecal Occult Blood Test and Colonoscopy Diagnosis in 60 Patients. **Revista Brasileira de Coloproctologia**, Rio de Janeiro, v. 28, n. 4, p. 425–430, 2008.

JOHN, G. R. et al. Interleukin-1 Induces a Reactive Astroglial Phenotype via Deactivation of the Rho GTPase-Rock Axis. **Journal of Neuroscience**, Washington DC, v. 24, n. 11, p. 2837–2845, 17 mar. 2004.

KANAGAL, S. G.; MUIR, G. D. Bilateral dorsal funicular lesions alter sensorimotor behaviour in rats. **Experimental Neurology**, New York, v. 205, n. 2, p. 513–524, 1 jun. 2007.

KATCHANOV, J.; NAWA, Y. Helminthic invasion of the central nervous system: many roads lead to Rome. **Parasitology international**, Amsterdam, v. 59, n. 4, p. 491–496, 2010.

KATZ, N.; CHAVES, A.; PELLEGRINO, J. A simple device for quantitative stool thick-smear technique in *Schistosomiasis mansoni*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 14, n. 6, p. 397–400, 1972.

KREUTZBERG, G. W. Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. **Trends in Neurosciences**, Cambridge, v. 19, n. 8, p. 312–318, ago. 1996.

KRUGER, K. et al. Functional and muscular adaptations in an experimental model for isometric strength training in mice. **PLoS One**, San Francisco, v. 8, n. 11, p. e79069, 2013. Disponível em:

<<https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0079069>>. Acesso em: 03 fev. 2015.

LAGORD, C.; BERRY, M.; LOGAN, A. Expression of TGF β 2 but Not TGF β 1 Correlates with the Deposition of Scar Tissue in the Lesioned Spinal Cord. **Molecular and Cellular Neuroscience**, San Diego, v. 20, n. 1, p. 69–92, maio 2002.

LAMBERTUCCI, J. R. et al. Brain schistosomiasis in mice experimentally infected with *Schistosoma mansoni*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v. 47, n. 2, p. 251–253, 2014.

LAMBERTUCCI, J.; SILVA, L.; VOIETA, I. **Esquistossomose Mansônica: Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005.

LECH, M.; ANDERS, H.-J. Macrophages and fibrosis: How resident and infiltrating mononuclear phagocytes orchestrate all phases of tissue injury and repair. **Biochimica et biophysica acta**, Amsterdam, v. 1832, n. 7, p. 989–997, 1 jul. 2013.

LEDEBOER, A. et al. Expression and regulation of interleukin-10 and interleukin-10 receptor in rat astroglial and microglial cells. **European Journal of Neuroscience**, Oxford, v. 16, n. 7, p. 1175–1185, 2002.

LEITE, R. C. H.; HOLANDA, C. M. C. X.; MEDEIROS, P. J. Schistosomiasis and Urothelial Bladder Carcinoma. **Case Reports in Clinical Medicine**, New Jersey, v. 3, p. 528–532, 2014.

LENZI, H. L. et al. Histoarchitecture of schistosomal granuloma development and involution: morphogenetic and biomechanical approaches. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 93, suppl 1, p. 141–151, 1998.

LEON, L. R. Invited Review: Cytokine regulation of fever: studies using gene knockout mice. **Journal of Applied Physiology**, Washington, v. 92, n. 6, p. 2648–2655, 2002.

LINS, R. A. B. et al. Distribution of eosinophils at different stages of hepatic granuloma evolution in mice infected with *Schistosoma mansoni*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v. 41, n. 2, p. 173–178, 2008.

LIVRAMENTO, J. A. MACHADO, L. R.; SILVA, C. L. Síndrome do líquido cefalorraquiano na neuroesquistossomose. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, São Paulo, v. 43, p. 372–377, 1985.

LONGO, W. E.; BALLANTYNE, G. H.; GUSBERG, R. J. Ischemic colitis: patterns and prognosis. **Diseases of the colon and rectum**, Philadelphia, v. 35, n. 8, p. 726–730, ago. 1992.

LOPES, E. J.; DE ALMEIDA, C. E.; JACOBINO, M. Schistosomiasis mansoni in the seminal vesicle. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v. 40, n. 3, p. 341–342, 2007.

MAHMOOD, D. et al. Comparison of antinociceptive and antidiabetic effects of sertraline

and amitriptyline on streptozotocin-induced diabetic rats. **Human and experimental toxicology**, Basingstoke, v. 29, n. 10, p. 881–886, 2010.

MALEFYT, R. W. et al. Interleukin 10 (IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. **Journal of experimental medicine**, New York, v. 174, n. 5, p. 1209-1220, 1991.

MARTIN, D. Protective effect of the interleukin-1 receptor antagonist (IL-1ra) on experimental allergic encephalomyelitis in rats. **Journal of Neuroimmunology**, Amsterdam, v. 61, n. 2, p. 241–245, set. 1995.

MCTIGUE, D. M. et al. Localization of transforming growth factor-beta1 and receptor mRNA after experimental spinal cord injury. **Experimental neurology**, New York, v. 163, n. 1, p. 220–230, maio 2000.

MORENO-CARVALHO, O. A. et al. Clinical and cerebrospinal fluid (CSF) profile and CSF criteria for the diagnosis of spinal cord schistosomiasis. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, São Paulo, v. 61, n. 2B, p. 353–358, jun. 2003.

MORRIS, R. et al. Impaired Arpeggio Movement in Skilled Reaching by Rubrospinal Tract Lesions in the Rat: A Behavioral/Anatomical Fractionation. **Journal of Neurotrauma**, New York, v. 28, n. 12, p. 2439–2451, dez. 2011.

MOSSER, D. M.; EDWARDS, J. P. Exploring the full spectrum of macrophage activation. **Nature Reviews Immunology**, London, v. 8, n. 12, p. 958–969, 1 dez. 2008.

NORDEN, D. M. et al. TGF β produced by IL-10 redirected astrocytes attenuates microglial activation. **Glia**, New York, v. 62, n. 6, p. 881–895, 2014.

NOVAK, M. L.; KOH, T. J. Phenotypic Transitions of Macrophages Orchestrate Tissue Repair. **American Journal of Pathology**, New York, v. 183, n. 5, p. 1352–1363, 1 nov. 2013.

NUNES, K. M. T. et al. Ectopic cutaneous schistosomiasis - Case report. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, Rio de Janeiro, v. 88, n. 6, p. 969–972, dez. 2013.

OHSAWA, K. et al. Microglia / macrophage-specific protein Iba1 binds to fimbrin and enhances its actin-bundling activity. **Journal of neurochemistry**, Oxford, v. 88, n. 4, p. 844-856, 2004.

OLIVEIRA, S. A. et al. Decreased humoral and pathologic responses in undernourished mice infected with *Schistosoma mansoni*. **Parasitology research**, Berlin, v. 93, n. 1, p. 30–35, 2004.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Schistosomiasis**. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs115/en/>>. Acesso em: 2 mar. 2017.

PAZ, J. A. DA et al. Spinal cord schistosomiasis in children: analysis of seven cases. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, São Paulo, v. 60, n. 2A, p. 224–230, jun. 2002.

PEARCE, E. J. Priming of the immune response by schistosome eggs. **Parasite immunology**, Oxford, v. 27, n. 7/8, p. 265–270, jul. 2005.

PEREGRINO, A. J. P. et al. Diagnóstico da esquistossomose medular Contribuição da ressonância magnética e eletroneuromiografia. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, São Paulo, v. 60, n. 3A, p. 597–602, 2002a.

PEREGRINO, A. J. P. et al. Esquistossomose medular: análise de 80 casos. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, São Paulo, v. 60, n. 3A, p. 603–608, 1 set. 2002b.

PERNAMBUCO, Secretaria Estadual de Saúde. **Plano Integrado de Ações para o Enfretamento às Doenças Negligenciadas no Estado de Pernambuco/ SANAR – 2015 - 2018**. Recife: Secretaria Estadual de Saúde, 2015. 46p.

PINTEAUX, E.; TROTTER, P.; SIMI, A. Cell-specific and concentration-dependent actions of interleukin-1 in acute brain inflammation. **Cytokine**, San Diego, v. 45, n. 1, p. 1–7, 2009.

PITTELLA, J. E. H. Neuroschistosomiasis. **Brain Pathology**, Zurich, v. 7, n. 1, p. 649–662, 28 jan. 1997.

PITTELLA, J. E. H.; LANA-PEIXOTO, M. A. Brain involvement in hepatosplenic schistosomiasis mansoni. **Brain**, London, v. 104, n. 3, p. 621–632, set. 1981.

PORDEUS, L. C. et al. A ocorrência das formas aguda e crônica da esquistossomose mansônica no Brasil no período de 1997 a 2006: uma revisão de literatura. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, Brasília, v. 17, n. 2, p. 163–175, 2008.

RAIVICH, G. et al. Neuroglial activation repertoire in the injured brain: graded response, molecular mechanisms and cues to physiological function. **Brain Research Reviews**, Amsterdam, v. 30, n. 1, p. 77–105, jul. 1999.

REY, L. **Bases da Parasitologia Médica**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011.

SCRIMGEOUR, E. M.; GAJDUSEK, D. C. Involvement of the central nervous system in schistosoma mansoni and s. haematobium infection a review. **Brain**, London, v. 108, n. 4, p. 1023–1038, dez. 1985.

SEDGWICK, J. D. et al. Tumor necrosis factor: A master-regulator of leukocyte movement. **Immunology Today**, Cambridge, v. 21, n. 3, p. 110–113, 2000.

SILVA, A.; SANTANA, L.; JESUS, A. A resposta imune na forma aguda da esquistossomose mansoni. In: CARVALHO, O.; PMZ, C.; LENZI, H. (Eds.). **Schistosoma mansoni e esquistossomose: uma visão multidisciplinar**. Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz, 2008. p. 688–699.

SILVA, L. C. DOS S. et al. Mielorradiculopatia esquistossomótica. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v. 37, n. 3, p. 261–272, jun. 2004.

- SILVA, L. M.; OLIVEIRA, C. N. DE; ANDRADE, Z. A. Experimental Neuroschistosomiasis: Inadequacy of the Murine Model. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 97, n. 4, p. 599–600, jun. 2002.
- SIQUEIRA-BATISTA, R.; RAMOS JÚNIOR, A.; FARIA, E. Esquistossomose mansoni em sua forma crônica. Aspectos clínicos. **Revista Brasileira de Medicina**, São Paulo, v. 54, p. 835–839, 1997.
- SLUKA, K. A.; KALRA, A.; MOORE, S. A. Unilateral intramuscular injections of acidic saline produce a bilateral, long-lasting hyperalgesia. **Muscle & Nerve**, Boston, v. 24, n. 1, p. 37–46, jan. 2001.
- SOFRONIEW, M. V; VINTERS, H. V. Astrocytes: biology and pathology. **Acta neuropathologica**, Berlin, v. 119, n. 1, p. 7–35, jan. 2010.
- STACKHOUSE, S. K.; MURRAY, M.; SHUMSKY, J. S. Effect of cervical dorsolateral funiculotomy on reach-to-grasp function in the rat. **Journal of neurotrauma**, New York, v. 25, n. 8, p. 1039–1047, ago. 2008.
- STEINMANN, P. et al. Schistosomiasis and water resources development: systematic review, meta-analysis, and estimates of people at risk. **Lancet infectious diseases**, New York, v. 6, n. 7, p. 411–425, 2006.
- TANNO, A. P.; BIANCHI, F. J.; MARCONDES, F. K. Influence of estrous cycle on the sensitivity of cronotropic answer to norepinephrine in rats submitted to acute stress. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, São Paulo, v. 38, n. 1, p. 63–70, 2002.
- TURNER, J. D. et al. CD4+CD25+ Regulatory Cells Contribute to the Regulation of Colonic Th2 Granulomatous Pathology Caused by Schistosome Infection. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 5, n. 8, p. e1269, 9 ago. 2011. Disponível em: <<https://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0001269>>. Acesso em: 17 jan. 2015.
- TURNER, J. D. et al. Blood Flukes Exploit Peyer's Patch Lymphoid Tissue to Facilitate Transmission from the Mammalian Host. **PLoS Pathogens**, San Francisco, v. 8, n. 12, p. e1003063, 20 dez. 2012. Disponível em: <<https://journals.plos.org/plospathogens/article?id=10.1371/journal.ppat.1003063>>. Acesso em: 25 fev. 2015.
- UEKI, K.; PARISI, J. E.; ONOFRIO, B. M. Schistosoma mansoni infection involving the spinal cord. Case report. **Journal of neurosurgery**, Baltimore, v. 82, n. 6, p. 1065–1067, 1995.
- VAN ASSCHE, T. et al. Leishmania–macrophage interactions: Insights into the redox biology. **Free Radical Biology and Medicine**, New York, v. 51, n. 2, p. 337–351, 15 jul. 2011.

