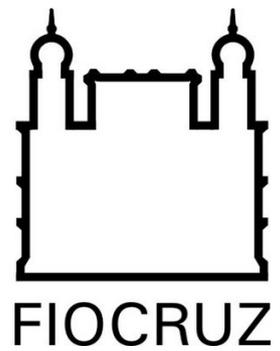




UNIVERSIDADE FEDERAL
DA BAHIA - UFBA

UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ



Curso de Pós-graduação em Patologia Humana

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

***Schistosoma mansoni*: Avaliação da fibrose hepática em
camundongos submetidos à quimioterapia e reinfectados.**

ELISÂNGELA TRINDADE SANTOS

SALVADOR

BAHIA - BRASIL

2011



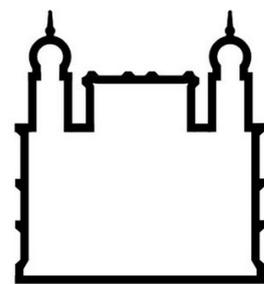
**UNIVERSIDADE FEDERAL
DA BAHIA - UFBA**

UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA

FACULDADE DE MEDICINA

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ - FIOCRUZ

CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ



FIOCRUZ

Curso de Pós-graduação em Patologia Humana

***Schistosoma mansoni*: Avaliação da fibrose hepática em
camundongos submetidos à quimioterapia ereinfectados.**

ELISÂNGELA TRINDADE SANTOS

Professor-orientador

Dr. Zilton de Araújo Andrade

Chefe do Laboratório de Patologia Experimental (LAPEX) e Professor Permanente do Curso de Pós-graduação em Patologia da FIOCRUZ-UFBA, no Instituto Gonçalo Moniz (FIOCRUZ-BA).

Dissertação apresentada ao Colegiado do Curso de Pós-graduação em Patologia Humana, como pré-requisito obrigatório para obtenção do grau Mestre.

SALVADOR

BAHIA - BRASIL

2011

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca do
Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz / FIOCRUZ - Salvador - Bahia.

Santos, Elisângela Trindade

S237s *Schistosoma mansoni*: avaliação da fibrose hepática em camundongos submetidos à quimioterapia e reinfectados.[manuscrito] / Elisângela Trindade Santos. - 2011.

70 f. : il. ; 30 cm.

Datilografado (fotocópia).

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal da Bahia. Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, 2011.

Orientador: Prof. Dr. Zilton de Araújo Andrade, Laboratório de Patologia Experimental.

1. Fibrose Hepática. 2. *Schistosoma mansoni*. 3. Praziquantel. 4. Oxamniquine. I. Título.

CDU 616.995.122-.36

À minha família pelo apoio incondicional amor e dedicação.

Fontes de financiamento:

CNPq e CPqGM/FIOCRUZ

Ora, todo aquele que se alimenta de leite é inexperiente na palavra da justiça, porque é criança. Mas o alimento sólido é para os adultos, para aqueles que, pela prática, tem as suas faculdades exercitadas para discernir não somente o bem, mas também o mal.

Hebreus 5:15-16

AGRADECIMENTOS

À Deus pela oportunidade de viver e por conceder-me a vitória.

Ao prof. Dr. Zilton de Araújo Andrade, pela orientação contínua, competência; apoio e confiança.

À Dr^a Márcia pelos constantes ensinamentos, pelo excelente convívio e pela oportunidade de trabalhar sob sua supervisão.

À MS e doutoranda Ana Cristina Gonzalez pela competência, dedicação e espírito alegre que me auxiliaram em todas as etapas deste trabalho.

Ao Sr. Antônio Carlos pelo incentivo e companheirismo durante o desenvolvimento de toda parte experimental.

À todos os amigos do Laboratório de Patologia Experimental (LAPEX) pela compreensão e carinho.

À Dr^a. Sônia Gumes Andrade e aos colegas do Laboratório de LACEI pela cooperação e boa vontade em inúmeras ocasiões.

À todos os funcionários da Biblioteca Interinstitucional Eurydice Pires de Sant'Anna (BIEPS), do Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz pelo profissionalismo e gentileza;

Ao Laboratório de Histotecnologia pelo auxílio na elaboração dos blocos e lâminas utilizados.

Ao Laboratório de Microscopia Eletrônica: Dr^a. Adriana Lanfredi Rangel, ao doutorando Cláudio Pereira Figueira e a Dr^a. Lúcia Moreno pela inestimável ajuda na realização do estudo ultraestrutural e morfometria.

Ao Biotério pelo cuidado e manutenção dos animais de experimentação.

Às secretárias Luciana Vieira da Lima e Ivanilde Gobbi Santos Santana pela assessoria.

Aos amigos do curso de Pós-graduação em Patologia (PGPAT) pelo companheirismo e incentivo.

Aos colegas e funcionários do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz pela compreensão e atenção.

À todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

Sumário

1	Introdução	13
2	Fundamentação Teórica	14
3	Justificativa	21
4	Objetivos	22
4.1	Objetivo Geral	22
4.2	Objetivos Específicos	22
5	Materiais e Métodos	23
5.1	Procedimentos Experimentais	23
5.2	Considerações Éticas	26
5.3	Análise Estatística	27
5.4	Desenho Experimental	28
6	Resultados	29
6.1	Análise Histológica HE	29
6.2	Análise Histológica Sírius-red	33
6.3	Imunohistoquímica Alfa-actina de músculo liso	36
6.4	Imunohistoquímica CD31	39
6.5	Imunofluorescência	42
6.6	Análise Ultraestrutural	45
6.7	Análise Morfométrica	48
7	Discussão	54
8	Conclusão	62
9	Referências Bibliográficas	63

Lista de Abreviaturas

CD31- Grupo de Diferenciação 31

CHB- Hepatite B crônica

DAB - Diaminobenzidina

EPCs - Células Progenitoras Endoteliais da Medula Óssea

HE- Hematoxilina e Eosina

HSC-Célula Estrelar Hepática

IFN γ – Interferon Gama

IL13 – Interleucina 13

MEC- Matriz Extracelular

MMP – Metaloproteínases

OMS – Organização Mundial de Saúde

PBS - Tampão fosfato salina (phosphatebuffered saline)

PDGF-Fator de crescimento derivado de plaqueta

PPAR γ – Receptor gama ativado por proliferadores e de peroxissomos

SEA - Antígeno ovular Solúvel

SEC- Células endoteliais sinusoidais

S.hematobium – *Schistosoma hemaobium*

S. mansoni -*Schistosoma mansoni*

SREBP-1- Proteína de ligação **reguladora** de Esterol-1

TGF β – Fator de crescimento transformador beta

TIMP- Tissue Inhibitors of Metalloproteinases

TNF α – Fator de necrosetumoralalfa

VEGF- Fator de crescimento endotelial vascular

PV – Pontos vermelhos

Lista de Figuras

Figura 1 – Aspectos histológicos do tecido hepático dos animais pertencentes aos grupos GIP, GTP, GITO, GTPR e GTOR.

Figura 2 - Ilustração do tecido hepático corados pela técnica HE. Animais durante as seguintes fases: Dois e três meses pós reinfecção.

Figura 3 – Análise histológica do parênquima hepático corados pela técnica de Sírius-red. Animais durante as seguintes fases: Infecção primária, Depois do tratamento e um mês após reinfecção.

Figura 4– Ilustração do parênquima hepático corados pela técnica de Sírius - red animais durante as seguintes fases: Dois e três meses após reinfecção.

Figura 5 – Ilustração do tecido hepático submetido à imunomarcação da α -SMA em animais durante as seguintes fases: Antes do Tratamento, Depois do tratamento e um mês após reinfecção.

Figura 6 – Ilustração do tecido hepático submetido à imunomarcação da α -SMA em animais durante as seguintes fases: Dois e três meses após reinfecção.

Figura 7 – Ilustração do tecido hepático submetido à imunomarcação do CD31 em animais durante as seguintes fases: Antes do tratamento, depois do tratamento e um mês após reinfecção.

Figura 8– Ilustração do parênquima hepático submetidos e imunomarcação do CD31 em animais durante as seguintes fases: Dois e três meses após reinfecção.

Figura 9 – Ilustração do tecido hepático submetidos a técnica de imunofluorescência em animais durante as seguintes fases: Antes do Tratamento, Depois do tratamento e um mês após reinfecção.

Figura 10 – Ilustração do tecido hepático submetido a técnica de imunofluorescência em animais durante as seguintes fases: Dois e três meses após reinfecção.

Figura 11 – Microscopia Eletrônica de Transmissão avaliando o aspecto ultraestrutural durante as seguintes fases: Antes do Tratamento, Depois do tratamento e um mês após reinfecção.

Figura 12 – Microscopia Eletrônica de Transmissão avaliando o aspecto ultraestrutural durante as seguintes fases: Dois e três meses após reinfecção.

Figura 13 – Cinética da quantidade de colágeno verificada em cada fase do experimento.

Figura 14 – Determinação dos níveis de colágeno verificados em cada fase do experimento.

Figura 15 – Quantificação do colágeno hepático dos animais controles não tratados.

Figura 16 –Quantificação de colágeno hepático em animais tratados com Praziquantel, Oxamniquine e controle não tratado.

Figura 17 –Análise dos níveis de colágeno especificado o tipo de droga utilizada.

Figura 18 –Cinética do tamanho do granuloma.

Figura 19 –Análise morfométrica do tamanho do granuloma

Figura 20 – Análise do tamanho do granuloma comparando-se os dois tipos de tratamento.

Abstract

SCHISTOSOMA MANSONI: ASSESSMENT OF LIVER FIBROSIS IN MICE UNDERGOING CHEMOTHERAPY AND REINFECTED.

Schistosomiasis mansoni is a tropical parasitic disease. Caused by helminths of the genus *Schistosoma*. In an attempt to contain the disease, various institutes and organizations are developing control measures to treat infected individuals and prevent new infections. Strategies of mass drug administration are effective in curing the disease, whereas treatment with anthelmintic drugs do not prevent the possibility of the occurrence of reinfection. Faced with this question, in this work we decided to analyze the kinetics of hepatic fibrosis in schistosomiasis treated mice and subjected to reinfection. To achieve this goal, 70 Swiss mice were infected with 50 cercariae *S. mansoni* subsequently treated with oxamniquine or praziquantel and reinfected four months after treatment. The livers of these animals were subjected to immunohistochemistry and immunofluorescence techniques and transmission electron microscopy to evaluate the expression and participation of constituents involved in the fibrogenic process. To check the rates of collagen between the groups used the morphometric analysis. Histological analysis revealed that mice submitted to specific chemotherapy schistosomiasis developed fibrosis during high rates of reinfection. Immunostaining for alpha smooth muscle actin (α -SMA) revealed that much of the liver parenchyma of animals treated and reinfected cells exhibited myofibroblastic profile. Immunofluorescence showed that the labeling pattern for laminin was abnormal in animals with schistosomiasis. Morphometric analysis revealed that reinfection of animals caused an intense collagen deposition in the liver parenchyma. The data obtained showed that reinfection in animals previously treated, was able to induce a fibrotic response similar to that found in animals with primary infection.

Keywords: 1-hepatic fibrosis, 2-*Schistosoma mansoni*, praziquantel three-, four-Oxamniquine, 5-Reinfection

Resumo

SCHISTOSOMA MANSONI: AVALIAÇÃO DA FIBROSE HEPÁTICA EM CAMUNDONGOS SUBMETIDOS À QUIMIOTERAPIA E REINFECTADOS. A esquistossomose mansônica é uma doença parasitária tropical. Causada por helmintos do gênero *Schistosoma*. Com a intenção de conter a doença, diversos institutos e organizações vêm desenvolvendo medidas de controle para tratar indivíduos infectados e evitar a ocorrência de novas infecções. Estratégias de administração de medicamentos em massa são eficazes na cura da doença, entretanto o tratamento com drogas anti-helmínticas não previnem a possibilidade da ocorrência de reinfecções. Diante desta questão, neste trabalho propusemo-nos a analisar a cinética da fibrose hepática em camundongos esquistossomóticos tratados e submetidos à reinfecção. Para alcançar este objetivo, 70 camundongos Swiss foram infectados com 50 cercárias de *S.mansoni*, posteriormente tratados com Oxamniquine ou Praziquantel e reinfectados quatro meses após tratamento. Os fígados destes animais foram submetidos a técnicas de imunohistoquímica e imunofluorescência e microscopia eletrônica de transmissão para avaliação da expressão e participação de componentes envolvidos no processo fibrogênico. Para verificar os índices de colágeno entre os grupos utilizou-se a análise morfométrica. A análise histológica revelou que camundongos esquistossomóticos submetidos à quimioterapia específica desenvolveram altos índices de fibrose durante a reinfecção. A imunomarcagem para alfa actina de músculo liso (α -SMA) revelou que grande parte do parênquima hepático dos animais tratados e reinfectados exibiam células com perfil miofibroblástico. A imunofluorescência demonstrou que o padrão de marcação para laminina estava alterado em animais com esquistossomose. A análise morfométrica revelou que reinfecção destes animais ocasionou uma intensa deposição de fibras colágenas no parênquima hepático. Os dados obtidos demonstraram que a reinfecção em animais previamente tratados, foi capaz de induzir uma resposta fibrótica semelhante a encontrada nos animais com infecção primária.

Palavras chave: 1-Fibrose hepática, 2-*Schistosoma mansoni*, 3-Praziquantel, 4-Oxamniquine, 5-Reinfecção.

1- Introdução

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), esquistossomose mansoni é uma doença parasitária encontrada em vários países tropicais. Com a intenção de conter a doença, diversos institutos e organizações de todo o mundo vêm desenvolvendo medidas de controle para tratar indivíduos infectados e evitar a ocorrência de novas infecções. As medidas de controles utilizadas incluem a implementação de projetos para melhoramento de saneamento básico, eliminação de hospedeiros intermediários e tratamento com drogas específicas. Programas de administração de medicamentos em massa são eficazes na cura da doença, entretanto o tratamento com drogas anti-helmínticas não previnem a possibilidade da ocorrência de novas infecções. Alguns pesquisadores com experiência em trabalhos de campo têm suspeitado que as reinfecções pelo *Schistosoma mansoni* representem um fator adicional relacionado à gravidade da doença, uma vez que animais reinfectedados pelo *S.mansoni* parecem exibir uma maior proporção de fibrose periportal em comparação com os animais com infecção única (Santos *et al.* 2000).

Em estudo recente Botros 2005, observaram que mesmo após vários ciclos de tratamento, alguns indivíduos permanecem capazes de adquirir novas infecções. Diante deste fator comunidades participantes de programas de tratamento em massa devem ser acompanhadas, a fim de verificar a eficácia do tratamento e a incidência de reinfecções. Por esta razão, neste trabalho propusemo-nos a analisar a cinética da fibrose hepática em camundongos esquistossomóticos tratados e submetidos à reinfecção.

2- Fundamentação Teórica

Fibrose Hepática

A fibrose surge como uma resposta tecidual a agressões crônicas, podendo ser causada pelos mais variados fatores incluindo as infecções helmínticas (Bataller e Brenner 2005). O mecanismo envolvido no estabelecimento da fibrose parece ser semelhante nos diferentes órgãos. Geralmente sua fase inicial é caracterizada por um aumento na produção de tecido conjuntivo, o qual é acompanhado por deposição excessiva de colágeno em substituição da arquitetura normal do tecido interferindo diretamente na sua atividade funcional. (Carey 2010, Andrade 2008).

O excesso na deposição de matriz extracelular (MEC) interfere na fisiologia normal do fígado, resultando em alterações patofisiológicas. Durante a fibrose o que ocorre é um desequilíbrio da homeostasia hepática, fazendo com que os estímulos fibrogênicos prevaleçam sobre os estímulos de fibrólise. Entretanto, quando os estímulos fibrogênicos são retirados ou eliminados, o excesso de tecido fibroso é removido devido ao predomínio dos estímulos causadores de fibrólise. (Andrade, 2005).

A matriz extracelular (MEC) é composta por um conjunto de moléculas distintas, que são secretadas localmente mantendo uma íntima relação com a superfície celular. Alguns dos seus componentes são a fibronectina, laminina, ácido hialurônico, proteoglicanos, fibras elásticas e colágenas. Uma das principais macromoléculas presentes na MEC é o colágeno. O colágeno é uma proteína fibrosa cuja principal característica é possuir uma fita tripla helicoidal longa e rígida. Este composto é extremamente rico em prolina e em glicina, os quais são importantes na formação da fita tripla helicoidal. O colágeno proporciona resistência além de auxiliar na organização da matriz. Até o momento são classificados mais de 18 tipos de colágeno, e suas subunidades são codificadas por genes diferentes. Os colágenos tipo I, II e III são os mais abundantes no organismo humano. Em nível celular, os colágenos são sintetizados como pro-colágenos, e depois da secreção dessas moléculas sua porção terminal é clivada por meio de enzimas extracelulares chamadas

colagenases e depois liberadas. Com a clivagem, são formadas as moléculas de colágeno que se polimerizam para formar fibrilas colágenas que, por sua vez, se agregam para constituir as fibras colágenas. (Vargas *et al.* 1997, Martinez *et al.* 1991 Lee e Friedmam 2011).

No fígado, a fibrose ocorre quando os hepatócitos sofrem lesões persistentes ou são acometidos de reações imunes ou auto-imunes. Diversos fatores estão envolvidos na progressão da fibrose, dentre estes podemos destacar a estimulação e ativação de vários mecanismos celulares e moleculares como: citocinas e fatores de crescimento, os quais regulam a síntese de componentes da matriz extracelular. Após a inflamação aguda as células do parênquima hepático se regeneram e voltam a sua fisiologia normal. Contudo se o estímulo nocivo persiste, a regeneração hepática falha e os hepatócitos lesados são substituídos por abundante material extracelular inclusive fibras colágenas. Em estágios avançados a fibrose hepática apresenta vários tipos de colágeno e outros componentes da MEC.(Friedman e Meena 2006,Iredadeet *al.* 1998).

Após agressões teciduais, fibroblastos são ativados e se transdiferenciam em miofibroblastos. Os fibroblastos são células comuns do tecido conjuntivo, e quando ativadas exibem intensa atividade sintética. Durante sua fase ativa apresentam marcação positiva para α - actina de músculo liso. Fenotipicamente são células que se apresentam com prolongamentos citoplasmáticos irregulares, núcleo grande com formato ovóide, cromatina fina e nucléolo evidente. Possuem também citoplasma rico em retículo endoplasmático e aparelho de Golgi bem desenvolvido. Portanto, durante agressões teciduais, estas células são uma das principais sintetizadoras de MEC. Devido a estas características, os miofibroblastos são essenciais nos processos de contração de ferimentos e cicatrização. (Masuret *al.* 1989).

A célula estrelar hepática (HSC), também conhecida como lipócitos, célula de Ito ou célula perisinusoidal, possui capacidade de sintetizar componentes da matriz extracelular (MEC). Em condições fisiológicas normais, esta célula reside no espaço de Disse, entre os hepatócitos e células

endoteliais sinusoidais e possui origem mesenquimal. Esta célula é responsável pelo acúmulo de vitamina A e pela regulação da homeostasia hepática. Durante a lesão do fígado esta célula é ativada ou se transdiferencia em células com fenótipo de miofibroblasto adquirindo características contráteis, pró-inflamatórias e fibrogênicas. Entretanto, no fígado saudável as HSCs expressam marcadores que são característicos de adipócitos como: PPAR γ , SREBP-1c e leptina. Contudo, durante processos inflamatórios as referidas células expressam marcadores miogênicos como: α -actina de músculo liso, cmyb e outros. Estas células podem migrar para o local da lesão secretando quantidades consideráveis de MEC e regular sua degradação (Parsons 2007 e Sandulescu *et al.* 2011).

Estudos recentes demonstraram que além das HSCs os fibroblastos, miofibroblastos portais e as células tronco, podem adquirir a capacidade de produzir componentes do tecido conectivo. Células de Kupffer (macrófagos que residem no fígado) pertencentes ao sistema mononuclear fagocitário participam ativamente do processo inflamatório. Durante a fibrogênese existe uma complexa interação entre diferentes células. Lesões ao tecido hepático ativam uma série de mediadores que induzem o recrutamento de células inflamatórias. Tanto linfócitos como polimorfonucleares são capazes de induzir as HSCs a produzirem MEC (Friedman, 2004).

Durante o dano hepático as citocinas atuam regulando a resposta do tecido às agressões modulando o estabelecimento da fibrose. Entre os fatores de crescimento que participam do processo fibrótico, o TGF β 1 parece ser um dos principais atuantes na transformação das HSCs em HSC de linhagem miofibroblástica. O PDGF por sua vez, funciona como um potente agente mitótico para HSC; experimentos em animais deficientes deste fator demonstraram uma leve diminuição da fibrose hepática experimental (Friedman, 1999).

Apesar de todo este complexo processo ser ativado durante a lesão hepática, se o estímulo nocivo for anulado ou retirado a fibrose pode regredir, através da ação das metaloproteinases. As metaloproteinases de matriz (MMPs) constituem uma família de enzimas com função proteolítica cuja

atividade é dependente de zinco e cálcio. Diferem entre si estruturalmente e em sua habilidade em degradar um grupo particular de componentes da matriz extracelular sendo que juntas podem degradar todos os seus componentes proteicos. Em humanos foram identificados vinte e quatro genes relacionados a MMPs. As MMPs são formadas por um peptídeo sinalizador, um pro-peptídeo, um domínio catalítico e um domínio C-terminal. Geralmente as metaloproteínas são secretadas de forma latente - pró-enzimas ou zimogênios(Thomaset *al.* 1999).

Por causa do seu potencial degradativo as metaloproteínas de matriz são controladas por uma família de inibidores específicos conhecidos como: inibidores teciduais de metaloproteínas (Tissueinhibitors of metalloproteinases-TIMPS). TIMPs são glicoproteínas de baixo peso molecular cuja função específica é inibir MMP. Até o momento existem quatro tipos distintos de TIMPS (TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3, TIMP-4). Em geral todos os membros desta família são capazes de inibir a ação de metaloproteínas. Estas glicoproteínas exibem uma complexa interação com MMP, mas sua principal função é ligar-se ao sítio ativo das moléculas de MMP, tendo como resultado a inibição da função degradativa destas (Michael J. P. Arthur, 1999).

Fibrose periportal

O sistema porta hepático é uma área localizada entre cada lóbulo. Este sistema é composto por um ramo da artéria hepática, um ramo da veia porta, ducto biliar e canais linfáticos. Durante o processo fibrogênico a distribuição das fibras colágenas depende da origem do estímulo nocivo. No caso da esquistossomose muitos dos ovos postos pelo verme fêmea nos vasos do intestino são arrastados pela corrente sanguínea, estes são retidos no espaço porta hepático, causando uma intensa reação inflamatória local. Inicialmente é possível observar a presença de neutrófilos, macrófagos, linfócitos e outras células envolvidas na inflamação. Entretanto, logo começa a surgir um acúmulo de tecido fibroso em torno do espaço-porta. Este tipo de fibrose recebe o nome

de fibrose periportal e é caracterizada pelo acúmulo de células inflamatórias e deposição de matriz extracelular nesta região. A patogenia deste tipo de fibrose desenvolvida em alguns pacientes esquistossomóticos, ainda não está completamente esclarecida. A fibrose periportal é a causa pela qual apenas 4% a 10% dos indivíduos residentes na área endêmica desenvolverem a forma hepatoesplênica da doença (Ramadori&Saile 2004).

Esquistossomose

A esquistossomose está presente em aproximadamente 74 países, onde 200 milhões de indivíduos são infectados. Infecções por *Schistosoma mansoni* podem causar complicações importantes. A infecção pode levar a morte quando o paciente desenvolve hipertensão portal, que é causada pela fibrose hepática periportal. (Tallimi&Ridi, 2007;Wantanabe, 2009).

Na esquistossomose grande parte das lesões são causadas pela resposta imune do hospedeiro aos ovos do verme. Estes ovos provocam reações granulomatosas seguidas de fibrogênese. A intensidade e duração da infecção estão relacionadas com a quantidade de antígeno originado pelo ovo e verme, o que conseqüentemente interfere na severidade da doença e na capacidade fibro-obstrutiva. A esquistossomose poder ter duas fases: a aguda e a crônica.

Com frequência a fase aguda da doença é caracterizada pelo surgimento de febre, anorexia, dores abdominais e cefaléia. Em alguns casos o indivíduo pode apresentar um quadro de diarréia, náuseas e tosse. Nesta fase pode-se detectar hepatoesplenomegalia e com auxílio de exames laboratoriais verifica-se eosinofilia bastante aumentada. Apesar disso, os sintomas apresentados durante a fase aguda da doença podem variar desde um quadro assintomático até o surgimento de dermatites urticariformes (Caldas *et al.* 2008, Lambertucci 2010).

A fase crônica começa a surgir por volta do quarto mês de infecção. Esta pode evoluir por muitos meses ou anos. A depender da intensidade da infecção vários órgãos podem ser comprometidos, tais manifestações clínicas podem

levar a complicações mais graves como a forma intestinal , hepatointestinal, hepatoesplênica e até mesmo neurológica (Mansour 1989, Beck 2008).

Outro evento importante relacionado ao desenvolvimento da doença é a angiogênese. A formação de novos vasos sanguíneos pode ocorrer pela ramificação e extensão de vasos adjacentes ou pelo recrutamento de células progenitoras endoteliais da medula óssea (EPCs). (Burke *et al* 2009, Loeffler *et al.* 2002 Francis M.E *et al.* 2008).

As lesões causadas pelo ovo desenvolvem um processo inflamatório seguido da formação do granuloma periovular. Esta reação em torno do ovo evidencia a importância do ovo como agente patogênico nesta doença. Isso ocorre porque todo ovo que não é eliminado do organismo do hospedeiro provocará uma reação inflamatória e posteriormente o surgimento do granuloma periovular.

Tratamento

A farmacoterapia é a principal estratégia contra a esquistossomose, tanto para eliminação dos parasitos em indivíduos infestados, como para reduzir a incidência e morbidade em áreas endêmicas. Atualmente o fármaco preferido é o Praziquantel, um derivado pirazino-quinoleínico. Este quimioterápico é rapidamente absorvido no trato gastrointestinal e também rapidamente excretado. Estudos realizados revelaram que esta droga atua principalmente no metabolismo dos carboidratos. Como efeito adicional a referida droga determina uma permeabilidade maior do tegumento do verme (Tallima *et al.* 2007, Brindley 1987).

Outra droga utilizada é o Oxamniquine um derivado da tetraidroquinoleína. Sua absorção se faz muito bem após administração oral ou intramuscular, sendo amplamente metabolizada em derivados ácidos biologicamente inativos, excretados em grande parte pela urina (PicaMattoccia e Cioli 1985).

O tratamento da esquistossomose utilizando os anti-helmínticos (Praziquantel ou Oxamniquine) tem demonstrado grande eficiência

principalmente por apresentarem poucas reações adversas. Além disso, existem evidências que o tratamento com Praziquantel induz mudanças na resposta imune do hospedeiro. Embora muito eficientes os quimioterápicos utilizados no tratamento da esquistossomose, não conferem proteção contra reinfecções. Sendo assim, faz-se necessário o desenvolvimento de uma vacina específica (Lamberton 2010, Coura 2010, Abdulet *al.* 2009).

Andrade e colaboradores em 2006 observaram alterações vasculares em animais infectados com *S. mansoni* e tratados com Oxaminquine e Praziquantel, onde os animais não tratados apresentaram obstrução da veia porta, e nos animais que receberam o tratamento estas lesões vasculares desapareciam após o quarto mês de tratamento.

Coelho e colaboradores (1994) verificaram a capacidade de modulação da resposta granulomatosa da esquistossomose murina em animais tratados e reinfecidos. Sessenta dias após a reinfecção foi observado que o fígado destes animais apresentou granulomas típicos de fase crônica, sugerindo que a capacidade de modulação da resposta granulomatosa permanece mantida, prevenindo uma nova fase aguda. Por outro lado os animais não-tratados e reinfecidos apresentaram uma reagudização da resposta granulomatosa.

Ernouldet *al.* (1999) analisaram populações residentes em regiões endêmicas para *S.mansoni* e *Schistosoma hematobium* tratadas com Praziquantel e demonstraram que seis semanas após o tratamento a média de eliminação de ovos diminuiu 95% para *S.hematobium* e 75% para *S.mansoni*. Dez meses após o tratamento verificou-se a incidência de reinfecções. Sendo que para *S.hematobium* os índices de reinfecção diminuiu, entretanto para *S.mansoni* o índice reinfecção continuou alto, mesmo após o tratamento específico.

Justificativa

Apesar da diminuição de casos, no Brasil, a esquistossomose ainda representa um importante problema para a saúde pública atual, pois está associada a uma série de manifestações clínicas como: fibrose periportal, fibrose pulmonar, alterações vasculares, intestinais, problemas renais, dentre outros. Dentre as complicações causadas pela esquistossomose, a fibrose periportal é o achado mais comum. Diante deste cenário a forma de combate á doença adotado pelo Ministério da Saúde brasileiro consiste na utilização de quimioterápicos específicos (Praziquantel e Oxamniquine). Levando em consideração a gravidade da doença em 2001 a Organização Mundial da Saúde (OMS) resolveu criar novas ações para reduzir a transmissão do parasita em crianças em idade escolar (OMS 2001). Em 2003 com o auxílio financeiro da Fundação Bill e Melinda Gates, projeto conhecido como Iniciativa de Controle da Esquistossomose (www.schisto.org) custeou a administração em massa de Praziquantel em diversos países do continente africano. Entretanto, apesar da eficácia curativa das drogas utilizadas, o tratamento não é capaz de evitar novas infecções. Sendo assim, o presente estudo pretende avaliar o comportamento da doença em animais tratados e submetidos a uma nova infecção.

3 . OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o desenvolvimento da fibrose hepática periportal em camundongos Swiss submetidos à quimioterapia específica e reinfectedos com *Shistosoma mansoni* comparando-os a animais não tratados.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

Acompanhar a evolução das alterações hepáticas presentes no grupo controle e compará-la aos grupos tratados com os anti-helmínticos e posteriormente reinfectedos.

Determinar as diferenças no tamanho dos granulomas em animais reinfectedos tratados com Praziquantel ou Oxamniquine, comparando-os ao grupo controle.

Determinar quais são as principais características histológicas presentes no fígado dos animais reinfectedos, e avaliar de que maneira estes fatores estão relacionados aos processos de fibrose hepática periportal e formação de granulomas.

Caracterizar através da imunohistoquímica, da imunofluorescência e da análise ultraestrutural os aspectos celulares encontrados na fibrose hepática periportal e determinando se existe uma simultaneidade no aparecimento desses elementos.

Verificar se o tratamento com Praziquantel ou Oxamniquine pode alterar o desenvolvimento da fibrose periportal e intensidade de processo angiogênico em animais reinfectedos. Como também analisar o desenvolvimento da doença em animais tratados e reinfectedos, através dos seguintes métodos: análise morfométrica (quantitativo), avaliação do grau de fibrose periportal e presença de granulomas hepáticos.

5. MATERIAS E MÉTODOS

Foram utilizados 70 camundongos *Swisswebster*, de ambos os sexos, pesando entre 50 a 60 gramas. Os animais foram fornecidos pelo biotério de experimentação do Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz (CPqGM/FIOCRUZ), Bahia. Os animais foram alocados em gaiolas plásticas, em ciclos dia e noite de 12 horas, em condições de temperatura e umidade ambientais, recebendo ração e água *ad libitum*.

5.1 Procedimentos Experimentais

Os animais foram acompanhados por um período de dez meses. Inicialmente todos os animais pertenciam a um único grupo GIP (Grupo Infecção Primária). Estes animais foram submetidos à infecção por via percutânea, com 50 cercárias isoladas de moluscos originados de Feira de Santana (FS), recentemente eliminadas por diversos caramujos criados e infectados no Moluscário da Instituição. Quarenta e cinco dias após a exposição cercariana, as fezes dos animais foram analisadas através do exame parasitológico para avaliar o estágio de infecção. Durante o segundo mês houve coleta de material. No terceiro mês de infecção, os animais dos grupos GIP foram tratados com quimioterápicos específicos e subdivididos em três grupos: GITP (Grupo Infectado Tratado com Praziquantel -25 animais), GITO (Grupo Infectado Tratado com Oxamniquine - 25 animais) e GINT (Grupo Infectado Não Tratados - 20 animais). GITP e GITO receberam a medicação de acordo com a seguinte dose: 400mg/Kg para Praziquantel e 200mg/kg para Oxamniquine .