VAN DER KUIP, M.; HOOGLAND, P. V. J. M.; GROEN, R. J. M. Human radicular veins: Regulation of venous reflux in the absence of valves. **Anatomical Record**, Philadelphia, v. 254, n. 2, p. 173–180, 1 fev. 1999.

VITKOVIC, L.; BOCKAERT, J.; JACQUE, C. “Inflammatory” Cytokines. **Journal of Neurochemistry**, Oxford, v. 74, n. 2, p. 457–471, 25 dez. 2001.

WANG, P. et al. Establishment of a cerebral schistosomiasis experimental model in rabbits. **Neurosci Bulletin**, Beijing, v. 27, n. 2, p. 91–98, 2011.

WANG, W.-Y. et al. Role of pro-inflammatory cytokines released from microglia in Alzheimer’s disease. **Annals of translational medicine**, Hong Kong, v. 3, n. 10, p. 136-151, jun. 2015.

WARREN, K. S. The immunopathogenesis of schistosomiasis: a multidisciplinary approach. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 66, n. 3, p. 417–434, 1972.

WYNN, T. A. et al. Immunopathogenesis of schistosomiasis. **Immunological Reviews**, Copenhagen, v. 201, n. 1, p. 156–167, out. 2004.

YOSHIOKA, L. et al. Schistosoma mansoni: estudo da patogenia da linhagem Santa Rosa (Campinas, SP, Brasil) em camundongos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasilia, v. 35, n. 3, p. 203–207, 2002.

ZHANG, Y. et al. Control of neglected tropical diseases needs a long-term commitment. **BMC Medicine**, London, v. 8, p. 67, jan. 2010.

APÊNDICE A – ARTIGO MODELO DE MRE

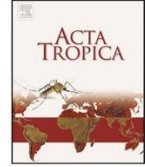
Acta Tropica 167 (2017) 142–147



Contents lists available at ScienceDirect

Acta Tropica

journal homepage: www.elsevier.com/locate/actatropica



Development of an experimental model of schistosomal myeloradiculopathy



Tiago Pinheiro Vaz de Carvalho^{a,*}, Teresa Cristina Abreu Ferrari^b,
Josimari Melo de Santana^c, Victor Antônio Santos Viana^c, José Aislan Correia Santos^c,
Wheverton Correia do Nascimento^a, Kamilla Mayara Lucas da Cruz^c,
Karina Conceição Gomes Machado de Araújo^c

^a Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães – FIOCRUZ, Recife, Pernambuco, Brazil

^b Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

^c Universidade Federal de Sergipe – UFS, São Cristóvão, Sergipe, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 21 April 2016

Received in revised form 21 August 2016

Accepted 23 December 2016

Available online 28 December 2016

Keywords:

Neuroschistosomiasis

Schistosoma mansoni

Animal models

Spinal cord disease

Nociception test

ABSTRACT

Schistosomal myeloradiculopathy (SMR) is a severe form of presentation of schistosomiasis in which *Schistosoma* spp. affect the spinal cord. The aims of the present study were to develop an animal model of SMR caused by *S. mansoni*, to characterize both sensory and motor abnormalities in the infected animals, and to investigate the relationship of the sensory, motor and histological findings with the progression of the infection over time. Mechanical sensitivity and behavioral tests were performed followed by euthanasia in male *Wistar* rats divided into six groups of five animals each, on days 5, 10, 20 and 30 after infection of *S. mansoni* eggs. The controls were subjected to the same procedure but were administered phosphate-buffered saline (PBS). The spinal cord was removed and subjected to histological analysis. *S. mansoni* eggs were found in the spinal cord of 25% of the infected animals, which belonged to the groups that exhibited more significant reduction of the superficial mechanical sensitivity, thermal sensitivity and muscle strength. This model proved to be satisfactory to assess functional changes in *Wistar* rats and might be used in studies investigating the pathogenesis of SMR. To our knowledge, this is the first experimental model of SMR.

© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Schistosomiasis is one of the most prevalent parasitic diseases worldwide (Zhang et al., 2010). Although the gastrointestinal system represents the main target of the trematode, ectopic forms may occur, including the involvement of the central nervous system (CNS). Schistosomal myeloradiculopathy (SMR) is a severe form of presentation of schistosomiasis in which the parasite, especially *Schistosoma mansoni* or *S. haematobium*, affects the CNS (Steinmann

et al., 2006). Although considered rare, SMR is one of the main causes of non-traumatic myelopathy in schistosome endemic areas (Naus et al., 2003; Carod Artal et al., 2004). The pathogenesis of SMR has not been fully elucidated. The most conclusive data indicate that the deposition of parasite eggs in the nervous tissue triggers an inflammatory response that leads to the formation of granulomas, which can group resulting in expansive mass lesions. Furthermore, histological findings suggest that ischemic lesions probably caused by immune complexes-mediated vasculitis also play a role in the pathogenesis of the neurological manifestations (Ferrari, 2010).

There are very few animal models of neuroschistosomiasis and all of them refer to brain involvement. According to the review performed by Fiore and Aloe (2001), rats with neuroschistosomiasis exhibited hyperalgesia due to granuloma formation into the brain (Fiore and Aloe, 2001). The results of another study conducted by the same group suggested that a murine model of infection may be useful for the study of the mechanisms involved in human neuroschistosomiasis (Fiore et al., 1996). More recently, the authors of a study performed in China described an experimental model

Abbreviations: CNS, central nervous system; SMR, schistosomal myeloradiculopathy; CEPa/UFS, Committee of Ethics in Animal Research of Federal University of Sergipe; SBCAL, Brazilian Society of Science in Laboratory Animals; d5, day 5; d10, day 10; d20, day 20; d30, day 30; G5, group 5; G10, group 10; G20, group 10; G30, group 30.

* Corresponding author at: Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Laboratório e serviço de referência em esquistossomose, Av. Moraes Rego s/n cidade universitária, 50670420 Recife, PE, Brazil.

E-mail address: carvalhotpv@gmail.com (T.P.V. de Carvalho).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2016.12.028>

0001-706X/© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

of cerebral schistosomiasis. After inoculating *S. japonicum* eggs into the brain of rabbits, they described the progression of the cerebral lesions and analyzed the relationship between the clinical manifestations and the morphological characteristics of the brain lesions and the pathogenesis of neuroschistosomiasis. Those authors considered their model appropriate to reproduce cerebral schistosomiasis and crucial for the development of new models (Wang et al., 2011).

The main challenge for the development of an animal model of SMR is to design a protocol of infection that represents the pathogenesis of the disease in a reliable manner. Thus, we carried out the present study whose aims were to develop an animal model of SMR by inoculating *S. mansoni* eggs into the subarachnoid space; to investigate changes in the superficial mechanical and thermal sensitivity, and muscle strength in the infected animals; to analyze the relationship of both sensory and motor changes with the progression of the infection over time; and to identify histological abnormalities in the nervous system. To our knowledge, this is the first experimental model of SMR.

2. Material and methods

The present investigation was an experimental, controlled and blinded study. It was approved by the Committee of Ethics in Animal Research of Universidade Federal de Sergipe (UFS), Aracaju, Brazil – CEPA/UFS, protocol no. 11/2013. After the Committee's approval, 50 *Wistar* male rats weighing 300–500 g were selected from the Central Vivarium of UFS. All the study procedures complied with the norms of the Brazilian Society of Science in Laboratory Animals (SBCAL).

Two experimental series were performed. The “infected” and “control” series were divided into six groups corresponding to the days in which the behavioral tests were performed followed by euthanasia; i.e., experimental days 5 (d5), 10 (d10), 20 (d20) and 30 (d30), which corresponded to groups G5, G10, G20 and G30, respectively. The preceding groups comprised five animals each (Fig. 1).

2.1. Procedure for infection with *S. mansoni* eggs

The infected group was anesthetized with thiopental sodium via intraperitoneal injection (50 mg/kg). A total of 20 μ L of a suspension of *S. mansoni* eggs (concentration: 25,000 eggs/mL) was injected into the subarachnoid space of each animal using a 1-mL syringe (Hylden and Wilcox, 1980; Dalton et al., 1997). The control animals were subjected to the same procedure but were injected with sterile phosphate-buffered saline (PBS).

2.2. Behavioral tests

The animals injected with *S. mansoni* eggs and control animals were subjected to mechanical and thermal sensitivity and muscle strength tests on d0, d5, d10, d20 and d30. The investigator who performed the tests was blinded to the animals' experimental series.

Mechanical sensitivity was assessed by means of a digital anesthesiometer (*Insight*[®], Ribeirão Preto, SP, Brazil). A tip coupled to the anesthesiometer was pressed five consecutive times on the plantar surface of the hind paws and removed as soon as the animals withdrew the corresponding paw in response to the stimulus. The arithmetical mean of the results of the five applications was recorded as the secondary mechanical threshold, and the difference among the values obtained at the various time-points was considered in the assessment of the threshold variation (Gopalkrishnan and Sluka, 2000).

The thermal threshold was assessed using a *Hot Plate* (*Insight*[®], Ribeirão Preto, SP, Brazil). The response latency was defined as the time that the animals remained on a heated metal plate (50 ± 0.5 °C) until reacting to the thermal stimulus, which was manifested by withdrawing or licking the paws (Tita et al., 2001). This assessment provided information on latency because the tail withdrawal reflex is characterized by medullary and supramedullary integration (Mitchell and Hellon, 1977).

The possible motor effects of the inoculation of *S. mansoni* eggs were assessed using the *Grip Strength Meter* device (*Insight*[®], São Paulo, SP, Brazil). The grip strength test is a non-invasive and widely used method to assess the paw strength of rats. It is based on the natural tendency of the animals to grasp a bar or grid when hanging by the tail. A force transducer measures the peak force (in grams). The aim of the test is to assess the neuromuscular tonus and/or muscle strength of the fore- and hind limbs simultaneously or separately. Changes in the grip strength are considered to represent an increase or reduction in the muscle strength (Ishiyama et al., 2004; Mahmood et al., 2010). The test was performed with one animal at a time, and three measurements were recorded for each animal at five-minute intervals; the highest value was selected for analysis.

2.3. Histological analysis

Animals from both the infected and control groups were euthanized on d10, d20 or d30 by the administration of 150 mg/kg of thiopental sodium via intraperitoneal injection according to the norms established by CEPA/UFS. The spinal cord with its bone sheath and paravertebral muscles was removed and stored in flasks containing 10% formalin.

Spinal cord segments from T10 to L5 were cut in sections on the sagittal plane at five- μ m intervals using a cryostat; the sections were fixed on glass slides and stained with hematoxylin-eosin. They were assessed regarding the presence of eggs, granulomas and aggregates of inflammatory cells.

2.4. Statistical analysis

The non-parametric Mann-Whitney test was used to compare the results of the neurofunctional tests between the two groups. When the control and infected groups exhibited statistically significant values ($p < 0.05$) in individual analysis, Friedman's analysis of variance (ANOVA) followed by Dunn's test was used to analyze the intragroup differences.

3. Results

Some of the animals in infected groups G10 and G20 exhibited spasmodic activity within the first two hours after intrathecal injection. Infected group G20 exhibited statistically significant differences in all the neurofunctional tests applied compared with the control group. The tactile sensitivity test performed with the digital anesthesiometer demonstrated a reduction in sensitivity evidenced by increases in the sensitivity threshold from 37.2 g to 52.0 g in the right paw and from 37.0 g to 49.1 g in the left paw (Table 1 and Fig. 2A). Thermal hyposensitivity, characterized by latency values varying from 4 to 9.8 s, was observed in infected group G20 (Table 2 and Fig. 2B). The average values exhibited by infected group G20 on the muscle strength test were 2,079.6 g to 1014 g, which means that there was a reduction in muscle strength (Table 3 and Fig. 3).