Durante o quinto mês (dois meses depois do tratamento) coletou-se material dos três grupos. No sétimo mês os animais dos grupos GITP, GITO e GINT foram reinfectados. Após a reinfecção os animais destes grupos foram novamente subdivididos nos seguintes grupos:

GNTR – Grupo não Tratado Reinfectado

GTPR -Grupo Tratado com Praziquantel Reinfectado

GTOR -Grupo Tratado com Oxamniquinee Reinfectedado

Houve nova coleta de fígado durante o oitavo, nono e décimo mês (1, 2 e 3 meses após reinfecção respectivamente). Todos os animais foram sacrificados em câmara de CO₂, onde houve coleta do fígado. Os fragmentos de tecido hepático foram encaminhados para o setor de histotecnologia para realização de colorações de rotina.

Perdas Amostrais

Durante a infecção primária dez animais evoluíram a óbito. Após o tratamento cinco animais pertencentes ao GINT morreram. Entretanto com a reinfecção, os casos de óbitos voltaram a ocorrer em todos os grupos. Ao final do experimento totalizou-se 28 óbitos.

Histopatologia. Fragmentos de fígado dos animais (de todos os grupos) foram fixados em formol Millonig (pH 7.4). As secções incluídas em parafina (5µm de espessura) foram coradas com os corantes Hematoxilina e Eosina (HE), onde a hematoxilina atua como corante básico corando estruturas ácidas como o núcleo e a eosina como corante ácido, corando as estruturas básicas. A coloração Sírius-red foi utilizada para identificar fibras colágenas. As lâminas geradas foram analisadas em microscópio ótico de campo claro.

Imunofluorescência. Fragmentos de tecido hepático retirados durante a coleta de material foram imediatamente criopreservados em nitrogênio líquido e estocados em um freezer a -80⁰ C e posteriormente, seccionados em um criostato a -20⁰ C, fixados em acetona e hidratados em solução PBS pH 7.4. O anticorpo anti-laminina foi utilizado como anticorpo primário usando a diluição 1/100. O anticorpo secundário utilizado foi o antiIgG de coelho fluoresceinado (SIGMA) Entre as reações, os cortes foram lavados em solução de PBS pH 7.4. A visualização foi realizada através de um microscópio com luz ultravioleta.

Imunohistoquímica. A técnica foi realizada a partir de fragmentos de tecido hepático incluídos em parafina onde foram testados os seguintes anticorpos:

- ❖ Alfa actina de músculo liso- Para a marcação desta proteína os cortes parafinados foram submetidos a alta temperatura(97,6°C) para a recuperação antigênica com tampão citrato pH 6.0. O cromógeno utilizado foi 3,3-diamino benzidina (DAB) e a contracoloração foi feita com hematoxilina de Harris.O anticorpo anti- α actina de músculo liso foi utilizado como anticorpo primário obedecendo a diluição 1/200. Sendo assim, o anticorpo anti-alfaactina de músculo liso foi utilizado para a identificação de células com perfis de músculo liso, como as encontradas na parede dos vasos, os miofibroblastos, células estelares ativas e outros tipos celulares que exibem este perfil.
- ❖ CD31-O anticorpo anti-CD31(Santa Cruz) foi utilizado como anticorpo primário usando a diluição 1/800. Foi utilizado o mesmo protocolo da α -SMA.

Análise Morfométrica. Para quantificar a matriz conjuntiva presente nas secções obtidas de camundongos Swiss realizou-se a coloração Sirius-red. As lâminas coradas foram analisadas pelo sistema computadorizado de análise de imagens, constituído de uma videocâmara Olympus Q – Color 5, acoplada a um microscópio óptico Olympus (BX 51), com objetivas pancromáticas, que transmitiram as imagens a um computador utilizando o software Image-Pro-Plus .

Para a análise morfométrica utilizou-se o sistema de cor RGB. Dessa forma, os *pixels* de uma imagem podem ser interpretados como pontos luminosos, com intensidades de cor que podem ser decompostas em canais como: vermelho (R), verde (G) e azul (B). Se cada *pixel* projetar sua composição de cor em um sistema ortogonal tridimensional $R \times G \times B$, nesse espaço virtual, podem-se identificar agrupamentos de pontos que se relacionam a tonalidades de cores da imagem. A análise de agrupamentos de pontos é uma ferramenta computacional na qual se identifica pontos e os substitui pelos seus valores medianos (centróides), criando uma segmentação da imagem por intensidade de cor.

Para a realização da morfometria, os cortes foram medidos, utilizando objetiva de 400X para calcular o agrupamento de pontos relacionados à cor vermelha (Sirius-red), a qual foi expressa como pontos luminosos. Cada corte, contendo fibras colágenas, foi capturado pelo sistema de imagens, analisando diversos campos, sendo salvas imagens digitais. A quantidade da cor vermelha de cada imagem foi medida automaticamente por diferença colorimétrica. O analisador fornece ao sistema

o padrão de cor a ser quantificado e o sistema identifica a cor, preenche a área de interesse e processa a mensuração identificando agrupamentos de pontos que se relacionam com a tonalidade da cor selecionada.

Microscopia Eletrônica de Transmissão- Pequenos fragmentos de tecido hepático foram imediatamente fixados, por imersão, em uma solução de glutaraldeído a 4%+ tampão cacodilato a 0,2M (1:1), pH 7.4, por 1h a 4°C e pós-fixados em tetróxido de ósmio a 1% em tampão cacodilato a 0,3M (1:1) por 1h a 4°C. Os fragmentos foram lavados, rapidamente, em tampão cacodilato a 0,3M. Em seguida, desidratados em um gradiente de acetonas e embebidos em resina Polybed 812. Os blocos obtidos após polimerização da resina foram seccionados; os cortes ultrafinos foram coletados, montados em grades de cobre e contrastados com citrato de chumbo e acetato de uranila e examinados em um microscópio Zeiss EM-109.

Diagnóstico Parasitológico- O diagnóstico da infecção por *S. mansoni* foi feito com base em métodos coproscópicos, onde a análise qualitativa ocorre através da observação microscópica do ovo do parasito nas fezes do animal. Esta técnica consiste em transferência de pequenas porções de fezes para lâminas de vidro cobertas por uma lamínula, de modo a permitir a obtenção de esfregaço fecal.

Diâmetro do Granuloma- Os diâmetros dos 10 maiores granulomas em cada seção, foram medidos e o diâmetro médio calculado para cada grupo de camundongos. Somente foram medidos os granulomas que apresentavam em seu núcleo um ovo de *S. mansoni*, que comprovava a condição de que o corte estava próximo de seu diâmetro máximo. Granulomas adjacentes a áreas de necrose de hepatócitos foram excluídos da avaliação.

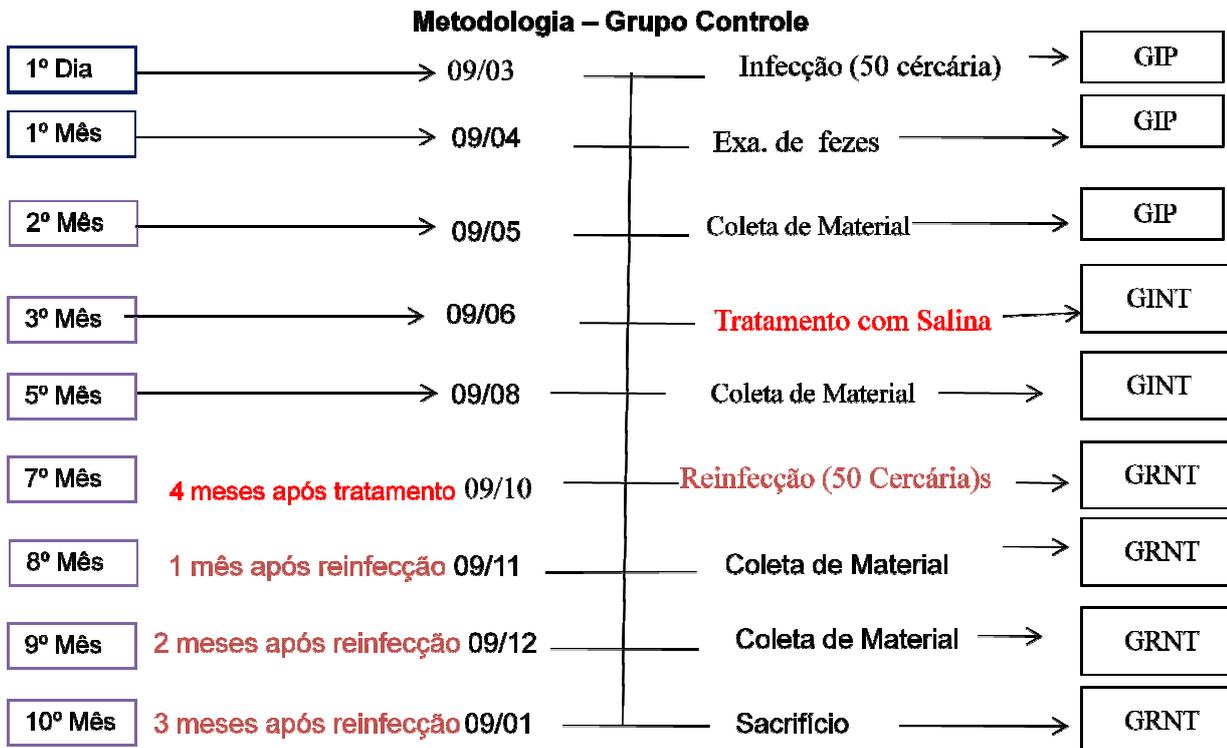
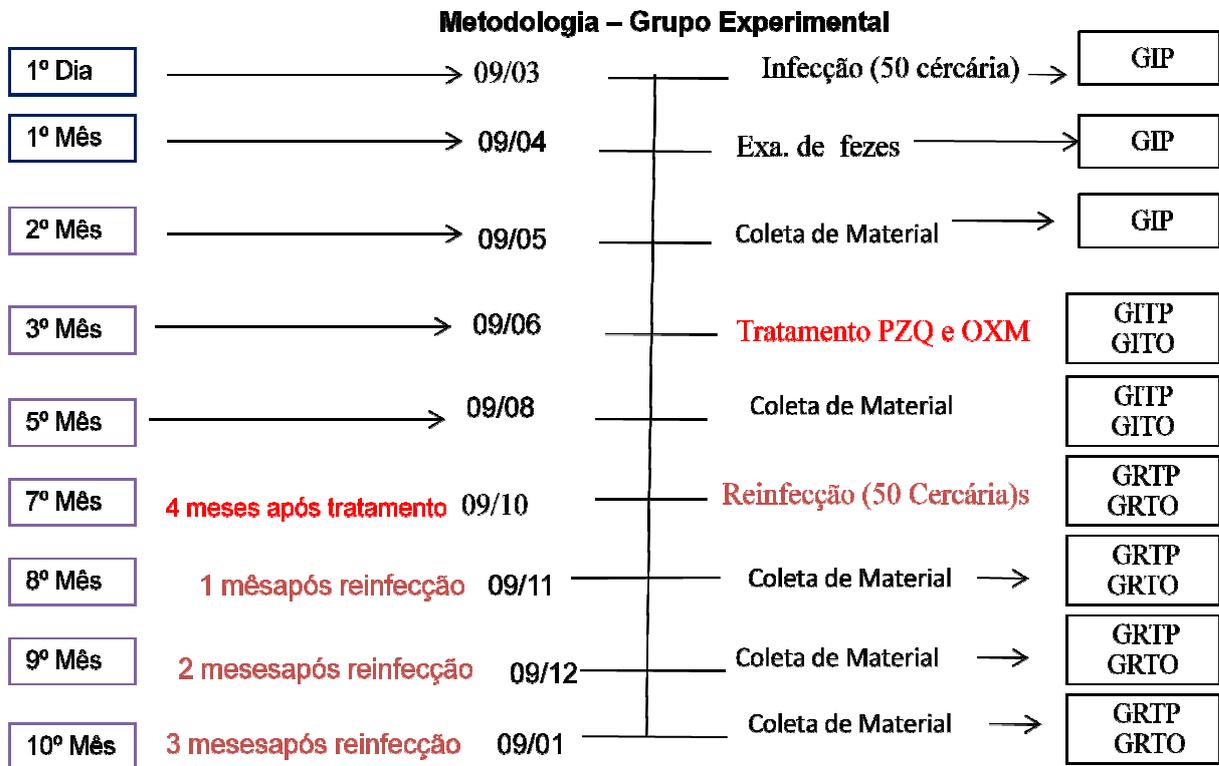
5.2 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

- O projeto foi submetido e analisado pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz. (CEUA-FIOCRUZ).

5.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para processamento dos dados, foi utilizado o programa GrafPad InStat2 e Bioestat 5.0 (Sociedade Civil Mimirauá/MTC/ Imprensa Oficial do Estado do Pará 2005). Realizou-se uma análise descritiva dos dados, expondo os resultados em gráficos. As medidas como: média e desvio padrão foram utilizadas. Para comparar as variáveis quantitativas dos grupos estudados utilizou-se o teste não paramétrico KruskalWallis . Dois ou mais grupos foram comparados. Os resultados foram considerados significantes quando apresentaram $p < 0.05$.

5.4 DESENHO EXPERIMENTAL



6. RESULTADOS

Análise Histológica

6.1 HE

Para avaliar o aspecto geral do tecido hepático e evolução da fibrose, utilizou-se a coloração Hematoxilina e Eosina (HE), pois esta técnica permite avaliar com maior precisão a citoarquitetura do órgão.

GIP - O estudo histológico do parênquima hepático revelou que durante a infecção primária os animais demonstravam reações granulomatosas com padrão típico da esquistossomose aguda. As reações granulomatosas iniciais frequentemente se apresentavam como pseudos-granulomas, formados pelo acúmulo de células inflamatórias. Neste período os granulomas apresentaram-se pouco delimitados com depósitos irregulares de fibras colágenas, exibindo distribuição concêntrica. Uma característica marcante desse grupo foi a intensa resposta inflamatória em torno dos ovos do verme. Também nesta fase foi registrada a presença de reações com predominância de células mononucleares, eosinófilos e neutrófilos, em todos os animais estudados (Figura 1A).

GITP & GITO - No grupo dos animais tratados com Praziquantel ou com Oxamniquine, não houve diferenças histológicas marcantes. Independente do tipo de tratamento, houve nítida redução do infiltrado inflamatório e os granulomas periovulares eram menores e mais circunscritos quando comparados aos grupos avaliados. Observamos ainda reações cicatriciais contendo ovos calcificados no seu interior. As características histológicas avaliadas nos grupos que receberam tratamento foram comuns aos dois tipos de drogas utilizadas (Figura 1B e C).

GINT - No grupo em que não houve tratamento existia grande quantidade de reações granulomatosas, reações estas que estavam dispostas de forma confluyente, exibindo vários graus de desenvolvimento. As fibras colágenas se apresentavam de forma irregular e frouxa por quase toda extensão da reação. Os granulomas produtivos apresentaram macrófagos epitelióides, células gigantes e poucos polimorfonucleares (Figura 1D).

GTOR e GTPR- Os grupos reinfectedos foram avaliados em três estágios: um, dois e três meses pós reinfecção. Durante o primeiro mês pós reinfecção os animais voltaram a apresentar um parênquima hepático com infiltrado inflamatório e reações granulomatosas em diferentes graus de desenvolvimento (Figura 1 F e E). No segundo mês as reações granulomatosas se encontravam no estágio exudativo e exudativo-produtivo. Era intensa a produção de matriz colágena nesses animais e as fibras colágenas apresentavam-se mais espessas e compactas, delimitando bem a região afetada. (Figura 2 A e B). Apesar do processo de hepatite reacional difusa durante o segundo mês de reinfecção, a partir do terceiro mês os níveis de células inflamatórias e fibras colágenas regrediam de forma gradual. Neste estágio com a maturação do granuloma, as fibras colágenas alteraram a configuração da malha para uma disposição concêntrica e densa. Durante o estágio de reinfecção verificamos que em algumas regiões do tecido hepático era possível observar pigmentos enegrecidos (pigmentos esquistosomóticos), que são o resultado da digestão enzimática da hemoglobina no tubo digestivo do verme do *Schistosoma mansoni* (Figura 2 D e E).