Fig. 4 depicts a *S. mansoni* egg in the anterior white commissure of the spinal cord at the level of the conus medullaris. Histological analysis of the segments T10 to L5 detected the presence of eggs in 25% of the animals, all of which belonged to the groups that exhibited significant clinical manifestations (G20 and G30). Eggs

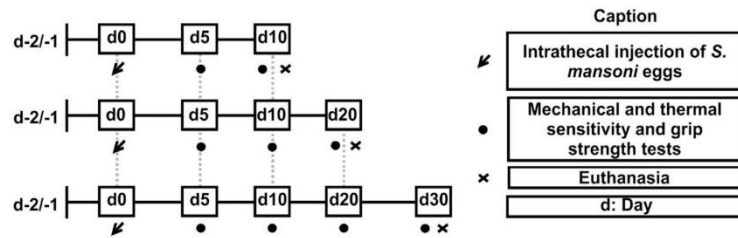


Fig. 1. Timeline of the experimental procedures.

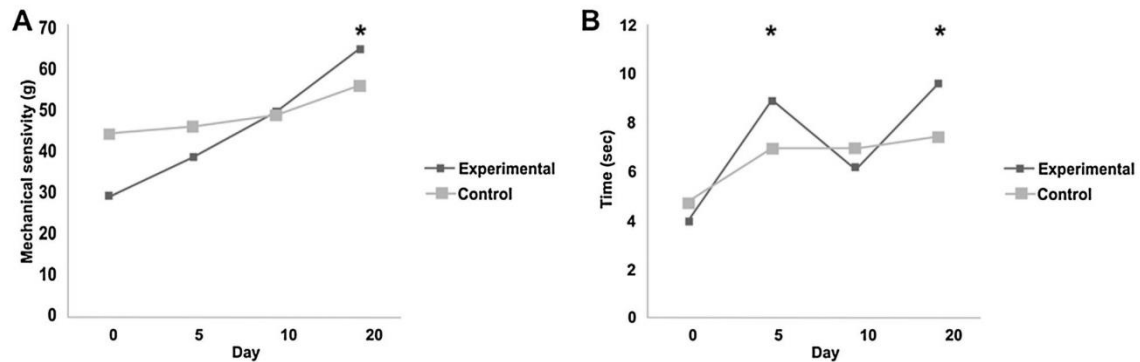


Fig. 2. A: Mechanical sensitivity in the left hind paw in infected and control groups over time until day 20 of the experiment. B: Comparison of the variation in the thermal sensitivity between infected and control groups over time. Data presented as median (*statistically significant result).

Table 1
Variations of the tactile sensitivity in the infected and control groups over time.

Groups	Tactile sensitivity (mean g)		p
	Infected	Control	
G30 right paw	37.2	38.2	0.134
G30 left paw	37.0	39.2	0.066
G20 right paw	52.0	45.8	0.066
G20 left paw	45.2	48.6	0.012*
G10 right paw	47.9	39.5	0.522
G10 left paw	49.1	51.5	0.182

Dunn's test indicated a significant difference in the G20 left paw between d20 and d0 ($p=0.019$).

* Statistically significant result.

Table 2
Variations in thermal sensitivity in the infected and control groups over time.

Groups	Thermal sensitivity (mean s)		p
	Infected	Control	
G30	5.92	6.08	0.038*
G20	7.3	6.6	0.004*
G10	6.4	6.4	0.991

Dunn's test indicated significant differences in the infected group G20 between d5 and d0 ($p=0.029$) and between d20 and d0 ($p=0.042$).

* Statistically significant result.

Table 3
Variations in muscle strength in the infected and control groups over time.

Groups	Muscle strength (mean g)		p
	Infected	Control	
G30	1997.1	1892.4	0.291
G20	1584.4	1373.0	0.023*
G10	1752.4	1879.8	0.954

Dunn's test indicated a significant difference in group G20 between d20 and d10 ($p=0.042$).

* Statistically significant result.

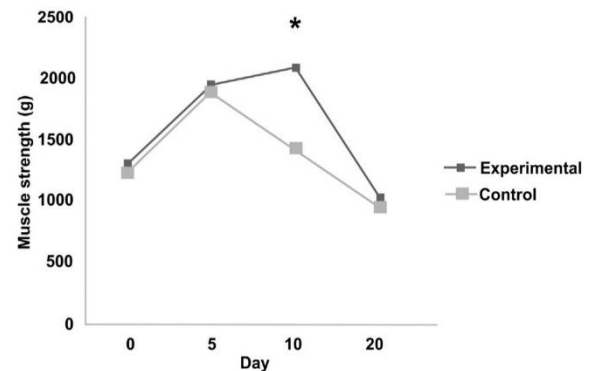


Fig. 3. Comparison of the variation in muscle strength between the infected and control groups over time. Data presented as median (*statistically significant result).

surrounded by inflammatory aggregate were not observed in any group.

4. Discussion

In this study, we developed an animal model of SMR by injecting a suspension of *S. mansoni* eggs into the subarachnoid space. *S. mansoni* eggs were found in the spinal cord of 25% of the animals following the infection and the rats presented a reduction of the superficial mechanical sensitivity, thermal sensitivity and muscle strength. To our knowledge, this is the first experimental model of SMR. Previous investigations are related to brain involvement; therefore, this is the first study that demonstrates spinal cord histological involvement and neurological deficits.

One of the greatest challenges posed by the development of animal models is to simulate all aspects of a given disease within a closed environment and to obtain reproducible results. In a review

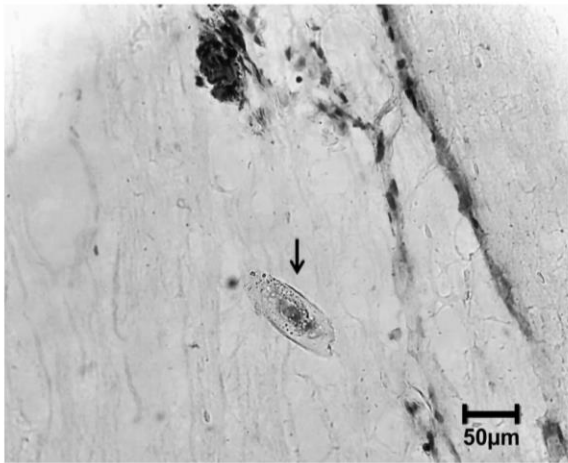


Fig. 4. Sagittal section of the spinal cord from an animal of the infected group G20 showing a *S. mansoni* egg (hematoxylin-eosin, x400).

article, the authors concluded that the application of functional tests in animal models of spinal cord injury is liable to have many flaws and that countless variables might interfere with the final results. Some of such difficulties are the variability in the injury model, the animal species used, and the variability influenced by behavior, spontaneous activity and variation in the duration of the tests (Fouad et al., 2013).

Not surprisingly, the grade of function loss is not always proportional to the severity of the spinal cord injury. Therefore, the relationship between the injury extension and the animals' functional recovery is not linear (Schucht et al., 2002; Hurd et al., 2013). The motor function is not determined by a single pathway but by an adaptive network that includes the reflex, proprioceptive, pattern-generating, myelinated and non-myelinated pathways. All these pathways together allow for a high grade of compensation following CNS injury by means of neural circuits, thus contributing to the non-linearity of recovery (Fouad et al., 2013).

The clinical manifestations exhibited by the animals in the present study were similar to those that occur in humans. Approximately 97.5% of patients with SMR exhibit sensory impairment in the lower limbs, with the additional development of weakness as the disease progresses (Ferrari et al., 2008, 2004; Peregrino et al., 2002). In some SMR cases it is impossible to clinically differentiate between involvement of the spinal cord and nerve roots as occurs in the cone and cauda equine syndrome, a clinical form of human SMR (Ferrari et al., 2008, 2004; Peregrino et al., 2002). Indeed, in most cases, SMR is a meningo myeloradiculopathy characterized by the involvement of the lower spinal cord, surrounding leptomeninge and adjacent nerve roots (Pittella, 1997). Similarly, the clinical manifestations presented by the animals in this study could be due to the spinal cord involvement and/or involvement of nerve roots, which could be caused by arachnoiditis. The lack of granulomatous inflammation around the eggs deposited into the spinal cord, thus causing small lesions, favors the predominance of nerve root involvement in the genesis of the neurologic symptoms. However, it is not possible to completely rule out the possibility of the presence of numerous eggs grouped together in small areas of the spinal cord (not included among the segments sampled for histological examination) causing more extensive damage (and symptoms) in some animals even without granulomas surrounding them. Cerebrospinal fluid analysis and imaging methods, especially magnetic resonance imaging (MRI) of the spinal cord, could help in characterizing the extent of involvement of the different structures.

Comparison of the results of the sensitivity and muscle strength tests on d0 between the infected and control animal groups did not detect any statistically significant differences, which confirmed the homogeneity of the sample.

A significant reduction in thermal sensitivity was detected in the left hind paws of the animals in infected group G20 compared with the controls. As Fig. 2A shows, the sensitivity threshold exhibited a progressive increase, which suggests that the tactile sensitivity decreased in parallel with the progression of disease. Asymmetric distribution of sensory and motor disorders is a common finding in human cases of SMR and is attributed mostly to root involvement (Ferrari, 1999). Fig. 2B shows that the latency of the response to heat increased from d0 to d5 and then decreased until d10, when it increased again until reaching its maximum peak 20 days after infection. These findings point to a reduction in the animals' thermal perception. This reduction, combined with the decrease in tactile sensitivity, corresponds to the sensory loss commonly associated with SMR. The infected group G20 also exhibited a significant reduction in muscle strength.

Fig. 3 shows that the grip strength increased on d0, d5 and d10. This increase is not explained by an increase in the muscle force but rather by acute inflammation, which elevates the animals' levels of stress and consequently the grip strength response. With the progression of the disease, however, the muscle strength decreased, which was noted from d10 to d20, and this period corresponds to the subacute and chronic stages in *Wistar* rats. These findings agree with other published reports in humans (Ferrari et al., 2008; Pittella, 2003, 1997).

The *Grip Strength Meter* device provides a measurement of muscle strength (Sala-Roca et al., 2002). The changes found in the tests are indicative of a reduction in the muscles' contractile component and proprioceptive signals, which interferes with the animals' strength and skills. The *Hot Plate*, in turn, is used to assess the central antinociceptive activity (Arslan et al., 2010), while the digital analgesimeter detects local and systemic nociceptive effects (Cunha et al., 2004). Such reductions in the ability to perceive painful stimuli interfere with the protective system, which is a significant component of the body's defense mechanism (Cailliet, 1999). The injury induced by *S. mansoni* eggs interfered with the animals' sensory and motor responses, thus impairing proprioception and the performance of motor activities. In human beings, such deficits affect walking, static and dynamic balance in addition to functional activities, thus reducing the quality of life of the patients, with consequences not only for them but also for their relatives (van Tuijl et al., 2002; Wessels et al., 2010).

Generally, the neurologic manifestations of SMR appear in humans in the early stages of the infection, and the signs and symptoms worsen in a progressive and cumulative manner until the establishment of the full neurological clinical picture in approximately 15 days. Occasionally, the progression of the disease can be slow and may evolve over months or years (Ferrari et al., 2004; Haribhai et al., 1991; Joubert et al., 1990). While the pathogenesis of SMR is still largely unknown, evidence suggests that the inflammatory response is triggered mostly by the deposition of eggs into the nervous tissue (Pittella, 1997). Most of the clinical manifestations are caused by the presence of expansive mass lesions or granulomas; however, some known cases lack clinical expression (Luyendijk and Lindeman, 1975; Polam et al., 1999).

Histological analysis demonstrated the presence of eggs in 25% of the animals, all of which belonged to the groups that exhibited significant clinical manifestations (G20 and G30). However, asymptomatic egg deposition in the spinal cord can not be ruled out. According to some authors, the asymptomatic deposition of *S. mansoni* eggs in the brain is more common than in the spinal cord (Ferrari and Moreira, 2011; Lambertucci and Cristina, 2007; Pittella, 1997; Scrimgeour and Gajdusek, 1985). The early phase of

the schistosomal infection is characterized by coagulative necrosis around the eggs associated with aggregates of macrophages, epithelioid and giant cells as well as inflammatory infiltrate rich in eosinophils and lymphocytes. In the chronic phase, there is infiltration by fibroblasts, and the eggs become encapsulated by fibrosis. Although, in a post mortem study, eggs were found in the spinal cord without any associated inflammatory reaction (Budzilovich et al., 1964) as observed in our study, we had expected to find granulomas around the eggs deposited in the spinal cord.

Only segments T10 to L5 were analyzed because the lower spinal cord levels are the preferential site for egg deposition in human disease (Araújo et al., 2010; Braga et al., 2003; Silva et al., 2002). However, the eventual presence of eggs at higher levels, in the spinal nerve roots or in the meninges – which were not subjected to histological analysis in the present study – can not be ruled out (Galvão, 1994). This possibility is reinforced by the fact that we inoculated the eggs into the subarachnoid space. In contrast, in SMR naturally occurring in humans, evidence suggests that the eggs reach the CNS mostly through retrograde blood flow into the vertebral venous Batson's plexus, which is located in the epidural space and connects abdominal and pelvic veins with intra-medullary and intra-cerebral veins. The preferred location of the eggs in the lower spinal segments has been ascribed especially to the large size of the eggs and presence of a spike in their shell preventing their progression along the Batson's plexus to higher spinal cord levels (Ferrari, 1999; Ferrari and Moreira, 2011; Pittella, 1997).

The clinical signs became evident starting on d10, and most of the signs and symptoms appeared between d20 and d30. Had the timeline been longer and reinfection occurred, perhaps the clinical signs would have been more severe. Additional studies are needed to improve the animal model as by using a larger number of instruments of assessment and standardized spinal cord injury scales; examining the cerebrospinal fluid; performing imaging methods especially MRI of the spinal cord; inducing reinfection; and analyzing the levels of cytokines and other immune markers.

The developed model was satisfactory for the assessment of functional disorders in *Wistar* rats following injection of *S. mansoni* eggs into the subarachnoid space. Histological examination demonstrated eggs in the nervous tissue. Alterations in the superficial mechanical sensitivity, thermal sensitivity and muscle strength caused by SMR could be detected.

Conflict of interest

The authors declare that there are no conflicts of interest.

Acknowledgments

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-CAPES for its financial support via the institutional master scholarship program; Programa de Estímulo ao Aumento da Efetividade dos Programas de Pós-Graduação em Sergipe – PROEF; Programa de Estímulo à Mobilidade e ao Aumento da Cooperação Acadêmica da Pós-Graduação em Sergipe/Fundação de Apoio à Pesquisa e a Inovação Tecnológica do Estado de Sergipe/CAPES – PROMOB/FAPITEC/CAPES for their financial support; and to Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ for its technical and scientific support.

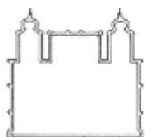
References

- Araújo, K.C.G.M., Silva, C.R., Santos, A.G.A., Barbosa, C.S., Ferrari, T.C.A., 2010. Clinical-epidemiologic profile of the schistosomal myeloradiculopathy in Pernambuco, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 105, 454–459. <http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762010000400017>.

- Arslan, R., Bektas, N., Ozturk, Y., 2010. Antinociceptive activity of methanol extract of fruits of *Capparis ovata* in mice. *J. Ethnopharmacol.* 131, 28–32. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2010.05.060>.
- Braga, B., Junior, L.C., Lambertucci, J., 2003. Magnetic resonance imaging of cerebellar schistosomiasis *mansoni*. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*
- Budzilovich, G.N., Most, H., Feigin, I., 1964. Pathogenesis and latency of spinal cord schistosomiasis. *Arch. Pathol.* 77, 383–388.
- Cailliet, R., 1999. *Dor: Mecanismos e Tratamentos*, 1st ed. Artmed, Porto Alegre.
- Carod Artal, F.J., Vargas, A.P., Horan, T.A., Marinho, P.B., Coelho Costa, P.H., 2004. *Schistosoma mansoni* myelopathy: clinical and pathologic findings. *Neurology* 63, 388–391. <http://dx.doi.org/10.1212/01.WNL.0000130190.67613.BE>.
- Cunha, T.M., Verri Jr., W.A., Vivancos, G.G., Moreira, I.F., Reis, S., Parada, C.A., Cunha, F.Q., Ferreira, S.H., 2004. An electronic pressure-meter nociception paw test for mice. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 37, 401–407. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-879x2004000300018>.
- Dalton, J.P., Day, S.R., Drew, A.C., Brindley, P.J., 1997. A method for the isolation of schistosome eggs and miracidia free of contaminating host tissues. *Parasitology* 115 (Pt 1), 29–32.
- Ferrari, T.C.A., Moreira, P.R.R., 2011. Neuroschistosomiasis: clinical symptoms and pathogenesis. *Lancet Neurol.* 10, 853–864. [http://dx.doi.org/10.1016/S1474-4422\(11\)70170-3](http://dx.doi.org/10.1016/S1474-4422(11)70170-3).
- Ferrari, T.C.A., Moreira, P.R.R., Cunha, A.S., 2004. Spinal cord schistosomiasis: a prospective study of 63 cases emphasizing clinical and therapeutic aspects. *J. Clin. Neurosci.* 11, 246–253. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jocn.2003.05.006>.
- Ferrari, T.C.A., Moreira, P.R.R., Cunha, A.S., 2008. Clinical characterization of neuroschistosomiasis due to *Schistosoma mansoni* and its treatment. *Acta Trop.* 108, 89–97. <http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2008.04.007>.
- Ferrari, T., 1999. Spinal cord schistosomiasis: a report of 2 cases and review emphasizing clinical aspects. *Medicine (Baltimore)*.
- Ferrari, T.C.A., 2010. A laboratory test for the diagnosis of neuroschistosomiasis. *Neurol. Res.* 32, 252–262. <http://dx.doi.org/10.1179/016164110x12644252260718>.
- Fiore, M., Aloe, L., 2001. Neuroinflammatory implication of *Schistosoma mansoni* infection in the mouse. *Arch. Physiol. Biochem.* 109, 361–364. <http://dx.doi.org/10.1076/apab.109.4.361.4247>.
- Fiore, M., Moroni, R., Alleve, E., Aloe, L., 1996. *Schistosoma mansoni*: influence of infection on mouse behavior. *Exp. Parasitol.* 83, 46–54. <http://dx.doi.org/10.1006/expr.1996.0047>.
- Fouad, K., Hurd, C., Magnuson, D.S.K., 2013. Functional testing in animal models of spinal cord injury: not as straight forward as one would think. *Front. Integr. Neurosci.* 7, 85. <http://dx.doi.org/10.3389/fnint.2013.00085>.
- Galvão, A.C.R., 1994. Como eu trato Neuroesquistossomose. In: Machado, L.R., Nobrega, J.P.S., Livramento, J.A., Spina-França, A. (Eds.), *Neuroinfecção. Clínica Neurológica HC/FMUSP, São Paulo*, pp. 205–208.
- Gopalkrishnan, P., Sluka, K.A., 2000. Effect of varying frequency, intensity, and pulse duration of transcutaneous electrical nerve stimulation on primary hyperalgesia in inflamed rats. *Arch. Phys. Med. Rehabil.* 81, 984–990. <http://dx.doi.org/10.1053/apmr.2000.5576>.
- Haribhai, H.C., Bhigjee, A.I., Bill, P.L., Pammenter, M.D., Modi, G., Hoffmann, M., Kelbe, C., Becker, P., 1991. Spinal cord schistosomiasis. A clinical, laboratory and radiological study: with a note on therapeutic aspects. *Brain* 114 (Pt 2), 709–726.
- Hurd, C., Weishaupt, N., Fouad, K., 2013. Anatomical correlates of recovery in single pellet reaching in spinal cord injured rats. *Exp. Neurol.* 247, 605–614. <http://dx.doi.org/10.1016/j.expneurol.2013.02.013>.
- Hylden, J.L.K., Wilcox, G.L., 1980. Intrathecal morphine in mice: a new technique. *Eur. J. Pharmacol.* 67, 313–316. [http://dx.doi.org/10.1016/0014-2999\(80\)90515-4](http://dx.doi.org/10.1016/0014-2999(80)90515-4).
- Ishiyama, T., Okada, R., Nishibe, H., Mitsumoto, H., Nakayama, C., 2004. Riluzole slows the progression of neuromuscular dysfunction in the wobbler mouse motor neuron disease. *Brain Res.* 1019, 226–236. <http://dx.doi.org/10.1016/j.brainres.2004.06.002>.
- Joubert, J., Fripp, P.J., Hay, I.T., Davel, G.H., van Graan, E.S., 1990. Schistosomiasis of the spinal cord – underdiagnosed in South Africa? *S. Afr. Med. J.* 77, 297–299.
- Lambertucci, J.R., Cristina, L., 2007. Guidelines for the diagnosis and treatment of schistosomal myeloradiculopathy Orientações sobre o diagnóstico e tratamento da mieloradiculopatia associada à esquistossomose. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 40, 574–581. <http://dx.doi.org/10.1590/S0037-86822007000500016>.
- Luyendijk, W., Lindeman, J., 1975. Schistosomiasis (bilharziasis) *mansoni* of the spinal cord stimulating an intramedullary tumor. *Surg. Neurol.* 4, 457–460.
- Mahmood, D., Akhtar, M., Vohora, D., Khanam, R., 2010. Comparison of antinociceptive and antidiabetic effects of sertraline and amitriptyline on streptozotocin-induced diabetic rats. *Hum. Exp. Toxicol.* 29, 881–886. <http://dx.doi.org/10.1177/0960327110364152>.
- Mitchell, D., Hellon, R.F., 1977. Neuronal and behavioural responses in rats during noxious stimulation of the tail. *Proc. R. Soc. Lond. Ser. B Biol. Sci.* 197, 169–194.
- Naus, C.W.A., Chipwete, J., Visser, L.G., Zijlstra, E.E., van Lieshout, L., 2003. The contribution made by *Schistosoma* infection to non-traumatic disorders of the spinal cord in Malawi. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 97, 711–721. <http://dx.doi.org/10.1179/000349803225002363>.
- Peregrino, A.J.P., Puglia, P.M.K., Nóbrega, J.P.S., Livramento, J.A., Marques-Dias, M.J., Scaff, M., 2002. Esquistossomose medular: análise de 80 casos. *Arq. Neuropsiquiatr.* 60, 603–608. <http://dx.doi.org/10.1590/S0004-282x2002000400016>.