GNTR- Os animais não tratados durante o primeiro mês de reinfecção também exibiam células inflamatórias e granulomas mistos. No segundo mês este grupo apresentou fibrose periportal e a presença de pigmentos esquistosomóticos. (Figura 2 C). E durante o terceiro mês foi possível observar parênquima hepático com fibrose periportal e presença de algumas células inflamatórias (Figura 2 F).

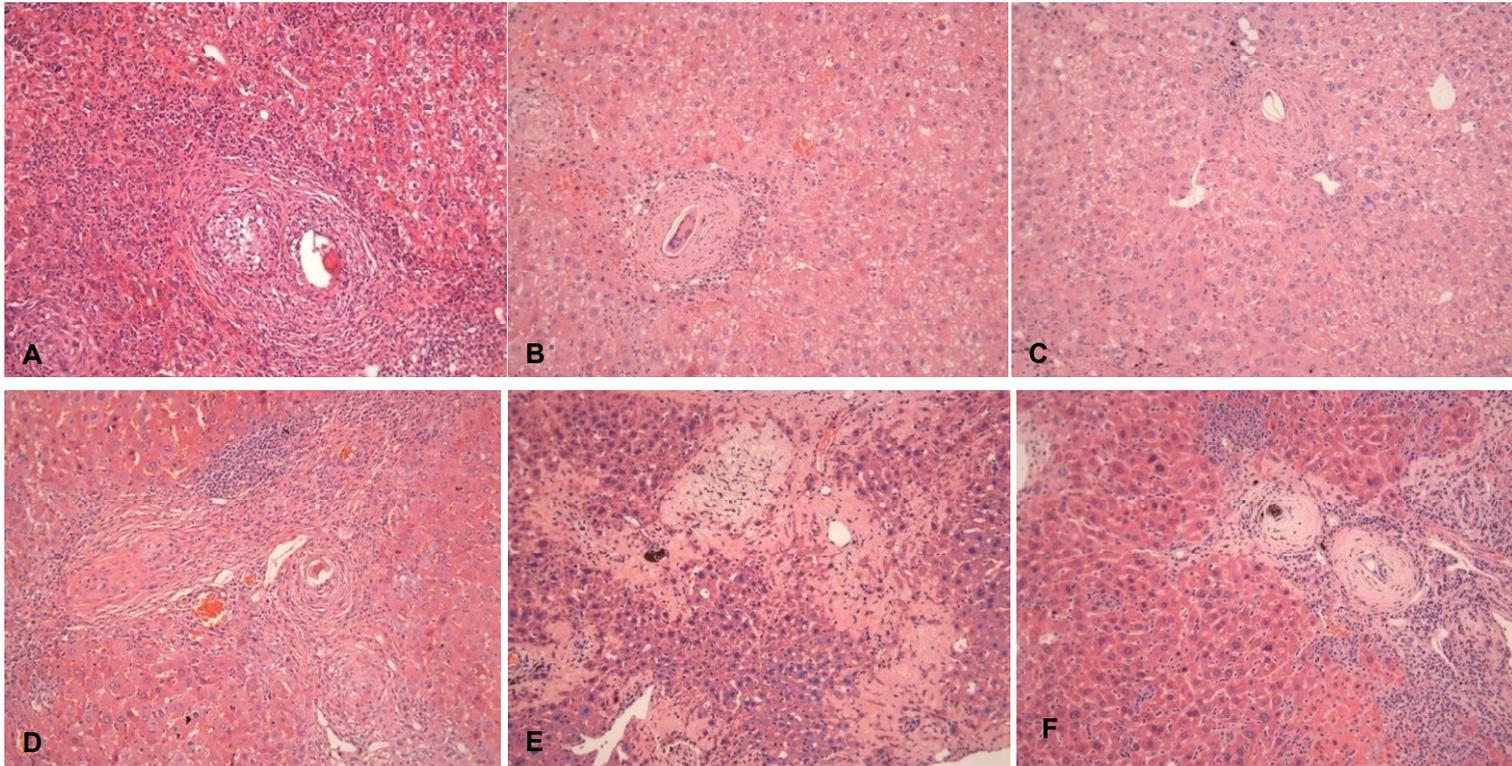


Figura 1-Aspectos histológicos do tecido hepático dos animais pertencentes aos grupos GIP, GITP, GITO, GTPR e GTORA- GIP Imagem reproduz um fragmento de tecido hepático de camundongo durante a infecção primária. É possível observar a presença de muitas células inflamatórias em torno do ovo do verme. B – GITP Ilustra o parênquima hepático de camundongo pós tratamento com Praziquantel. Granulomas em estágio de regressão. C - GITO Animal após tratamento com Oxamniquine. D - GINT Animal infectado não tratado. Granulomas associam-se e exibem fibras colágenas mais espessas do que nos animais tratados. E - GTOR- Parênquima hepático de animais no primeiro mês após a reinfeção, previamente tratados com Oxamniquine. Nestas gravuras é possível perceber células inflamatórias em torno do ovo, como também a deposição de colágeno. F - GTPR Animal no primeiro mês de reinfeção, previamente tratado com Praziquantel. Coloração Hematoxilina/Eosina 400x.

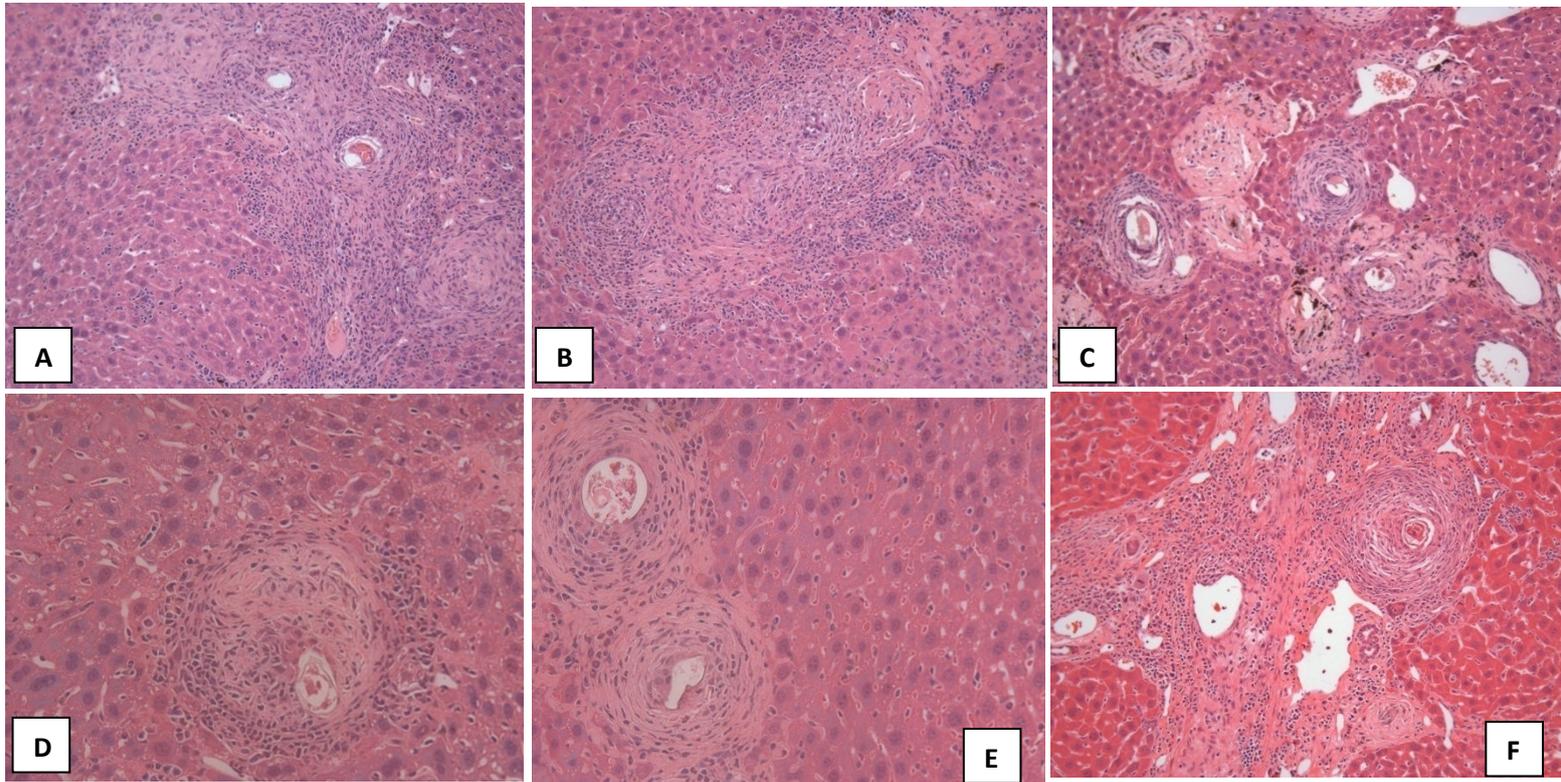


Figura 2- Aspectos histológicos do parênquima hepático dos animais pertencentes aos grupos: GTPR, GTOR. A - GTOR Dois meses de reinfeção. Granulomas mistos. B - GTPR Animais com dois meses de reinfeção. Granulomas acompanhados de células inflamatórias. C- GNTR Animal não tratado dois meses após reinfeção. D- GTPR Três meses após reinfeção. Resquícios de ovo na região central. E- GTOR Três meses após reinfeção. Ovos na região central. F - GNTR Não tratado após três meses da reinfeção. Neste caso é possível notar a fibrose periportal. Hematoxilina/Eosina 400x.

6.2 Sírius-red

Para análise mais detalhada da deposição e organização das fibras colágenas nos diferentes estágios da doença foi utilizado o método de Picrosírius, que se baseia na característica do corante Sírius-red ser fortemente ácido, devido aos seis grupamentos sulfônicos que contém e ao fato de reagirem com os grupamentos amínicos das moléculas de lisina presentes no colágeno. Sendo assim, esta técnica marca especificamente as fibras colágenas de vermelho.

GIP – O estudo dos cortes histológicos do tecido hepático revelou que o grupo relacionado com a infecção primária apresentava grandes áreas coradas pelo Sírius-Red evidenciando delgadas fibras colágenas, comprometendo desta forma uma parte importante do parênquima hepático (Fig. 3 A).

GTP & GITO- Como o tratamento específico (Praziquantel e Oxamniquine) os níveis de deposição colágena caíram como já era esperado. Neste período áreas restritas e focais apresentaram coloração vermelha (Fig. 3 B e C).

GINT - O grupo infectado não tratado apresentou maior quantidade de granulomas apresentando fibras colágenas marcadas. Nesta fase em alguns animais era possível notar a disposição em conjuntos dos granulomas caracterizando assim a fibrose periportal (Fig 3D).

GTPR & GTOR - Com o advento da reinfecção, os níveis de colágeno voltaram a subir a partir do primeiro mês apresentando elevados níveis de marcação (Fig-3E e F), e durante o segundo mês este aumento chegou a níveis de coloração superior aos da infecção primária. Neste grupo os granulomas as fibras colágenas apresentaram-se mais espessas e compactas, delimitando com nitidez a área do granuloma periportal (Fig-4 A e B). Entretanto o grau de deposição de colágeno começou a regredir a partir do terceiro mês pós reinfecção (Fig-4 D e E).

GNTR - No grupo controle não tratado a coloração com Sírius-Red demonstrou que houve uma variação no padrão de coloração, onde era possível observar áreas de coloração intensa e áreas com coloração mais branda. Durante o primeiro mês este grupo apresentou parênquima com fibrose periportal com

coloração intensa. Este padrão se manteve no segundo mês (Fig-4C). E no terceiro mês de reinfecção o parênquima hepático apresentava fibrose com fibras colágenas mistas (Fig4-F).

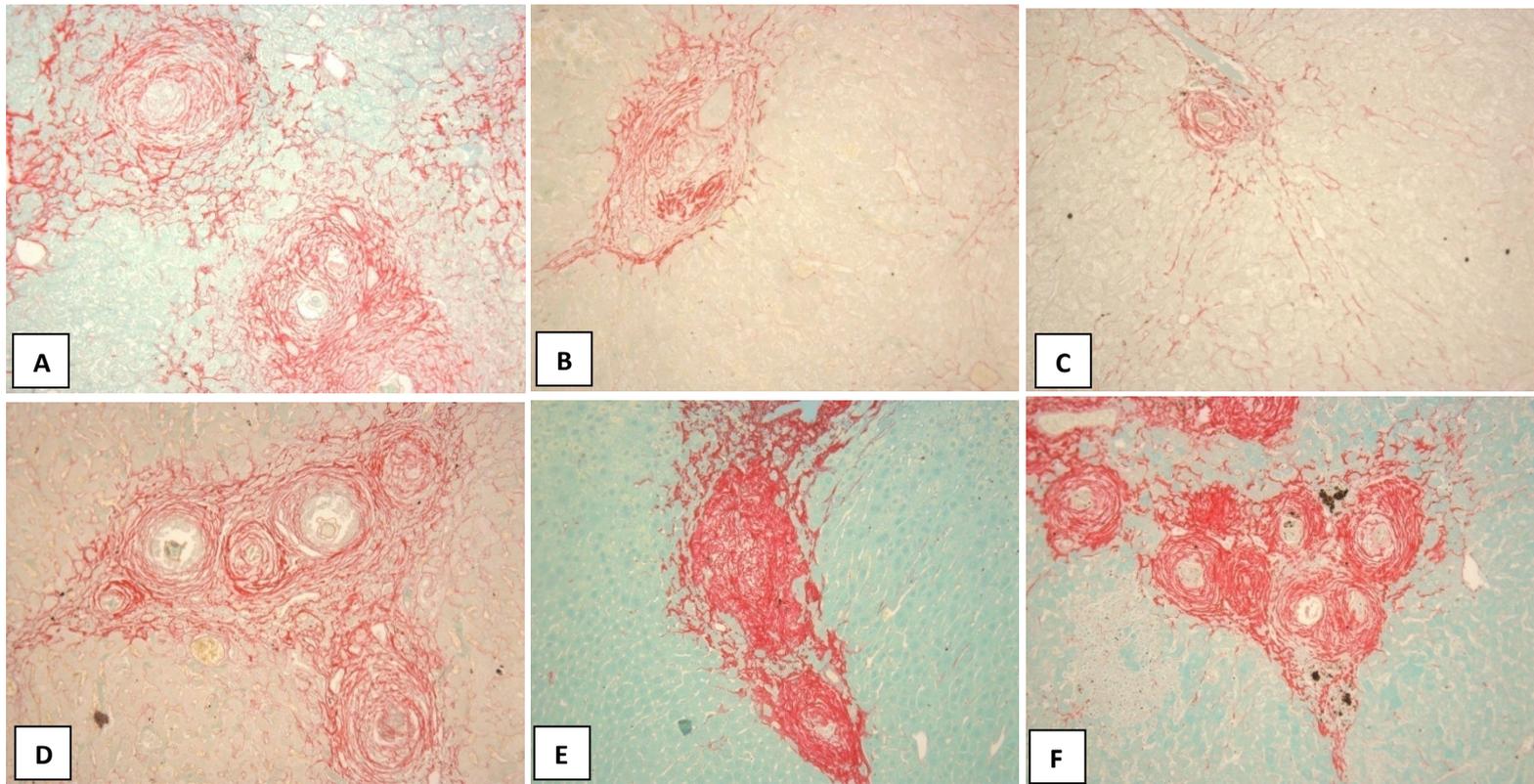


Figura 3 – Análise histológica do parênquima hepático corados pela técnica de Síriu-red. Animais durante as seguintes fases: Infecção primária, Depois do tratamento e um mês após reinfecção. A- GIP Padrão histológico típico da esquistossomose, apresentando diversos granulomas no parênquima hepático. B - GITP Granulomas isolados em fase de regressão. C- GITOParênquima hepático com poucos granulomas. D- GINT Animais não tratado. Fibrose periportal. E - GTOR Um mês após reinfecção. Granulomas apresentando fibras colágenas mais espessas. F- GTPR Um mês após reinfecção, pigmentos esquistossomóticos. Síriu-red 400x.