- Pittella, J.E.H., 1997. Neuroschistosomiasis. *Brain Pathol.* 7, 649–662, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1750-3639.1997.tb01080.x>.
- Pittella, J.E., 2003. Neuroschistosomiasis. In: Misra, U.K., Kalita, J., Shakir, R.A. (Eds.), *Tropical Neurology*. Landes Biocience, Texas, U.S.A, pp. 300–324.
- Polam, S., Di John, D., De Carlo, R., Strauss, R., Vadde, N., 1999. A snail tale. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 18, 173–174.
- Sala-Roca, J., Martí-Carbonell, M.A., Garau, A., Darbra, S., Balada, F., 2002. Effects of chronic dysthyroidism on activity and exploration. *Physiol. Behav.* 77, 125–133, [http://dx.doi.org/10.1016/S0031-9384\(02\)00815-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0031-9384(02)00815-6).
- Schucht, P., Raineteau, O., Schwab, M.E., Fouad, K., 2002. Anatomical correlates of locomotor recovery following dorsal and ventral lesions of the rat spinal cord. *Exp. Neurol.* 176, 143–153, <http://dx.doi.org/10.1006/exnr.2002.7909>.
- Scrimgeour, E.M., Gajdusek, D.C., 1985. Involvement of the central nervous system in *Schistosoma mansoni* and *S. haematobium* infection. A review. *Brain* 108 (Pt 4), 1023–1038.
- Silva, L.C.S., Kill, C.M., Lambertucci, J.R., 2002. Cervical spinal cord schistosomiasis. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 35, 543–544, <http://dx.doi.org/10.1590/S0037-86822002000500023>.
- Steinmann, P., Keiser, J., Bos, R., Tanner, M., Utzinger, J., 2006. Schistosomiasis and water resources development: systematic review, meta-analysis, and estimates of people at risk. *Lancet Infect. Dis.* 6, 411–425, [http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(06\)70521-7](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(06)70521-7).
- Tita, B., Abdel-Haq, H., Vitalone, A., Mazzanti, G., Saso, L., 2001. Analgesic properties of *Epilobium angustifolium*, evaluated by the hot plate test and the writhing test. *Farmacol.* 56, 341–343.
- Wang, P., Wang, D., Chen, S.J., Wu, M.C., Cheng, X.L., Li, J.C., Chen, T.X., Zhu, Z.S., 2011. Establishment of a cerebral schistosomiasis experimental model in rabbits. *Neurosci. Bull.* 27, 91–98, <http://dx.doi.org/10.1007/s12264-011-1127-0>.
- Wessels, M., Lucas, C., Eriks, I., de Groot, S., 2010. Body weight-supported gait training for restoration of walking in people with an incomplete spinal cord injury: a systematic review. *J. Rehabil. Med.* 42, 513–519, <http://dx.doi.org/10.2340/16501977-0525>.
- Zhang, Y., MacArthur, C., Mubila, L., Baker, S., 2010. Control of neglected tropical diseases needs a long-term commitment. *BMC Med.* 8, 67, <http://dx.doi.org/10.1186/1741-7015-8-67>.
- van Tuijl, J.H., Janssen-Potten, Y.J.M., Seelen, H.A.M., 2002. Evaluation of upper extremity motor function tests in tetraplegics. *Spinal Cord* 40, 51–64.

APÊNDICE B – POP APARATO DE ISOMETRIA



Ministério da Saúde
 Fundação Oswaldo Cruz
 Instituto Aggeu Magalhães
 Rua Moraes Rego, s/n, Campus da UFPE / Cidade Universitária
 50670-420 – Recife – PE - BRASIL
 Tel.: (81) 21012500

TÍTULO	CÓDIGO
APARATO DE ISOMETRIA	EQP-ESQ-006-00

PALAVRA-CHAVE	REVISÃO
Aparato de Isometria	00

Sumário

1. OBJETIVO	1
2. EQUIPAMENTO	1
2.1 Descrição	1
2.2 Funcionamento.....	2
2.5 Manutenção Preventiva.....	3
3. CARACTERÍSTICAS TÉCNICAS	3
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	3
5. SUMÁRIO DAS REVISÕES	3

1. OBJETIVO

É objetivo deste procedimento é estabelecer critérios seguros de utilização do Aparato de Isometria

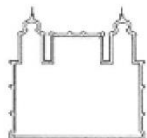
CAMPO DE APLICAÇÃO: Este POP aplica-se a todos os estudos realizados segundo as Boas Práticas de Laboratório (BPL) no Laboratório e Serviço de Referência de Esquistossomose do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães.

2. EQUIPAMENTO

2.1 Descrição

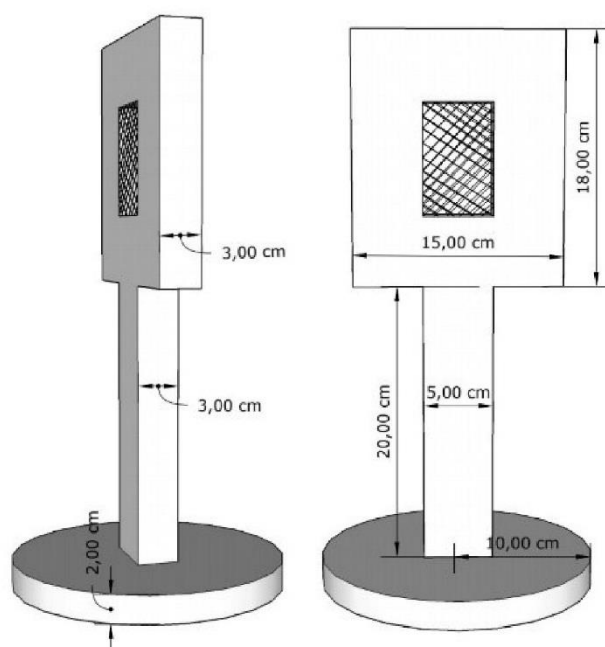


ELABORADO	VERIFICADO	APROVADO	DATA 06/10/17	PÁGINAS 1/3
-----------	------------	----------	------------------	----------------



Ministério da Saúde
 Fundação Oswaldo Cruz
 Instituto Aggeu Magalhães
 Rua Moraes Rego, s/n, Campus da UFPE / Cidade Universitária
 50670-420 – Recife – PE - BRASIL
 Tel.: (81) 2101-2500

TÍTULO:	APARATO DE ISOMETRIA	CÓDIGO EQP-ESQ-006-00
----------------	-----------------------------	---------------------------------



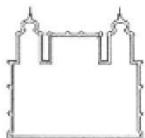
2.2 Funcionamento

Trata-se de uma estrutura retangular de madeira com fórmica e duas grades em ambos os lados de 8x5 cm. Com o instrumento na posição vertical, o animal será colocado na grade com as patas dianteiras e traseiras. Este modelo de isometria simula o comportamento natural do animal em escalar e agarrar-se, possui baixo nível de estresse quando comparado aos testes de força usuais e o pesquisador possui maior controle das variáveis a serem analisadas.

Devem ser realizadas três séries de três minutos com intervalo de um minuto entre cada, na frequência de três vezes semanais.

REVISÃO
00

PÁGINA
2 / 3



Ministério da Saúde
 Fundação Oswaldo Cruz
 Instituto Aggeu Magalhães
 Rua Moraes Rego, s/n, Campus da UFPE / Cidade Universitária
 50670-420 – Recife – PE - BRASIL
 Tel.: (81) 2101-2500

TÍTULO:	APARATO DE ISOMETRIA
	CÓDIGO EQP-ESQ-006-00

2.5 Manutenção Preventiva

Colocar o equipamento sob uma base firme e estável.

Recomenda-se forrar a base circular do equipamento com papel toalha para evitar o acúmulo de fezes e urina.

Utilizar álcool a 30% para realizar a higienização durante o experimento e álcool a 70% após o término dos testes.

3. CARACTERÍSTICAS TÉCNICAS

Equipamento de baixo custo e fácil manutenção.

Dimensões: 400 x 200 x 30mm

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

KRUGER, K. et al. Functional and muscular adaptations in an experimental model for isometric strength training in mice. **PLoS One**, v. 8, n. 11, p. e79069, 2013.

5. SUMÁRIO DAS REVISÕES

Sumário das Revisões		
Revisão	Data	Descrição ou itens revisados
00	06/10/17	1ª versão do documento

REVISÃO 00	PÁGINA 3 / 3
---------------	-----------------

APÊNDICE C – ARTIGO DO OBJETIVO A

doi: 10.5216/rpt.v47i3.55269

ORIGINAL ARTICLE

MESENTERIC ISCHEMIA AS A CAUSE OF EARLY DEATH AMONG MICE INFECTED BY *Schistosoma mansoni*

Tiago Pinheiro Vaz de Carvalho¹, Rodrigo Moraes Loyo Arcoverde¹, Wheverton Correia do Nascimento¹, Igor Henrique Rodrigues de Paiva¹, Francisco Carlos Amanajás de Aguiar Júnior², Elaine Christine de Souza Gomes¹ and Constança Clara Gayoso Simões Barbosa¹

ABSTRACT

Laboratory maintenance of the *Schistosoma mansoni* cycle is necessary for developing studies regarding the diagnosis, treatment and control of schistosomiasis. Within this perspective, it is paramount that mice infected by the parasite should present a minimum survival of six months. However, between October 2016 and May 2017, early deaths were observed among infected animals kept in the vivarium of the Schistosomiasis Reference Service of IAM-FIOCRUZ. Therefore, the purpose of the present study was to present the results obtained after investigating the main cause of death among these animals. To achieve this, animals that died or that needed to be euthanized due to clinical distress caused by parasite infection were necropsied to investigate the cause of death and clinical condition. Fragments from the intestines, mesenteric vessels and livers were removed and were subjected to histopathological studies. In addition, mouse feces were collected and analyzed using the hydrogen peroxide reaction to detect occult blood. Over an eight-month period, 70 deaths were noted. Forty two animals presented mesenteric ischemia, a vascular insufficiency syndrome that causes a reduction in the nutrient supply to the intestinal viscera. There is, therefore, a need to reduce the infective parasite load in mice to increase their survival, reduce distress caused by the infection and ensure maintenance of the *S. mansoni* cycle, thus enabling continuity of scientific studies on this parasitosis.

KEY WORDS: Mesenteric vascular occlusion; ischemia; *Schistosoma mansoni*; mice.

1. Departamento de Parasitologia, Instituto Aggeu Magalhães (IAM), Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Pernambuco, Brazil.
2. Laboratório de Biotecnologia e Fármacos, Universidade Federal de Pernambuco, Pernambuco, Brazil.

Corresponding author: Tiago Pinheiro Vaz de Carvalho. Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Aggeu Magalhães, Laboratório e serviço de referência em esquistossomose. Av. Moraes Rego s/n Cidade Universitária 50670-420 Recife, PE, Brazil. E-mail: carvalhotpv@gmail.com

Received for publication: 13/3/2018. Reviewed: 10/7/2018. Accepted: 24/9/2018.

INTRODUCTION

Schistosomiasis is a parasitic disease in which the parasite, *S. mansoni*, initially inhabits the hepatic portal system, where it develops until the adult stage. It then mates and migrates to mesenteric vessels and venules that irrigate intestinal walls. This is where females deposit their eggs, which block and disarrange the local blood flow, along with the extrusion of eggs into the surrounding tissue (Rey, 2011). The physiopathology of this disease is associated with tissue lesions caused by penetration of eggs into tissues, which especially affects the intestine, liver and spleen. This causes congestion of veins in the intrahepatic portal system that can be worsened by the presence of adult worms in the vessels (Knobel, 1994).

In human infections, this vein congestion causes a clinical manifestation that is common in chronic forms of the disease: portal hypertension. However, a severe occlusion characteristic of mesenteric ischemia is rare. This form of ischemia is a syndrome caused by vascular insufficiency of the celiac trunk and/or superior and inferior mesenteric artery that obstructs blood flow and causes reductions in the nutrient supply to the corresponding organs. However, when mesenteric ischemic syndromes occur, these can be either occlusive or non-occlusive and may present both acute and chronic forms, of either arterial or venous vascular origin (Pinotti, 1994).

The low occurrence rate of mesenteric ischemia can be explained by the intense network of anastomoses of the intestinal circulatory system, which ends up irrigating and fulfilling tissue needs. One clear example of this is the low number of cases of gastrointestinal occlusive processes observed in individuals in England, which are approximately 50 times less frequent than cases of acute myocardial infarction (Hohenwarter, 2009; Ward et al., 1995). However, when this clinical condition occurs, it is characterized by abdominal pain, distension of bowel loops and wall thickening, generalized peritonitis, leukocytosis and melena, which can evolve into intestinal necrosis, reaching mortality rates higher than 80% (Chiu et al., 1970).

Although obstructive processes of mesenteric veins may occur in cases of schistosomiasis, considering that this vascular network is the habitat of the parasite, these processes seem not to have an impact on the pathogenesis of the disease. However, this may not occur in the animal model of the disease, in which mice are used as definitive parasite hosts in laboratory infections.

This suspicion arose owing to the death, due to mesenteric ischemia, of a mouse infected by *S. mansoni* in the vivarium of the Aggeu Magalhães Institute (IAM-FIOCRUZ). In addition to this, records of high mortality rates among the infected animals triggered the need to investigate and identify what the main cause of death among these animals was.

MATERIAL AND METHODS

The present study was approved by the Animal Ethics Committee of the Aggeu Magalhães Institute (CEUA/IAM), under approval certificate no. 48/2013. To maintain the biological cycle of *S. mansoni*, the Schistosomiasis Laboratory and Reference Service (RSS) of IAM-FIOCRUZ percutaneously infects male and female outbred Swiss Webster mice every month, with 120 cercariae of the BH and LE lineages in the proportions of 20 animals per strain. These animals are used for the obtention of miracidia from their faeces to infect *Biomphalaria glabrata* snails and obtain more cercariae to infect other animals and maintain the parasite cycle. In addition, adult worms are obtained to extract DNA to develop a positive control molecular diagnoses by conducting polymerase chain reaction (PCR) analysis. Finally, soluble egg antigen (SEA) and soluble adult worm antigen preparation (SWAP) are produced.