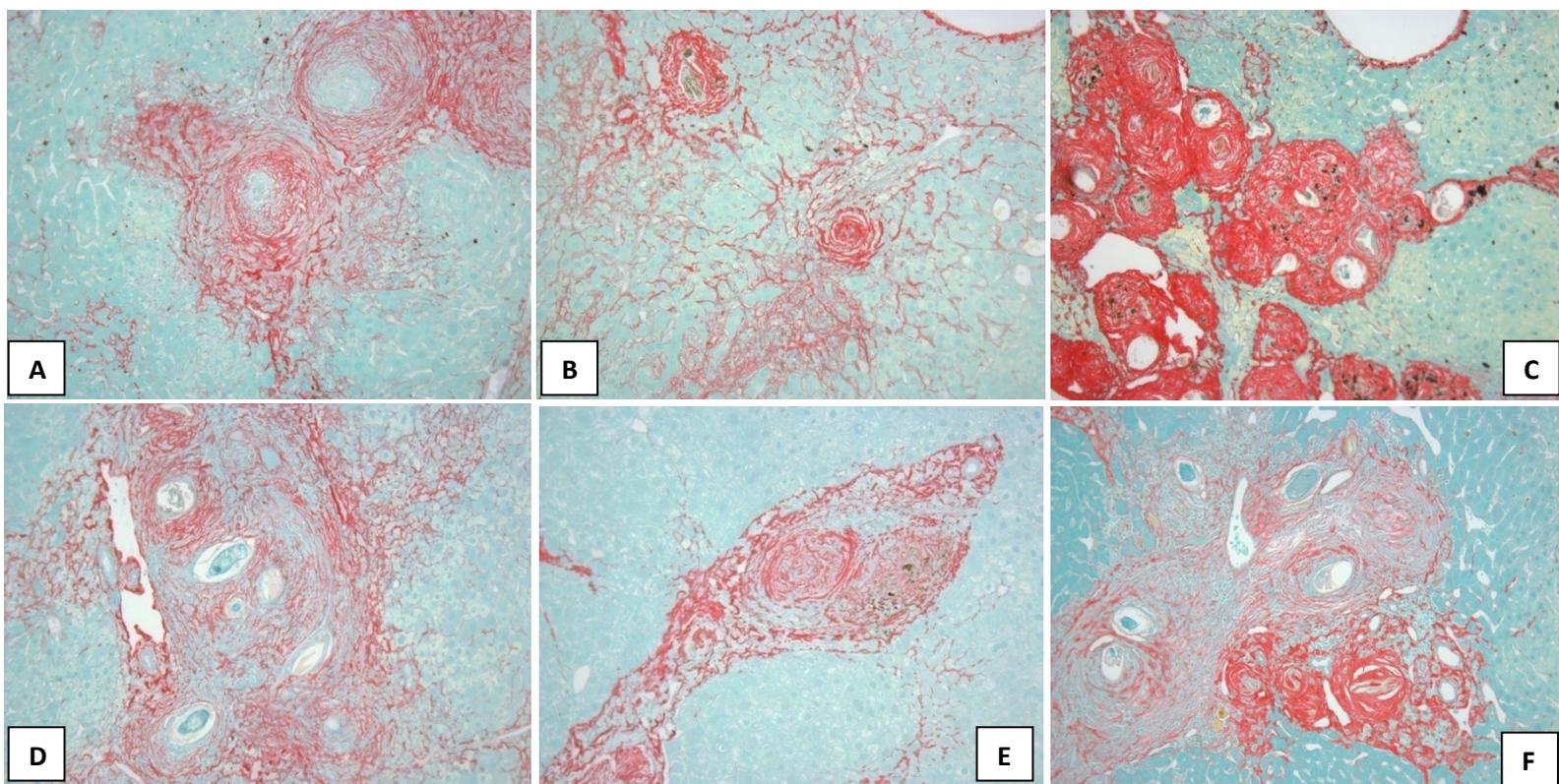


Figura 4 - Ilustração do parênquima hepático corados pela técnica de Sírius-red animais durante as seguintes fases: Dois e três meses após reinfeção. A - GTOR- Dois meses após reinfeção. Granulomas contendo fibras colágenas em vários níveis de amadurecimento. B-GTPR- Predomínio de fibras colágenas delgadas. C - GNTR Dois meses após reinfeção. Fibrose periportal intensa. Fibras colágenas apresentando coloração mais evidente devido ao espessamento das fibras. Pigmentos esquistossomóticos. D - GTOR Três meses de reinfeção. Fibrose periportal. Granulomas apresentando fibras colágenas de densidades diferentes. E - GTPR Granulomas bem delimitados. F- GNTR Após três meses de reinfeção. Fibrose periportal apresentando fibras colágenas mistas (delgadas e densas). Resquícios de ovo. Sírius-red 400x.

6.3 Imunohistoquímica – Alfa actina

Foram consideradas positivas as regiões que apresentaram coloração castanho dourado. A análise das células positivamente marcadas foi realizada por microscopia de luz com aumento de 400x.

2.1 Alfa-actina de músculo liso

Alfa-actina de músculo liso é uma proteína que está relacionada com a movimentação celular e muscular. Está presente no citoplasma das células eucarióticas sob a forma de filamentos. O anticorpo para alfa-actina de músculo liso (α -SMA) foi utilizado com o intuito de identificar e avaliar células miofibroblásticas e células que apresentem este perfil fenotípico, como células estreladas e fibroblastos.

GIP- Apresentaram células alfa-actina positivas na região granulomatosa, sobretudo na periferia (Fig-5A).

GITP & GITO – Após o tratamento houve uma expressiva diminuição de células marcadas positivamente para α -SMA. Este padrão foi prevalente nos dois tipos de tratamento (Fig-5 B e C).

GINT- Mesmo nos animais que não receberam tratamento houve pouca marcação positiva.

GTPR & GTOR – No grupo reinfestado marcação se mostrou variada conforme o tempo de reinfecção. Sendo que, durante o primeiro mês de reinfecção a região granulomatosa voltou a exibir um aumento no número de células marcadas. Estas células marcadas positivamente podiam ser encontradas em toda região granulomatosa e na região sinusoidal (Fig 5- E e F). Entretanto, no segundo mês houve uma diminuição da marcação tanto no parênquima hepático como no granuloma. (Fig 6-A e B). No terceiro mês este padrão permaneceu predominante (Fig 6 -D e E).

GNTR– Nos animais pertencentes ao primeiro mês pós reinfecção, somente a região do granuloma encontrava-se marcada. (Fig-5F) Durante o segundo mês a região sinusoidal e periferia do granuloma apresentavam células positivas. (Fig 6- C) E no terceiro mês a região sinusoidal encontra-se bastante

marcada, porém a região granulomatosa exibia poucas células marcadas (Fig6-F).

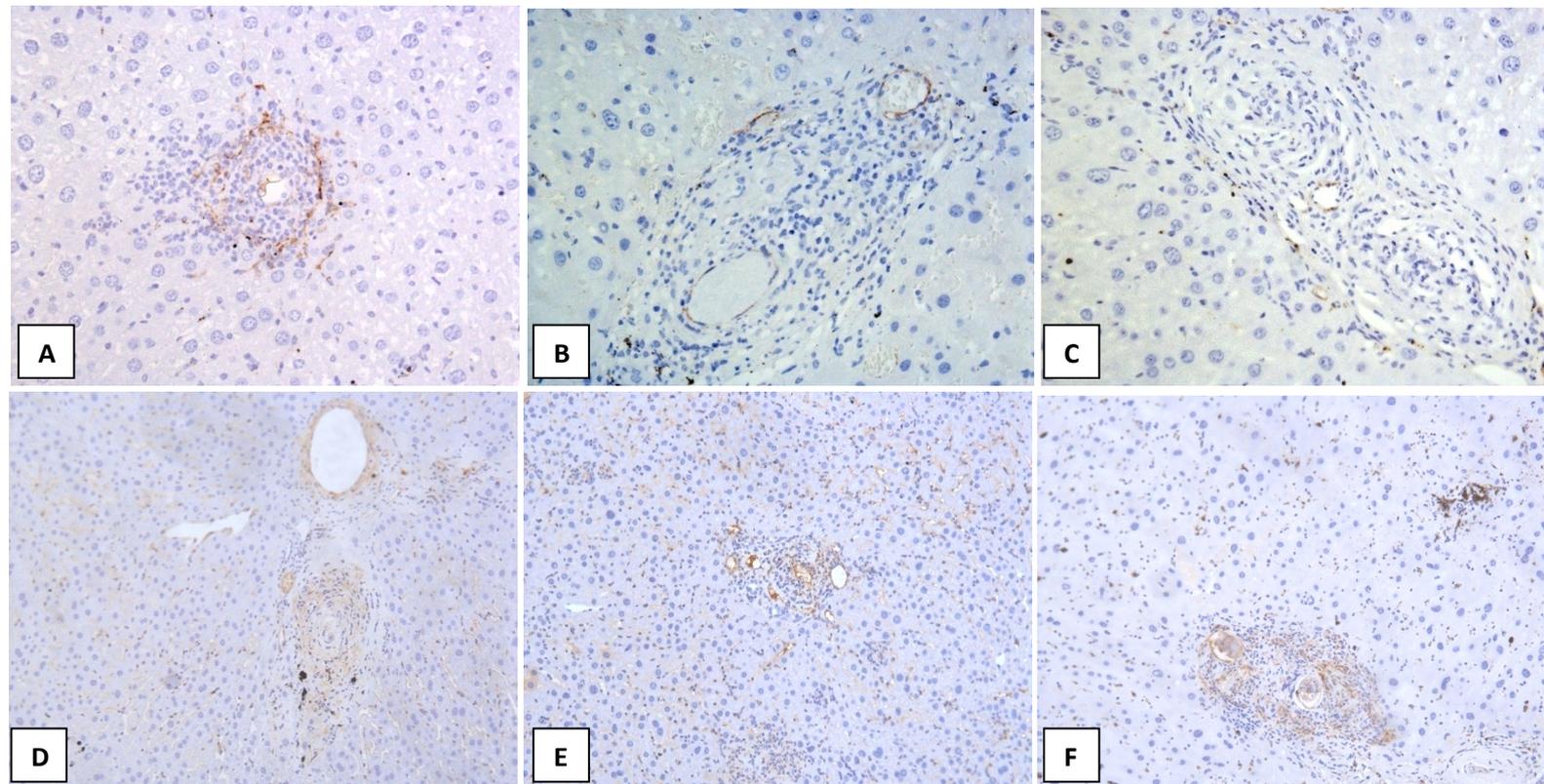


Figura 5 - Ilustração do tecido hepático submetido a imunomarcação da α -SMA em animais durante as seguintes fases: Antes do Tratamento, Depois do tratamento e um mês após reinfeção. A- GIP Granuloma inicial, evidenciando marcação positiva mais evidente na periferia da reação. Notar resíduo de ovo. B - GITP Poucas células marcadas. C – GITO Idem. D GTOR –Um mês após reinfeção. Maior população de células marcadas, sobretudo nas proximidades da reação granulomatosa. Pigmentos esquistossomóticos. E- GTPR Um mês de reinfeção. Notar marcação sinisoidal. F – GNTR Um mês de reinfeção. Marcação positiva em toda região granulomatosa. Pigmentos esquistossomóticos. Imunohistoquímica α -SMA 400x.

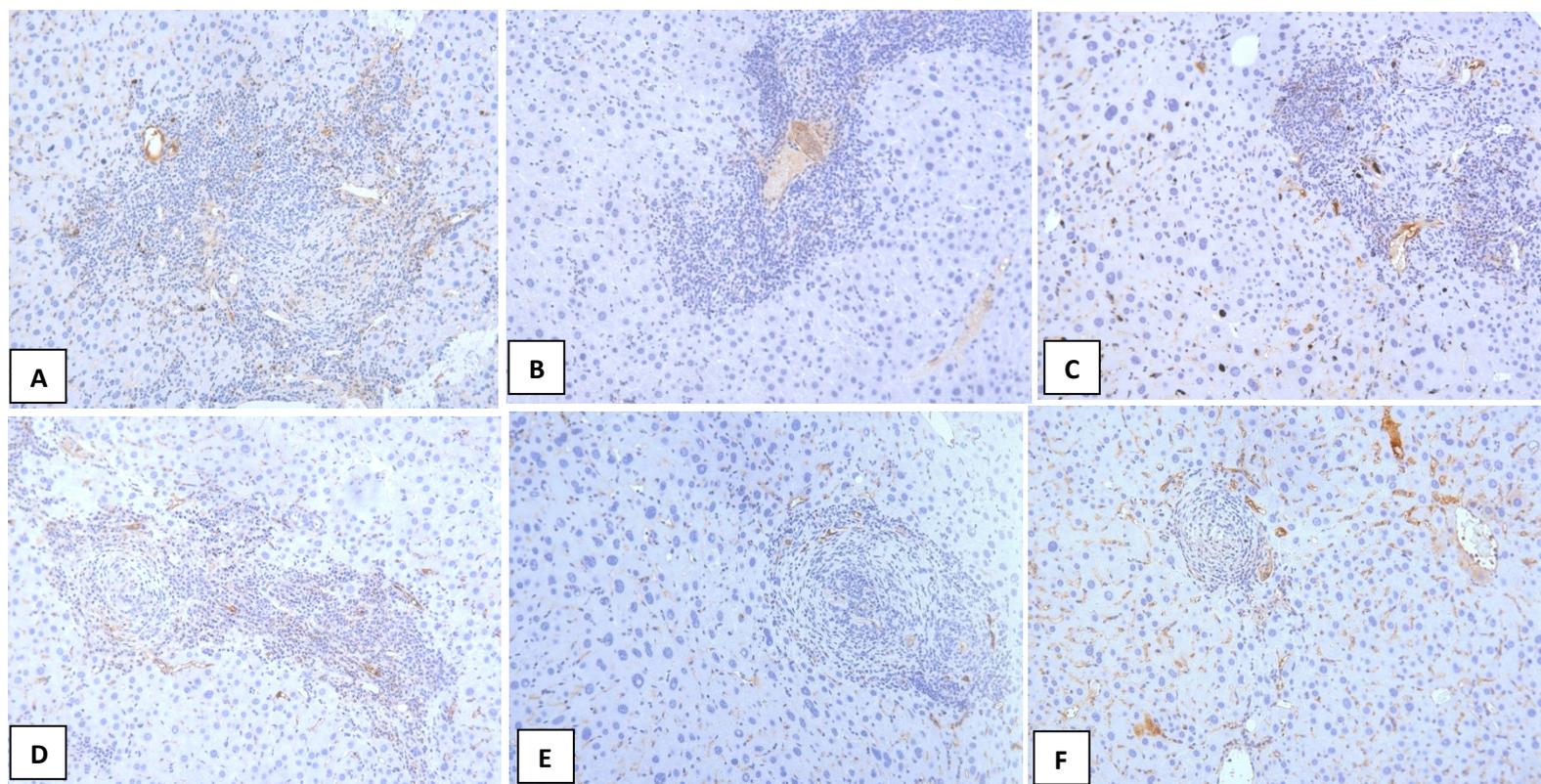


Figura. 6- Ilustração do tecido hepático submetido à imunomarcção da α -SMA em animais durante as seguintes fases: Dois e três meses após reinfeção. A - GTOR Dois meses após reinfeção. Maior quantidade de células exibindo marcação positiva. B - GTPR Dois meses após reinfeção. Poucas células marcadas. C- GNTR Dois meses após reinfeção .Poucas células marcadas. Pigmentos esquistossomóticos. D-GTOR Três meses após reinfeção. Marcação positiva nas proximidades e na periferia do granuloma. E - GTPR Três meses após reinfeção. Poucas células marcadas na região periférica. F – GNTR Três meses após reinfeção. Região sinusoidal e periferia do granuloma exibindo marcação positiva. Imunohistoquímica α -SMA 400x.

6.4 Imunohistoquímica - CD31

O CD-31 é uma proteína integral presente na membrana relacionada com adesão celular. Encontra-se constitutivamente expressa em células endoteliais, porém é fracamente expressa em leucócitos periféricos e plaquetas. Este anticorpo foi utilizado com o objetivo de marcar células endoteliais hepáticas. Sendo assim, este foi utilizado com o objetivo de identificar células endoteliais presentes na região granulomatosa e no parênquima hepático.

GIP- Este grupo apresentou marcação moderada, e um pouco difusa na região granulomatosa (Fig-7A).

GITP & GITO – Nos grupos tratados os sinusóides próximos ao granuloma encontravam-se bem marcados. No entanto na região granulomatosa houve marcação positiva em toda região granulomatosa, tanto na zona central como na medial e periférica (Fig7-B e C).

GINT- Nos animais que não receberam tratamento a marcação positiva encontrava-se melhor evidenciada na região periférica do granuloma.

GTPR & GTOR – No grupo reinfestado o padrão de marcação foi variando conforme o tempo de reinfecção. Sendo que durante o primeiro mês foi possível observar marcação em todas as áreas do granuloma (Fig7-D e E), entretanto no segundo mês a marcação se limitava quase totalmente a região periférica (Fig8- A e B), padrão este que permaneceu durante o terceiro mês de reinfecção (Fig 8- D e E).

GNTR - Neste grupo o padrão de marcação foi semelhante durante primeiro(Fig7-F), segundo(Fig8-C) e terceiro(Fig8-F) mês pós reinfecção. A marcação se apresentava mais evidente na região periférica ao granuloma e na região sinusoidal.

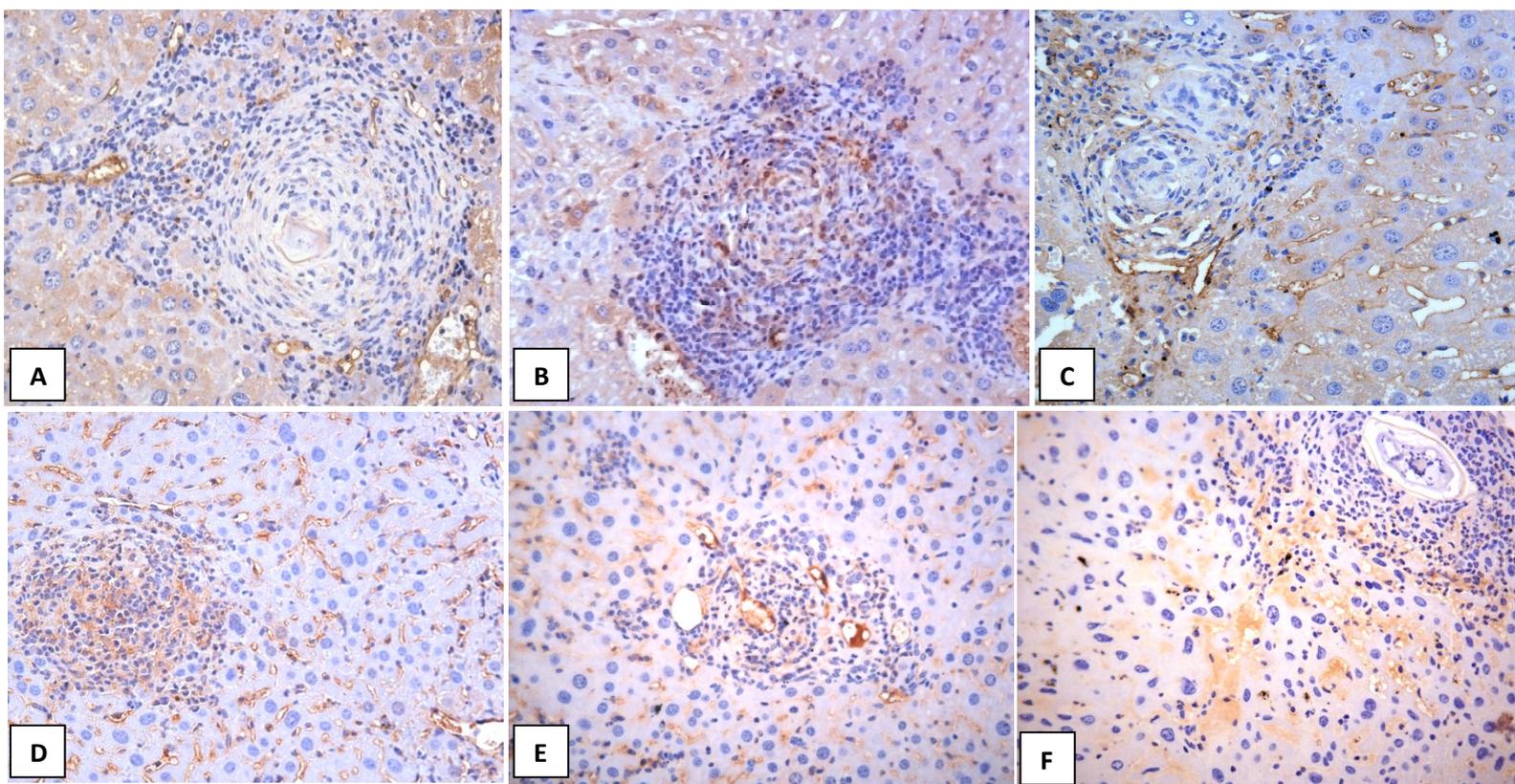


Figura 7 - Ilustração do tecido hepático submetido a imunomarcação do CD31 em animais durante as seguintes fases: Antes do tratamento, depois do tratamento e um mês após reinfecção. A GIP - Granuloma apresentado marcação positiva nas regiões medial e periférica. B- GITP Dois meses após Tratamento. Marcação positiva nas regiões central, medial e periférica do granuloma. C GITO - Marcação intensa na região periférica. D - GTOR Um mês após reinfecção. Células exibindo marcação positiva em todas as regiões do granuloma (central,medial e periférica). Observar a marcação sinusoidal. E-GTPR Um mês após reinfecção. Marcação positiva em toda região granulomatosa. F- GNTR Um mês após reinfecção. Células exibindo marcação positiva nas regiões medial e periférica. Imunohistoquímica CD 31 400x.

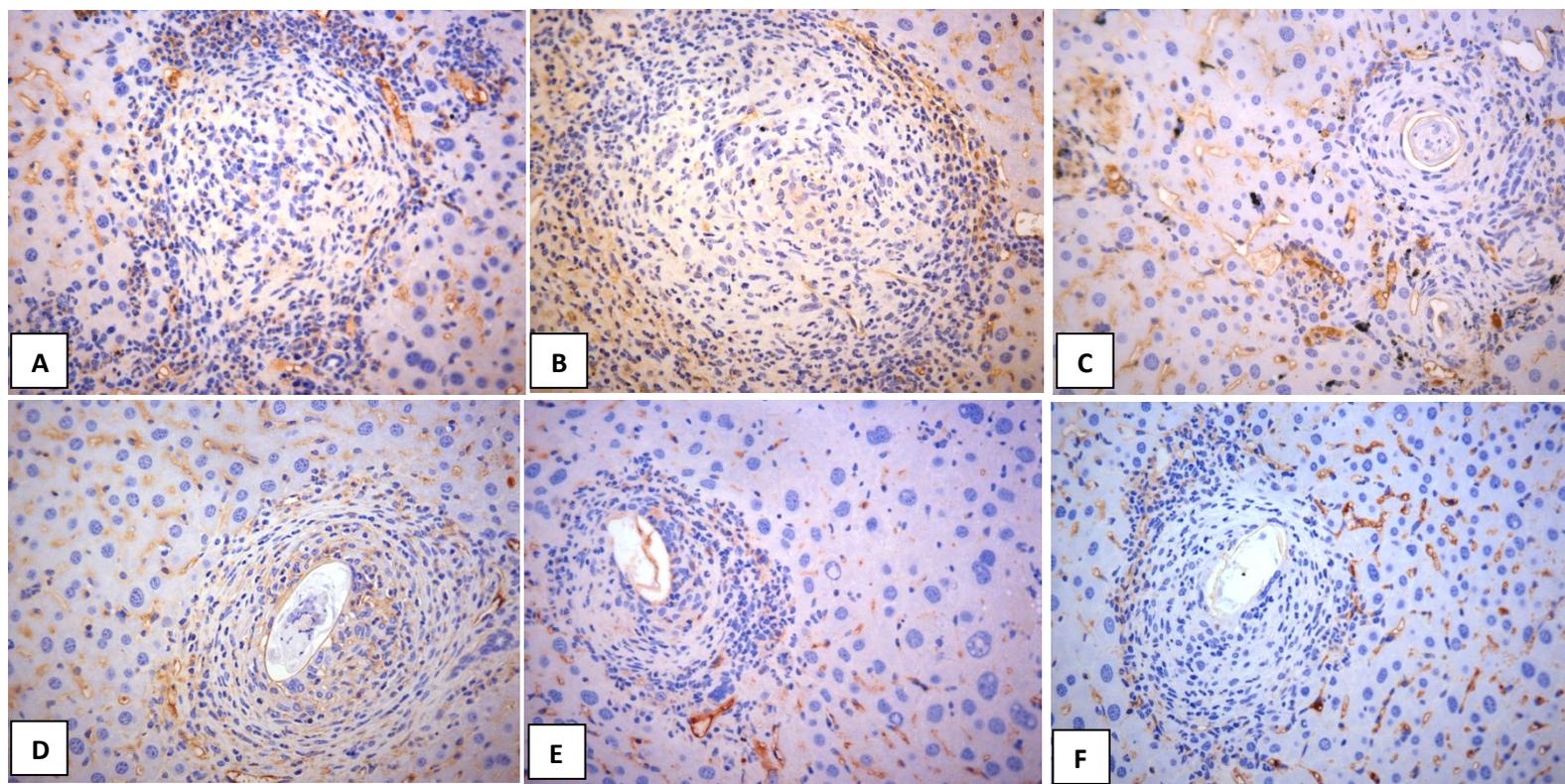


Figura 8 - Ilustração do parênquima hepático submetido e imunomarcção do CD31 emanimais durante as seguintes fases: Dois e três meses após reinfeção.A - GTOR- Dois meses após reinfeção. Região periférica e sinusoidal fortemente marcada. B - GTPR Dois meses após reinfeção. Idem. C - GNTR Dois meses após reinfeção. Região sinusoidal exibindo marcação positiva. Células exibindo marcação positiva nas regiões sinusoidal e na periferia da região granulomatosa. D - GTOR Três meses após reinfeção. Células exibindo marcação positiva em toda região granulomatosa. E – GTPR Três meses após reinfeção. Marcação positiva nas regiões periféricas e sinusoidais. F GNTR - Três meses pós reinfeção. Células exibindo marcação positiva nas regiões sinusoidal e periférica . Imunohistoquímica CD 31- 400x.

6.5 Imunofluorescência

A imunofluorescência para Laminina foi feita com o objetivo de marcar a lâmina basal da região granulomatosa. As secções teciduais foram submetidas à técnica indireta para a marcação do anticorpo anti-laminina, a qual é uma proteína de matriz que auxilia na ligação cruzada dos componentes da lâmina basal. Possui estrutura heterotrimérica em forma de cruz e está relacionada com a ligação de vários tipos de colágeno. Assim, tais proteínas são importantes para a organização dos componentes da matriz extracelular e para a regulação da adesão célula matriz e da migração celular. Foram consideradas positivas todas as áreas marcadas pela cor verde maçã brilhante.

GIP - A marcação obedeceu a um padrão homogêneo neste grupo, onde foi possível observar uma positividade intensa na região periférica dos granulomas analisados (Fig9-A).

GITP & GITO - Este grupo também seguiram o mesmo padrão de marcação do grupo anterior, a reatividade era melhor observada na periferia da região granulomatosa (Fig9-B e C).

GINT – Neste grupo somente a região periférica apresentou marcação positiva.

GTOR & GTPR - Neste grupo a fibrose periportal era bem evidenciada e a marcação positiva se distribuía de forma aleatória na região granulomatosa, embora a maior parte da marcação encontrava-se na região periférica. Este padrão de marcação foi prevalente no primeiro (Fig9-D e E), segundo (Fig10-A e B) e terceiro mês pós reinfecção (Fig10-D e E).

GNTR- No primeiro mês após a reinfecção os animais exibiam marcação positiva em toda região granulomatosa (Fig9F-). Durante o segundo (Fig10-C) e terceiro mês (Fig10-F) a marcação positiva encontrava-se concentrada na região periférica.

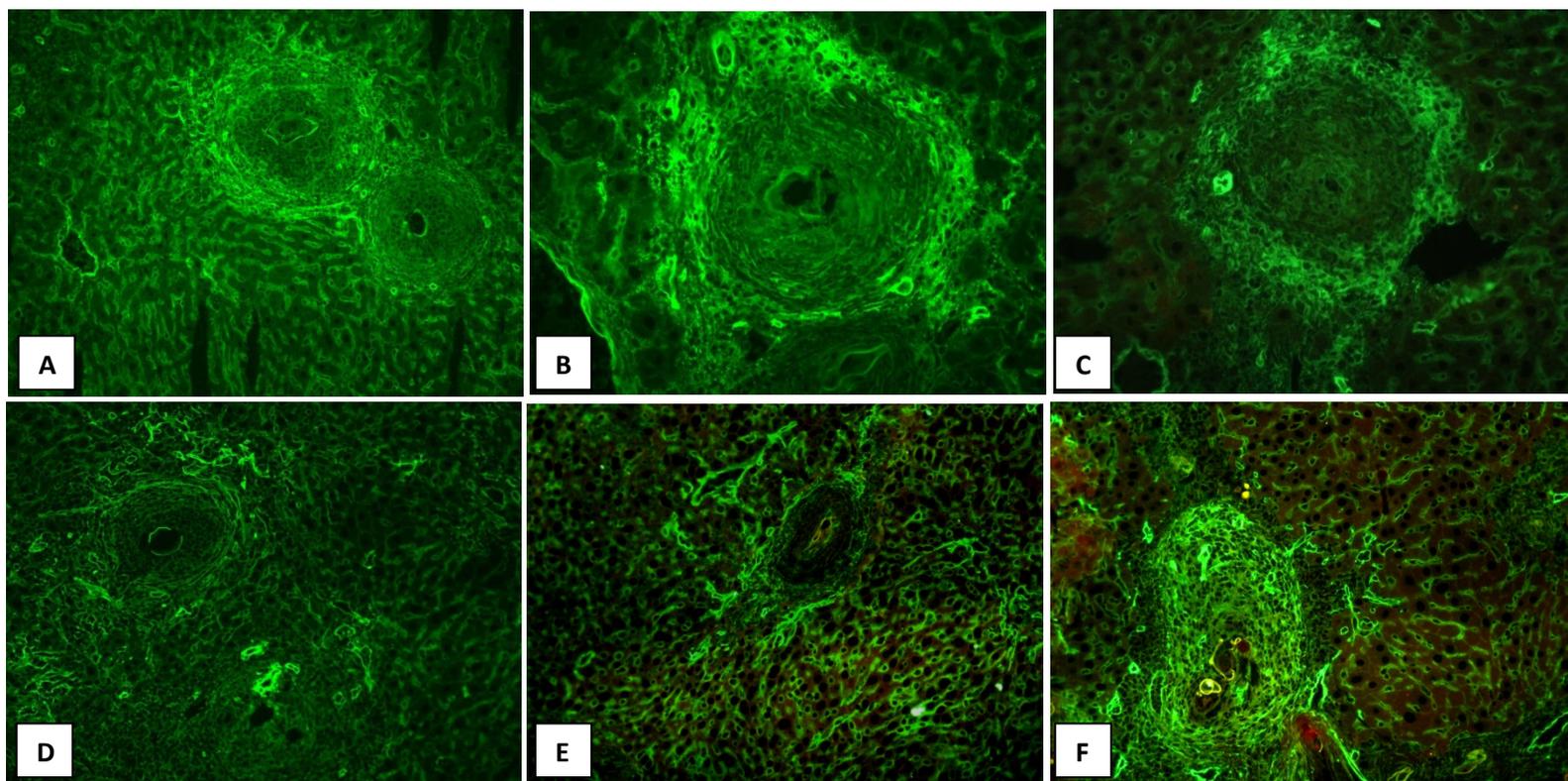


Figura 9 – Ilustração do tecido hepático submetidos a técnica de Imunofluorescência em animais durante as seguintes fases: Infecção primária, depois do tratamento e um mês após reinfeção A GIP Células exibindo marcação positiva nas regiões sinusoidal e periférica. B-GITO Parênquima hepático exibindo marcação positiva predominantemente na periferia C- GTP Idem. D-GTOR Um mês após reinfeção. Parênquima hepático exibindo marcação positiva na região sinusoidal e na periferia do granuloma. E – GTPR Um mês após reinfeção. Região sinusoidal fortemente marcada. F- GNTR Granuloma exibindo marcação positiva nas regiões medial e periférica. Imunofluorescência- Laminina 400x.