A total of 220 infected animals were studied between October 2016 and May 2017 (110 BH lineage cercariae and 110 LE lineage cercariae). According to the rules established in the standard operational procedure (SOP), of the RSS, six months after the animals are infected or if, at any time during this period, they present any indication of distress as a result of the infection, they should be euthanized. Every animal that died or required euthanasia was necropsied; in addition, adult worms were collected and counted. The necropsy procedure consisted of making a sagittal incision in the animals' abdomen to expose abdominal viscera.

Fragments from their intestines, mesenteric vessels and livers were removed immediately after death and were subjected to histopathological and morphometric analyses. Three fragments of liver tissue in transverse sections were collected from each animal. Horizontal histological sections (5 μm) were cut using a microtome *Leica RM2235* and the slides were stained with hematoxylin-eosin and Masson trichrome for morphometric study. The study was performed using ImageJ Software (National Institutes of Health, USA) for measuring the average diameter (micrometer - μm) of granulomas, with subsequent calculation of the area (μm^2) and intensity of the blue stain (specific for collagen) in histograms. The number of inflammatory cells in the granulomas was analyzed using a Nikon Eclipse E200 microscope which was used at 10x and 40x magnifications on images randomly obtained in 10 fields/animal. The samples were evaluated according to the degree of the lesions in the mucous tunic, in accordance with the modified classification proposed by Chiu et al. (1970); Longo et al. (1992).

Samples were also analyzed according to the acute intestinal ischemia scale, which is characterized by three stages. Stage I is pathologically characterized by necrosis, erosion, ulcerations, edema and hemorrhage located in the mucosa; this stage is still reversible. Stage II comprises necrosis that extends to layers of the submucosa and muscularis propria. Finally, Stage III presents high mortality rates and affects all three layers (Jatobá et al., 2008).

Table. Classification of intestinal morphology of mesenteric ischemia.

Classification modified from Chiu et al., 1970	
Grade 0	Mucosa without alteration.
Grade 1	Well-constituted villi without cell lysis or inflammatory process, but with formation of Gruenhagen subepithelial space.
Grade 2	Presence of cell lysis, formation of Gruenhagen subepithelial space and thickening between villi.
Grade 3	Destruction of free portion of villi and presence of dilated capillaries and inflammatory cells.
Grade 4	Structural destruction of villi, with the presence of only the framework of some of them, formed by inflammatory cells and necrotic material, with hemorrhage and basal glandular ulceration.
Grade 5	Destruction of the entire mucous tunic, where glandular structures are no longer observed and only amorphous material is deposited over the submucosal screen.

Deaths were divided into two classes: due to mesenteric ischemia, when macroscopic signs of necrosis in parts of the intestine were identified; and due to unknown cause, when no clinical and/or macroscopic signs of the cause of death were present or when the state of the tissues did not allow identification of the cause of death. Feces were collected and analyzed by reaction to hydrogen peroxide, based on the protocol used by Jatobá et al. (2008) in order to investigate occult blood in fecal matter (Lins et al., 2008).

The date of death and infection, *S. mansoni* strain lineage, and cause of death were recorded for all animals that died. The Kaplan-Meier estimator was used to analyze the deaths in the present study and to compare them to the deaths of inbred BALB/c mice with high parasitic loads (80 cercariae) and low parasitic loads (30 cercariae). *Microsoft Excel* 2013 software was used for data tabulation and *GraphPad Prism* V6 (San Diego, CA, USA) for subsequent analyses.

RESULTS

Over an eight-month period, 70 deaths were recorded and the recovery of worms revealed that the average number of adult couples was 36.6, the highest number was 47 couples and the lowest was 25 couples. There was no statistically significant difference between the various types of death. Three animals presenting altered clinical conditions, were euthanized and the tissues were removed immediately. The remaining 67 animals were found dead. Out of the total number of deaths, 42 animals presented mesenteric ischemia with anatomopathological alterations similar to those shown in Figure 1: macroscopic signs of necrosis in parts of the intestine and feces with positive reaction to hydrogen peroxide.

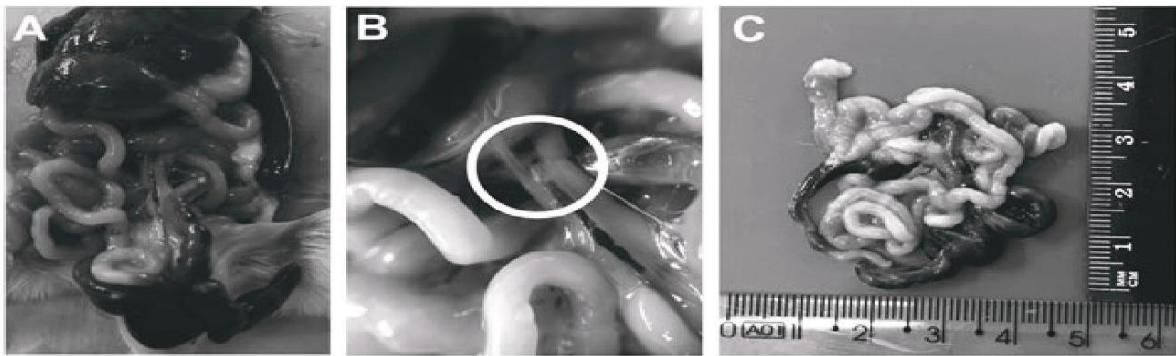


Figure 1. A. Obstructed mesenteric vessel with intestinal ischemic area. B. View of worms obstructing a mesenteric vessel. C. Intestine with irrigated and ischemic area.

A Kaplan-Meier estimate is illustrated in Figure 2. The present data regarding animal survival analysis indicated that the percentage of deaths due to mesenteric ischemia was 35.9%. Compared with the percentage of deaths from unknown causes in Figure 2A, an increase of approximately 10% was noted for mesenteric ischemia. Deaths began to occur between 31 and 60 days after infection and most of the episodes occurred from 91 to 120 days after infection for mesenteric ischemia, and from 121 to 150 days after infection for unknown causes. Figure 2B shows that the death of animals with a high parasite load begins at about 55 days after infection, an early date when compared to the deaths in animals with low parasite loads which started after 230 days.

The difference between the livers of infected and uninfected animals was easily noted. Figures 3A, C and E show liver tissue integrity and the presence of only a few inflammatory cells. Figures 3B, D and F show the liver damage caused by *S. mansoni* eggs, with a large lesion in hepatocytes. An egg is located at the center of the granuloma, and lymphocytes, macrophages and polymorphonuclear cells (neutrophils and eosinophils) have accumulated around it. It is an exudative-productive granuloma characterized by a rich structure of collagen fibers and inflammatory cells concentrated in the margins, thus showing a more organized and circumferential appearance (as described by Wiesner et al., 2001).

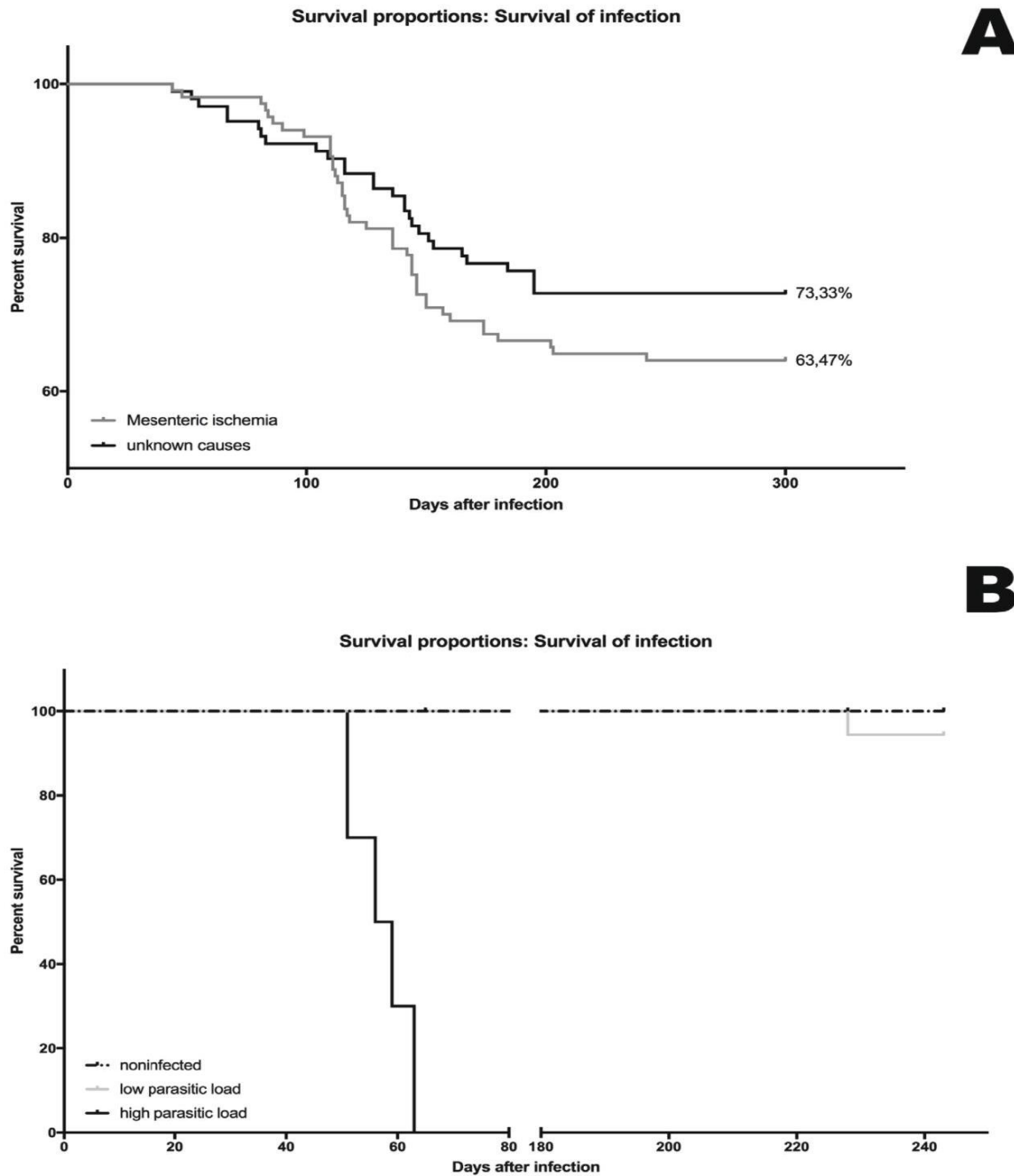


Figure 2. Survival curve of *S. mansoni* infection. A: Comparison of deaths due to mesenteric ischemia and unknown causes (120 cercariae) of outbred *Swiss Webster* mice. B: Comparison of deaths with high parasitic load (80 cercariae) and low parasitic load (30 cercariae) of inbred BALB/c.