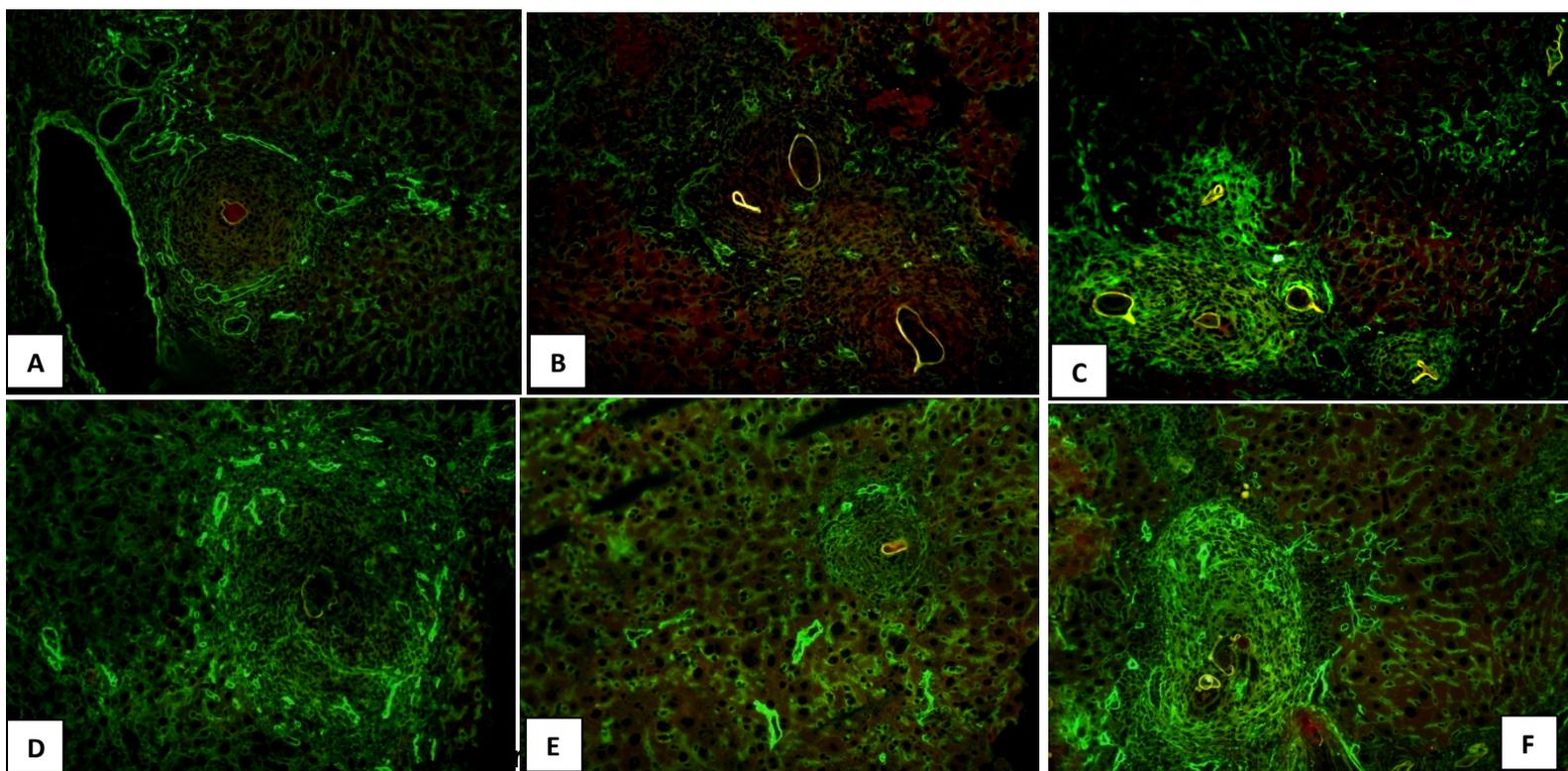


Figura 10 – Ilustração do tecido hepático submetido à técnica de imunofluorescência em animais durante as seguintes fases: Dois e três meses após reinfeção.A- GTPR Dois meses após reinfeção. Parênquima hepático exibindo marcação positiva na região periférica do granuloma. B- GTPR Dois meses após reinfeção. Poucas células marcadas C – GNTR- Dois meses após reinfeção. Parênquima hepático exibindo marcação positiva na em toda região do granuloma. D- GTPR Três meses após reinfeção. Parênquima hepático exibindo marcação positiva na região periférica do granuloma. E - GTPR Três meses após reinfeção. Região periférica e sinusoidal marcada F - GNTR Três meses após reinfeção. Parênquima hepático exibindo marcação positiva na região granulomatosa. Imunohistoquímica Laminina 400x.

Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) foi realizada para melhor entendimento das condições ultraestruturais presentes processo fibrótico induzido pelo *Schistosoma mansoni*.

GIP- A eletromicrografia destes animais revelou que nesta fase havia a presença de feixes de fibras colágenas no parênquima hepático, além da presença decélulas inflamatórias(Fig11-A).

GITP & GITO- Os animais que receberam tratamento exibiram a presença de fibras colágenas, entretanto neste grupo a quantidade de fibras colágenas encontrava-se bastante reduzida. Células com fenótipo de miofibroblastos também podiam ser observados, além da presença de algumas células inflamatórias como eosinófilos (Fig11 B e C).

GINT- Este grupo exibiu uma grande deposição de tecido colágeno frouxo com aparência desorganizada entre as células do parênquima hepático (Fig11D).

GTPR & GTOR- No grupo que foi submetido à reinfecção, durante o primeiro mês houve presença de poucas fibras colágenas de aparência densa (Fig11- E e F). Entretanto, durante o segundo mês de reinfecção a presença de fibras colágenas era intensa, estas exibiam uma disposição bem organizada e densa houve também a presença de algumas células inflamatórias.(Fig12-A e B) No terceiro mês estas fibras ainda encontravam-se abundantes, organizadas e bastantes densas (Fig12- C e D).

GRNT- Neste grupo havia grande quantidade de densas fibras colágenas que se apresentavam de forma bem organizada (Fig-12 F).

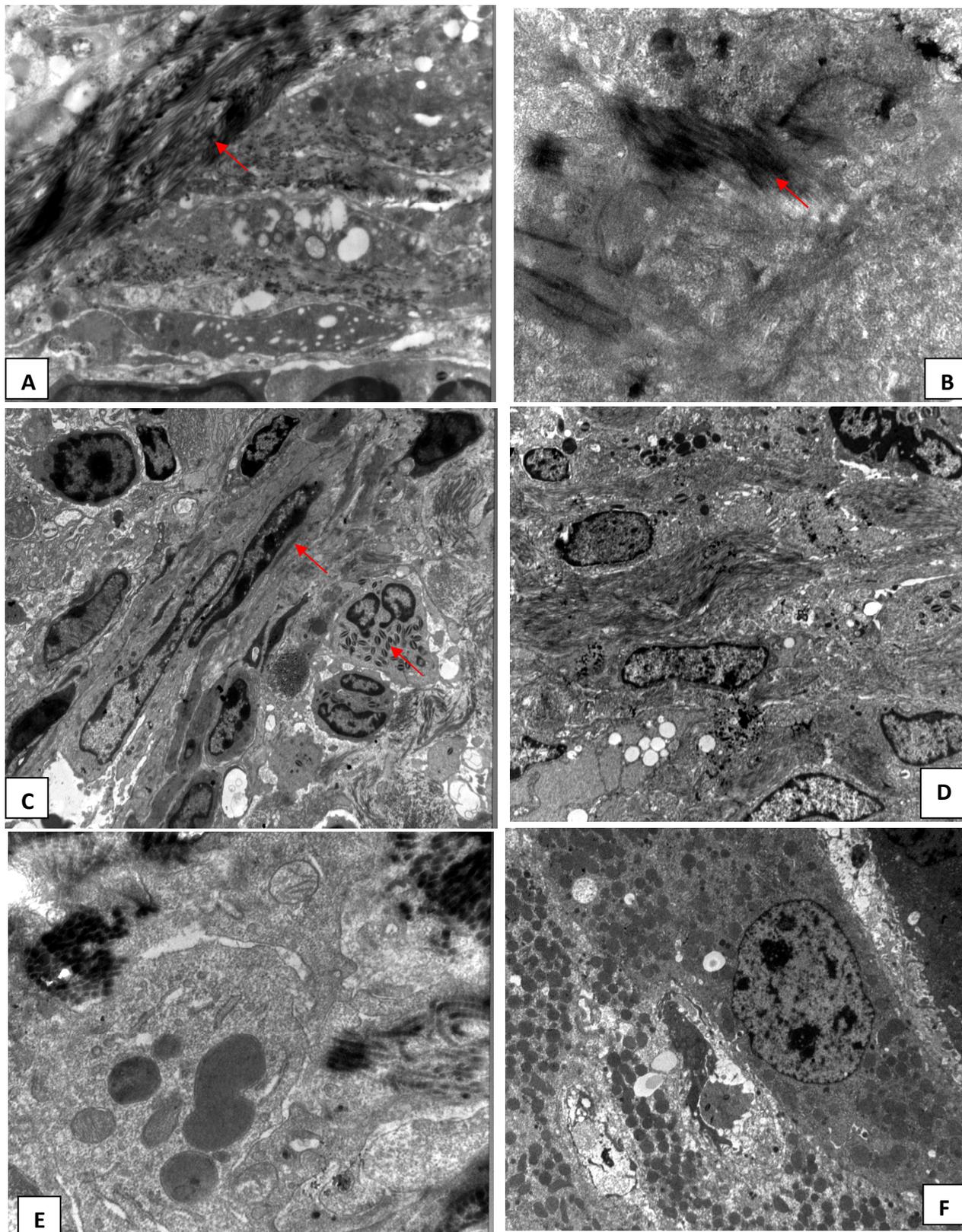


Fig.11 – Microscopia Eletrônica de Transmissão avaliando o aspecto ultraestrutural durante as seguintes fases: Antes do Tratamento, Depois do tratamento e um mês após reinfeção. A-GIP- Tecido hepático apresentando fibras de colágeno (seta) 4400x. B-GITO Notar feixe de fibras colágenas(seta) 20.000x. C- GITP É possível observar células fusiformes e células inflamatórias como Eosinófilos(seta).Notar a presença de fibras colágenas no parênquima hepático(*) 3000x. D - GINT.Observar a diminuição de células inflamatórias. Fibras colágenas pouco organizadas 4400x. E- GTOR Um mês após reinfeção. Presença de fibras colágenas mais densas. 12.000x. F GTPR- Hepatócito exibindo núcleo volumoso e predomínio de eucromatina. 3.000x.

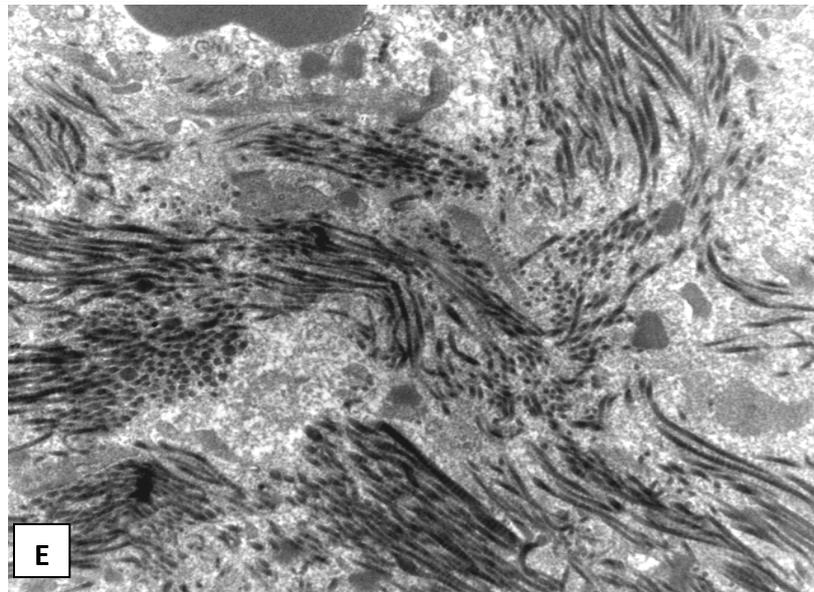
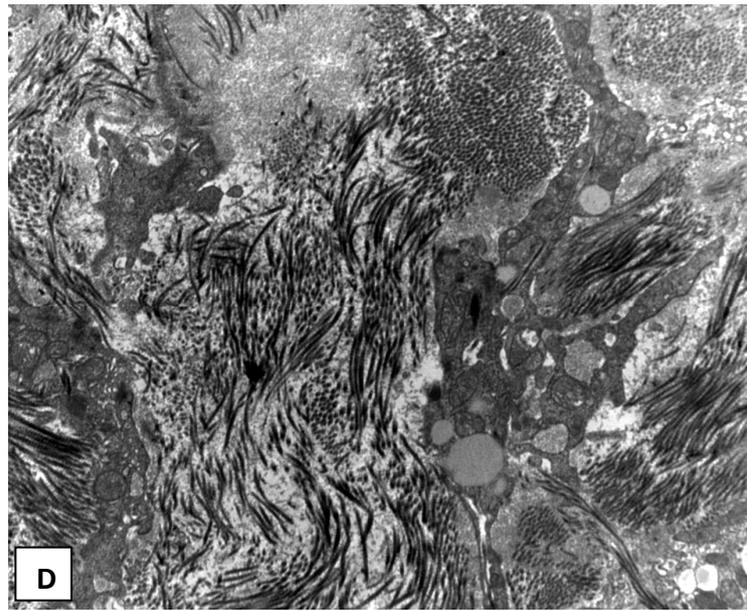
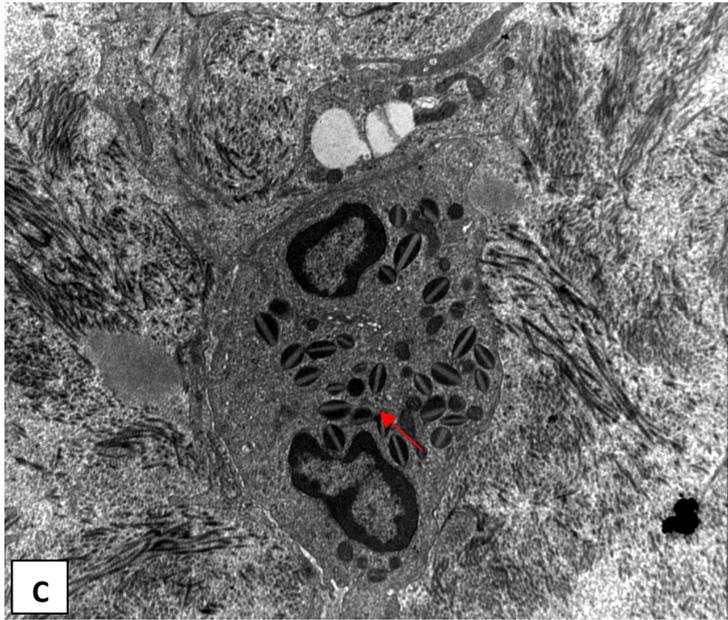
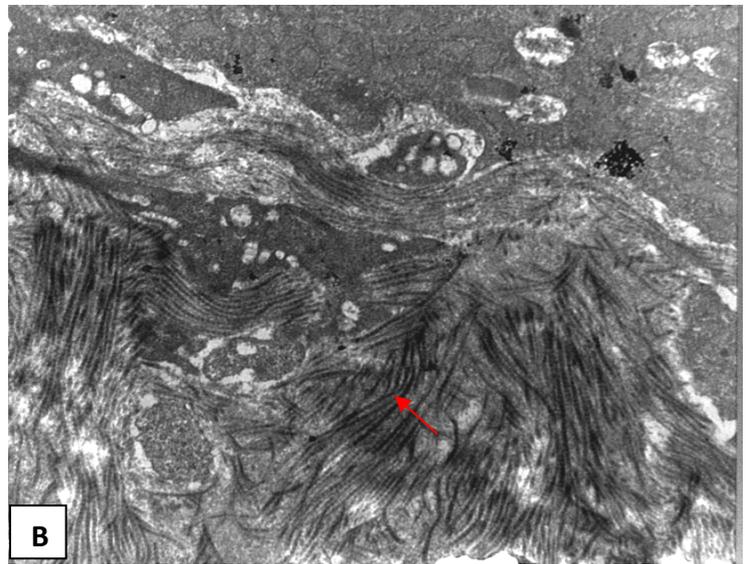
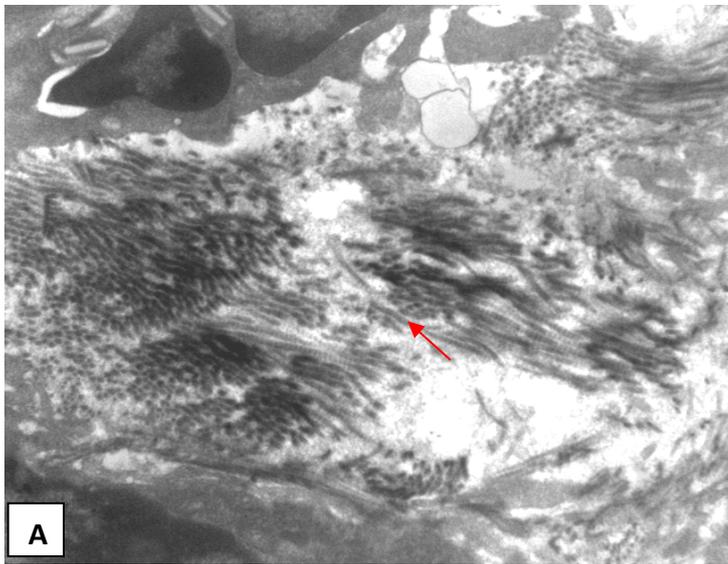