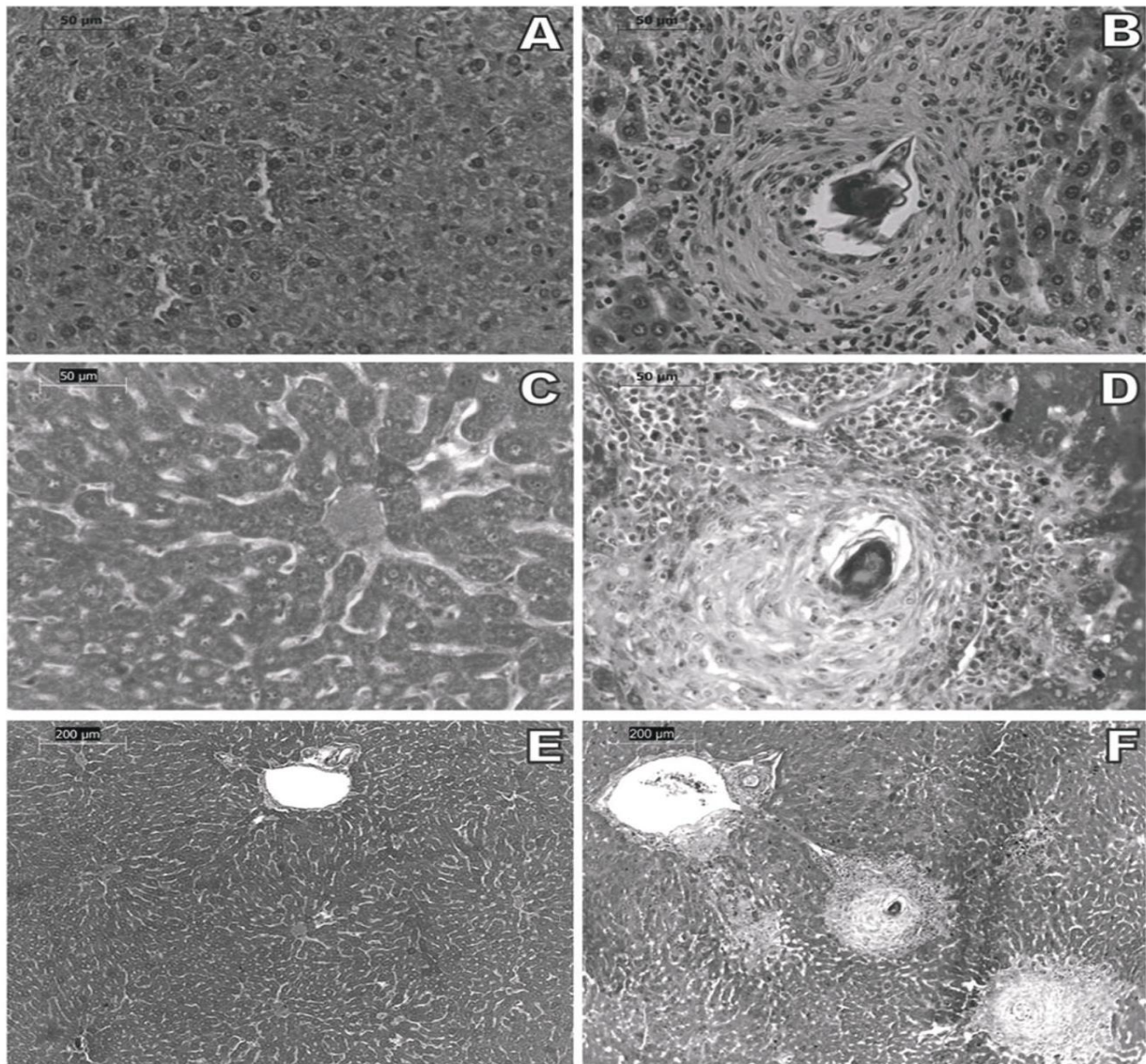


Figure 3. Photomicrographs of mouse livers. A, C and E: Liver of an uninfected animal (A: hematoxylin and eosin, scale bar = 50 μm / C: Masson trichrome Scale bar = 50 μm / E: Masson trichrome Scale bar = 200 μm). B, D and F: Liver granuloma presenting a thick band of fibrosis between an egg and the liver tissue of an infected animal that died due to mesenteric ischemia (B: hematoxylin and eosin, scale bar = 50 μm / D: Masson trichrome Scale bar = 50 μm / F: Masson trichrome Scale bar = 200 μm).

Figure 4A shows the presence of an exuberant chronic inflammatory infiltrate and full destruction of the mucosa in the ascending colon of the large intestine. In the submucosal region, multiple malformed granulomas with incipient fibroplasia around *S. mansoni* necrotic eggs and an accumulation of eosinophils can be observed. Occasional hemorrhagic foci and preservation of the muscle layer can be identified.

Figure 4B shows the presence of *S. mansoni* necrotic eggs (star) in the submucosal region of the large intestine surrounded by chronic inflammatory infiltrate with predominance of mononuclear cells and eosinophils (arrow tip). According to Table (page 4), the analysis on Figure 4 indicated a grade 4 mesenteric ischemia lesion characterized by structural destruction of villi, presenting only the framework of a few of these, formed by inflammatory cells and necrotic material, and presenting hemorrhage and basal glandular ulceration. Considering the early deaths of these animals, the samples could also be analyzed using the intestinal acute ischemia scale. The tissue lesions presenting that ischemia were evolutionary stage III, whose main characteristic is to affect all three tissue layers (mucosa, submucosa and muscle).

Figures 4C and D show the intestine of an animal with unknown causes of death, where intestinal damage is due only to the presence of *S. mansoni* eggs. Lastly, figures 4E and F show the intact tissue of a noninfected animal presenting grade 0 according to Table (page 4).

Figure 5 shows photomicrograph of the parasite inside the superior mesenteric vein, with reduction of blood flow and production of an ischemic process. Macroscopically, continuous lesions widely distributed along the ileum, cecum and colon were observed. The affected areas of the intestine were dark red or purple due to luminal hemorrhage. Furthermore, mucosa thickening was noted, caused by hemorrhage and edema. These animals' feces were dark and reacted positively to hydrogen peroxide, thus confirming the presence of blood. Figure 5 highlights an area where the presence of two pairs of *S. mansoni* were observed, blocking the superior mesenteric vein, thereby obstructing blood flow to the intestine.

The morphometric analysis results revealed that livers from animals with mesenteric ischemia presented a higher percentage of collagen, with larger granulomas and, consequently, larger areas than livers from animals that died from unknown causes ($p < 0.05$). However, the number of inflammatory cells in these animals was lower.

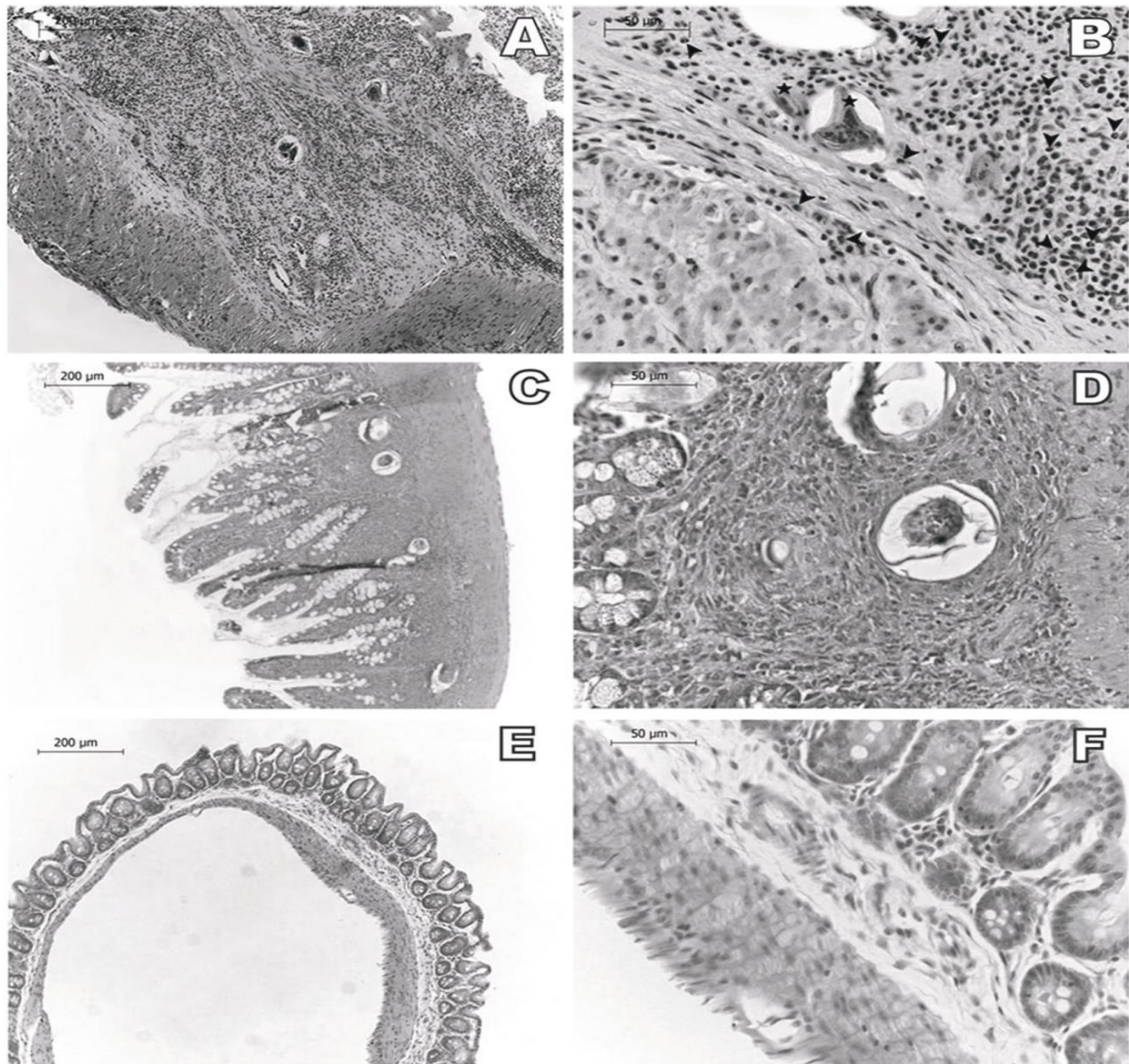


Figure 4. Photomicrographs of the region of the ascending colon in the large intestine in an animal with mesenteric ischemia. A. Presence of an inflammatory infiltrate can be observed (hematoxylin and eosin, Scale bar = 200 μm) B. Animal with mesenteric ischemia, *S. mansoni* eggs (*) and chronic inflammatory infiltrate (arrow) (hematoxylin and eosin, Scale bar = 50 μm). C and D: Animal with unknown cause of death, presence of eggs and granuloma (hematoxylin and eosin, C Scale bar = 200 μm and D Scale bar = 50 μm) E and F: Noninfected animal (hematoxylin and eosin, E Scale bar = 200 μm , and F Scale bar = 50 μm).



Figure 5. Photomicrograph of superior mesenteric vein with an adult *S. mansoni* worm pair inside, stained with hematoxylin and eosin; Scale bar = 200 μm .

DISCUSSION

In humans, the mechanical occlusion of mesenteric vessels by parasites is rare (Rha et al., 2000); however, in the present study, this was the most common type of impairment, occurring in over 30% of the cases. Figure 2B illustrates this typical presentation of mesenteric ischemia. When the occlusion occurs, the low-pressure venous output is compressed and, consequently, there is loss of arterial input. Strangled intestine segments are usually filled and distended and present edema with ascites (Rosenblum et al., 1997).

The intestinal mucosa has a high metabolism, therefore, requiring high blood perfusion. The ischemia causes rupture of the mucosal barrier, allowing the release of bacteria, toxins and vasoactive mediators, which in turn cause myocardial depression, systemic inflammatory response (sepsis and septic shock), even multiple organ failure and death. The release of mediators may occur even before the complete infarct, and necrosis may occur 10 to 12 hours after symptomatology (Nuzzo et al., 2017; Studer et al., 2015).

The superior mesenteric vessel network provides blood supply for the third and fourth portions of the duodenum through the superior and inferior pancreaticoduodenal arteries, and irrigates the jejunum, ileum and colon at the level of the splenic flexure (Herbert et al., 2004; Lenzi et al., 1998). Figure 2 shows the ileum, cecum and ascending colon darkened due to vessel occlusion and luminal hemorrhage. In humans, approximately 15% of all cases of mesenteric ischemia are due to mesenteric venous thrombosis. The diagnosis is complex, because the abdominal symptoms are nonspecific besides presenting general symptoms such as pain, nausea and vomiting (Bergqvist & Svensson, 2010; Rhee & Gloviczki, 1997).

To what extent do worms disrupt blood flow and lead to an ischemic process? In Figure 5 the worm is observed occluding a large part of the lumen of the vessel with a large thrombus around it, this obstruction induces turbulence in the vein and increases the shear stress along the vessel wall (Stein & Sabbah, 1974). Allied to this, the worm presence in the blood vessel may possibly cause damages to the vascular endothelium. It is known that there is a decrease in nitric oxide (NO) production and expression of endothelial NO synthase that are essential for vessel wall smooth muscle relaxation, increase in blood flow and decrease in blood pressure (Da'dara & Skelly, 2011; Oliveira et al., 2011; Silva et al., 1998). However, the parasite is highly adapted and has developed mechanisms of blood hypo-coagulation, hyper-fibrinolysis mechanisms and manipulation of vascular tone, which enable its survival in the bloodstream of the host (Mebius et al., 2013). This is successfully applied in human infection, where the caliber of the vessels is superior to mice vessels; however, even though the parasite synthesizes substances that avoid the Virchow Triad, the dimensions of the parasite when compared to those of the mesenteric vessels decrease the blood flow partially or totally and lead to ischemic processes.

In the present study, this anatomopathological presentation was more common than expected and, during the study period, mesenteric ischemia was detected as the main cause of death. This cause of death was confirmed to be higher than the unknown causes differently from that noted in humans (Sise, 2014), the hypothesis is that this high number was due to the animal's anatomy itself, which favors the pathological process. Due to the small caliber of the mesenteric vessels in mice, the worms are more likely to block blood vessels and begin an ischemic process. Consequently, the higher the parasitic load, the higher the likelihood of incidents such as these.

The death of animals with mesenteric ischemia and the approximately 10% lower survival number in the group that died from unknown causes hamper maintenance of the artificial cycle of *S. mansoni*, preventing the regular supply of miracidia for infecting mice. This consequently hinders release of cercariae to infect new animals and affects laboratory studies on the disease. More deaths mean less raw material for producing SEA and SWAP antigens and positive controls for PCR. Although The Kaplan-Meier estimate of Figure

2B is with another mouse species, it is clear when comparing the death rate of different parasitic loads. Longer animal survival enables better organization of laboratory routines and schedules. In addition, it also reduces the use of material, financial and human resources. There was no statistically significant difference between the *S. mansoni* BH and LE lineages, thus corroborating the fact that the high death rates occurred due to mechanical obstructive factors, rather than the virulence of the strain.

According to Herbert et al. (2004) and Lenzi et al. (1998), approximately 60% of the eggs produced by *S. mansoni* reach the intestinal lumen and go to the feces; the remaining 40% remain adhered to intestinal mucosa capillaries and liver sinusoids. These eggs release soluble antigens that mobilize macrophages, eosinophils, lymphocytes and plasma cells mediated by TNF, Th1 and Th2 cells and CD8 T lymphocytes. There is an accumulation of cells around eggs, an increase in the number of fibroblasts, production of collagen and, consequently, formation of schistosomal granulomas (Cerqueira et al., 2005). Although eggs can be observed in the intestinal tissue in Figure 4, they are not the cause of the chronic inflammatory infiltrate or the destruction of the organ's tissue structure, nor the cause of death. Animals with histopathological characteristics similar to those seen in Figure 4 died due to the ischemic process, which caused release of lactate and metabolic acidosis and led to a shock condition (Lee & Lee, 2005; Lins et al., 2008).

The analysis of morphometric data showed that animals with mesenteric ischemia apparently presented a more robust collagen structure of granulomas than did the animals with unknown causes of death. However, the small number of animals analyzed did not allow any inference for hypotheses. This difference could have been due to the evolutionary level of the granuloma, which progressively increases its collagen network, or to the immunological situation (Amaral et al., 2017), in which the animals were found, since the species studied (Swiss Webster) is not isogenic.

According to Da Silva (1992), a higher increase in the number of inflammatory cells was noted between 45 and 55 days after infection, and this number significantly decreased after the 55th day (Da Silva, 1992). The histomorphometric findings are not sufficient to allow inferences, and further studies with higher percentages of slides analyzed are expected to be conducted in order to investigate the relationship between early death due to mesenteric ischemia and the evolutionary stage of granulomas.

The present study identified the need to reduce the parasitic infection load from both strains analyzed, in order to increase animal survival and aid the maintenance of the artificial cycle of *S. mansoni*. The importance of intercommunication between vivaria, laboratories and reference services for schistosomiasis is also highlighted. Effective solutions should be studied for reducing the death rates among the animals that maintain the cycle.

ACKNOWLEDGMENTS

To FACEPE (Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia de Pernambuco) and the central experimental Animal Room of the Instituto Aggeu Magalhães (IAM), Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ).

REFERENCES

1. Amaral KB, Silva TP, Dias FF, Malta KK, Rosa FM, Costa-Neto SF, Gentile R, Melo RCN. Histological assessment of granulomas in natural and experimental *Schistosoma mansoni* infections using whole slide imaging. *PLoS ONE* 12: 1-20, 2017.
2. Bergqvist D, Svensson PJ. Treatment of mesenteric vein thrombosis. *Seminars in vascular surgery* 23: 65-68, 2010.
3. Cerqueira NF, Hussni CA, Yoshida WB. Pathophysiology of mesenteric ischemia/reperfusion: a review. *Acta Cir Bras* 20: 336-343, 2005.
4. Chiu CJ, McArdle AH, Brown R, Scott HJ, Gurd FN. Intestinal mucosal lesion in low-flow states. *Arch Surg* 101: 478, 1970.
5. Da'dara A, Skelly PJ. Manipulation of vascular function by blood flukes? *Blood reviews* 25: 175-179, 2011.
6. Da Silva LC. Portal Hypertension in Schistosomiasis: pathology and treatment. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 87: 183-186, 1992.
7. Herbert DR, Hölscher C, Mohrs M, Arendse B, Schwegmann A, Radwanska M, Leeto M, Kirsch R, Hall P, Mossmann H, Claussen B, Förster I, Brombacher F. Alternative macrophage activation is essential for survival during schistosomiasis and downmodulates T helper 1 responses and immunopathology. *Immunity* 20: 623-635, 2004.
8. Hohenwarter EJ. Chronic mesenteric ischemia: diagnosis and management. *Semin Intervent Radiol* 26: 345-351, 2009.
9. Jatobá MP, Candelária II PAP, Klug III WA, Fang CB, Capelhuchnik P. Fecal Occult Blood Test and Colonoscopy Diagnosis in 60 Patients. *Rev Bras Colo-Proctol* 28: 425-430, 2008.
10. Knobel E. Isquemia Mesentérica. In: *Conduitas no paciente grave*. São Paulo: Atheneu. 1994. 551-553p.
11. Lee JJ, Lee NA. Eosinophil degranulation: an evolutionary vestige or a universally destructive effector function? *Clin Exp Allergy* 35: 986-994, 2005.
12. Lenzi HL, Kimmel E, Schechtman H, Pelajo-Machado M, Romanha WS, Pacheco RG, Mariano M, Lenzi JA. Histoarchitecture of Schistosomal granuloma development and involution: morphogenetic and biomechanical approaches. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 93: 141-151, 1998.
13. Lins RAB, Cavalcanti CBL, Araújo-Filho JLS, Melo-Júnior MR, Chaves MEC. Distribution of eosinophils at different stages of hepatic granuloma evolution in mice infected with *Schistosoma mansoni*. *Rev Soc Bras Med Trop* 41: 173-178, 2008.
14. Longo WE, Ballantyne GH, Gusberg RJ. Ischemic colitis: patterns and prognosis. *Dis Colon Rectum* 35: 726, 1992.
15. Mebius MM, van Genderen PJJ, Urbanus RT, Tielens AGM, de Groot PG, van Hellemond JJ. Interference with the host haemostatic system by schistosomes. *PLoS Pathogens* 9: e1003781, 2013.
16. Nuzzo A, Maggiori L, Ronot M, Becq A, Plessier A, Gault N, Joly F, Castier Y, Vilgrain V, Paugam C, Panis Y, Bouhnik Y, Cazals-Hatem D, Corcos O. Predictive Factors of intestinal necrosis in acute mesenteric ischemia: prospective study from an intestinal stroke center. *Am J Gastroenterol* 112: 597-605, 2017.

17. Oliveira SDS, Quintas LEM, Amaral LS, Noël F, Farsky SH, Silva CLM. Increased Endothelial cell-leukocyte interaction in murine schistosomiasis: possible priming of endothelial cells by the disease ed. Masuko Ushio-Fukai. *PLoS ONE* 6: e23547, 2011.
18. Pinotti HW. Isquemia intestinal insuficiência vascular mesentérica. In: *Tratado de clínica cirúrgica do aparelho digestivo*. São Paulo: Atheneu. 1994. p. 702-711.
19. Rey L. *Bases da parasitologia médica*. 3a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2011. 404p.
20. Rha SE, Ha HK, Lee SH, Kim JH, Kim JK, Kim JH, Kim PN, Lee MG, Auh YH. CT and MR imaging findings of bowel ischemia from various primary causes. *Radio Graphics* 20: 29-42, 2000.
21. Rhee RY, Gloviczki P. Mesenteric venous thrombosis. *Surg Clin North Am* 77: 327-338, 1997.
22. Rosenblum JD, Catherine MB, Schwartz LB. The mesenteric circulation: anatomy and physiology. *Surg Clin North Am* 77: 289-306, 1997
23. Silva CLM, Morel N, Noël F. Portal veins of mice infected with *Schistosoma mansoni* exhibit an increased reactivity to 5-Hydroxytryptamine. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 93: 153-155, 1998.
24. Sise MJ. Acute mesenteric ischemia. *Surg Clin North Am* 94: 165-181, 2014.
25. Stein PD, Sabbah HN. Measured turbulence and its effect on thrombus formation. *Circulation Res* 35: 608-614, 1974.
26. Studer P, Vaucher A, Candinas D, Schnüriger B. The value of serial serum lactate measurements in predicting the extent of ischemic bowel and outcome of patients suffering acute mesenteric ischemia. *J Gastrointest Surg* 19: 751-755, 2015.
27. Ward D, Vernava AM, Kaminski DL, Ure T, Peterson G, Garvin P, Arends TW, Longo WE. Improved outcome by identification of high-risk nonocclusive mesenteric ischemia, aggressive reexploration, and delayed anastomosis. *Am J Surg* 170: 577-581, 1995.
28. Wiesner W, Mortelé KJ, Glickman JN, Ji H, Ros PR. Pneumatosis intestinalis and portomesenteric venous gas in intestinal ischemia: correlation of CT findings with severity of ischemia and clinical outcome. *AJR Am J Roentgenol* 177: 1319-1323, 2001.

ANEXO A – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISAS ANIMAIS

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Certificado de Aprovação

Certificamos que o projeto intitulado "ESTUDO EXPERIMENTAL DAS FORMAS ECTÓPICAS DA ESQUISTOSSOMOSE: AVALIAÇÃO DAS RESPOSTAS MORFOFISIOPATOLÓGICA E GENOTÓXICA" protocolado sob nº 89/2015 pelo (a) pesquisador (a) Dr^a Constança Clara Gayoso Simões Barbosa está de acordo com a Lei 11.794/2008 e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães / Fundação Oswaldo Cruz (CEUA/CPqAM) em 11/04/2016. Na presente versão, este projeto está licenciado e tem validade até dezembro de 2018

Quantitativo de Animais Aprovados	
Espécie	Nº de Animais
Camundongo isogênico BALB/c macho	128 (machos)
TOTAL	128

We certify that project "ESTUDO EXPERIMENTAL DAS FORMAS ECTÓPICAS DA ESQUISTOSSOMOSE: AVALIAÇÃO DAS RESPOSTAS MORFOFISIOPATOLÓGICA E GENOTÓXICA" (CEUA Protocol nº 89/2015) coordinated by CONSTANÇA CLARA GAYOSO SIMÕES is according to the ethical principles in animal research adopted by the Brazilian law 11.794/2008 and so was approved by the Ethical Committee for Animal Research of the Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães / Fundação Oswaldo Cruz on April, 11, 2016. In present version this project is licensed and valid until december 2018.

Recife (PE, BRAZIL) 11 april 2016

Sheilla Andrade de Oliveira

Dr^a Sheilla Andrade de Oliveira

Coordenadora CEUA/CPqAM

Coordenadora de Comissão de Ética

no Uso de Animais - CEUA

Mat. SIAPE 13549/5

e-mail: sheilla@cpqam.fiocruz.br

CPqAM/Fiocruz