Fig.12- Microscopia Eletrônica de Transmissão avaliando o aspecto ultraestrutural durante as seguintes fases: Dois e três meses após reinfecção. A - GTOR-Dois meses de reinfecção. Fibras colágenas densas e bem organizadas (seta)12.000x B- GTPRDois meses de reinfecção. Intensa produção de fibras colágenas.12.000x. C- GTOR Três meses de reinfecção. Fibras colágenas organizadas, notar eosinófilo (seta)7.000x D- GTPR Três meses após reinfecção. Intensa produção de Fibras colágenas .7.000x. E - GNTR Fibras colágenas bem organizadas e densas 7.000x.

6.7 Análise Morfométria

Os níveis de colágeno foram determinados da seguinte forma: os pixels foram identificados como pontos luminosos, a partir de então os pontos vermelhos (pv) foram quantificados. Os pontos vermelhos representam a coloração Sírius-red e conseqüentemente a quantidade de colágeno. Inicialmente analisaram-se os grupos de forma geral sem especificar o tipo de tratamento utilizado. A análise morfométrica destes dados revelou um grande aumento na produção de colágeno durante os primeiros meses da infecção primária (1712 pv). Com administração do tratamento houve uma nítida redução nos níveis de colágeno produzidos (1026 pv), com a reinfecção os níveis de colágeno voltaram a subir. Entretanto, a partir do terceiro mês os níveis de colágeno diminuíram. No GINT média de colágeno medido foi bastante alta nos primeiros meses, porém diminuiu a partir do quinto mês de infecção, voltando a demonstrar níveis elevados de colágeno depois da reinfecção. Estes níveis voltaram a diminuir a partir do segundo mês de reinfecção (Figura 13).

A análise estatística destes dados revelou diferenças estatisticamente significantes quando se comparou a média de colágeno antes e após o tratamento. Também se observou diferença na comparação dos níveis de colágeno entre os grupos GTR-2M, GIT e GRT-1M. Houve diferenças também quando se comparou os dados do grupo GTR 2M com o grupo GTR-3M (Figura 14). No grupo infectado não tratado (GNTR) não houve diferença estatística entre os grupos analisados (Figura 15).

Quando os dados foram estratificados por tipo de tratamento Praziquantel ou Oxamniquine, os animais tratados com Praziquantel apresentaram maior média aritmética de pontos vermelhos (1170) correspondendo a área marcada pelo sírius-red do que os animais tratados com Oxamniquine (789 pv). Com a reinfecção os níveis de colágeno começaram a aumentar novamente, e durante o primeiro mês de reinfecção a média de marcação foi de 959 pontos corados para o grupo tratado com Oxamniquine e de 1848 para os tratados com praziquantel. Atingindo níveis ainda mais altos durante o segundo mês de reinfecção apresentando média 2285 pontos para o GTOR e 1640.6 para o GTPR. Toda via, houve uma

expressiva diminuição de fibras marcadas a partir do terceiro mês pós reinfecção, onde os animais que receberam Oxamniquine apresentaram 1574.8pv e os que receberam Praziquantel apresentaram 1035.7pv. Todos estes dados estão resumidos na figura 16.

Analisando estes resultados através de programas estatísticos foi possível observar que quando comparamos as duas drogas utilizadas, havia diferenças estatísticas em alguns pontos do experimento. Após o tratamento, apesar de o GTOR apresentar níveis de colágeno menores do que GTPR, esta diferença no percentual de colágeno não foi estatisticamente significativa. Com o advento da reinfecção, ainda no primeiro mês os níveis de colágeno voltaram a aumentar atingindo seu pico no segundo mês. Durante o primeiro mês houve diferença estatística quando se comparou os grupos GTOR e o GTPR, sendo que o grupo tratado com praziquantel atingiu níveis de colágeno bem mais elevados de que os tratados com Oxamniquine. No segundo mês de reinfecção os níveis de colágeno conseguiram atingir seu pico em ambos os grupos, entretanto não existiu diferença significativa entre eles. Já no terceiro mês pós reinfecção os níveis de colágeno dos grupos tratados com ambas as drogas voltavam a regredir, sendo que o GTOR exibiu menos fibrose do que o GTPR (Figura 17).

A técnica de morfometria também foi utilizada para medir o tamanho dos granulomas em todos os grupos estudados. Durante a infecção primária os granulomas tinham um tamanho médio de 788mm^2 . Com adição do tratamento os granulomas reduziram de tamanho medindo em média 607mm^2 , mas quando reinfecados o tamanho do granuloma voltavam a crescer durante o primeiro e segundo mês, diminuindo no terceiro mês pós reinfecção. O GINT exibiu uma redução no tamanho do granuloma com a cronicidade da infecção, entretanto depois da reinfecção tamanho voltou a aumentar. (Figura 18).

Foram observadas diferenças estatisticamente significantes quando se comparou o tamanho dos granulomas dos antes e depois do tratamento (GIP e GIT), como também entre o GIP e GTR 3M. Ainda verificou-se diferença entre GIT e GTR 2M, como também entre o GTR-2M e GTR-3M (Figura 19). Entretanto quando analisamos os grupos especificamos o tipo de tratamento

empregado, o tamanho do granuloma só foi estatisticamente significativo entre os GTOR 3M e GTPR 3M (Figura 20).

O grupo que não recebeu tratamento (GINT e GNTR) também não exibiu diferenças significantes com relação ao tamanho do granuloma.

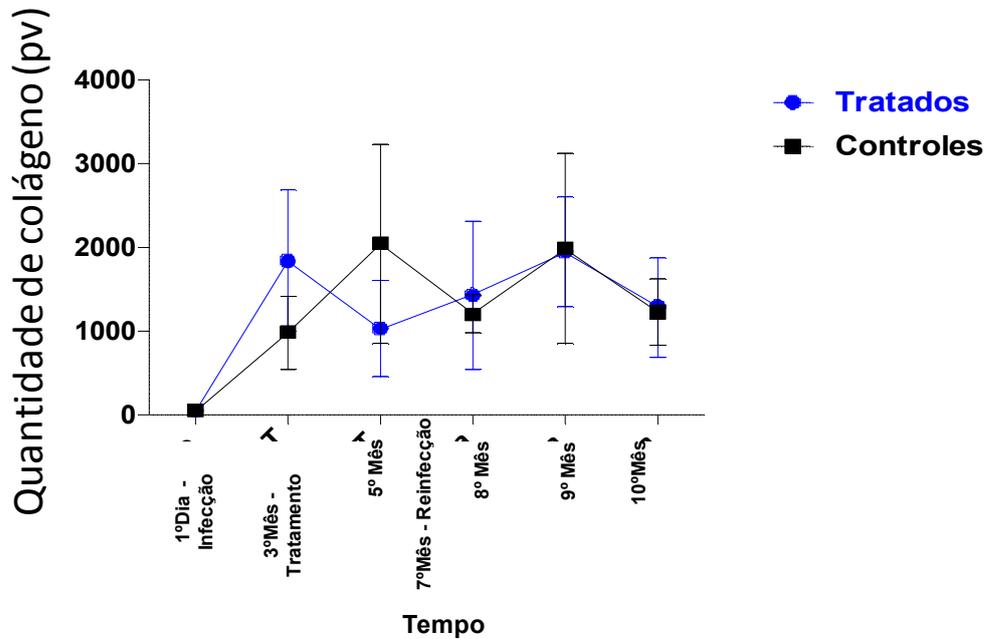


Figura 13 -Gráfico demonstrando a cinética da quantidade de colágeno hepático em camundongos durante a infecção primária, tratamento e Reinfecção. Os níveis de colágeno foram determinados por quantificação morfométrica da coloração Sírius-red.

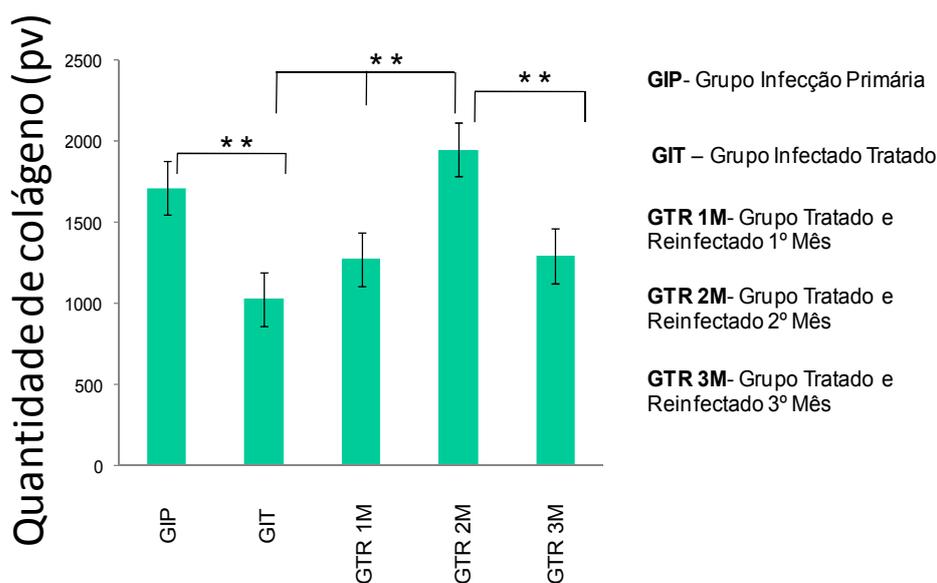


Figura - 14 Determinação dos níveis de colágeno hepático. Os níveis de colágeno foram determinados por quantificação morfométrica da coloração Sírius-red. **p< 0.01

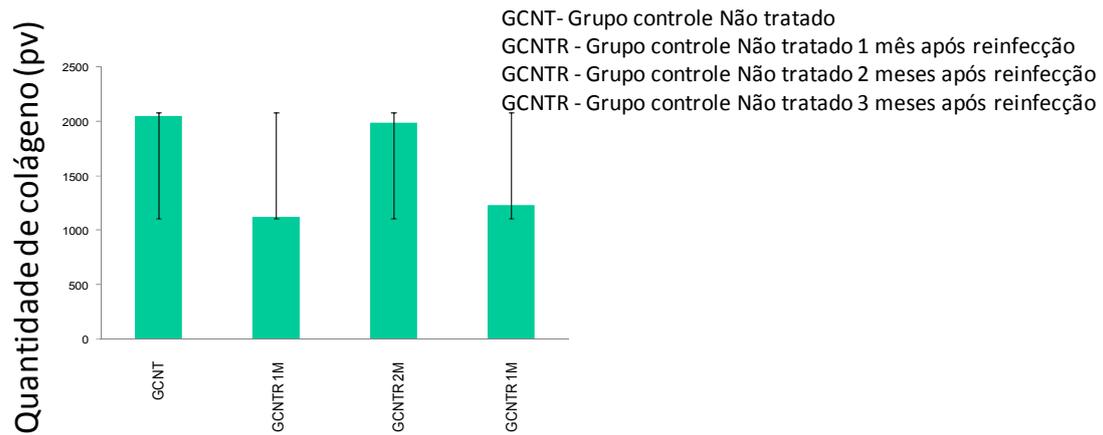


Figura 15 – Quantificação do colágeno hepático dos animais controles não tratados. Determinado por quantificação morfométrica da coloração Sírius-red. Não houve diferenças estatisticamente significantes.

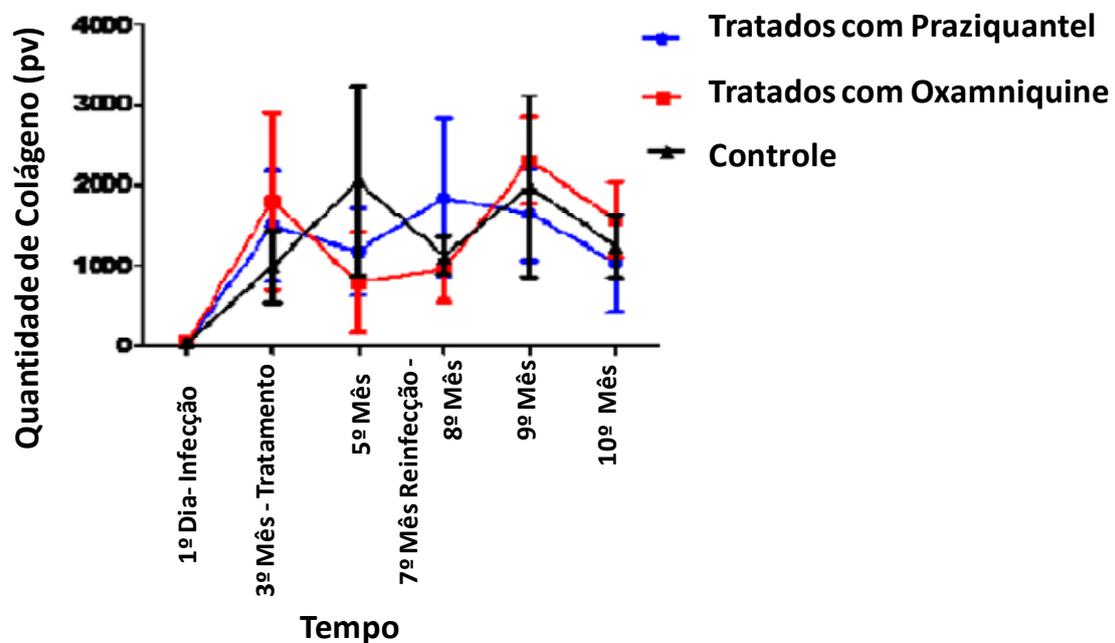


Figura 16 - Quantificação de colágeno hepático em animais tratados com Praziquantel, Oxamniquine e controle não tratado. Os níveis de colágeno foram determinados por quantificação morfométrica da coloração Picrosírius-red.

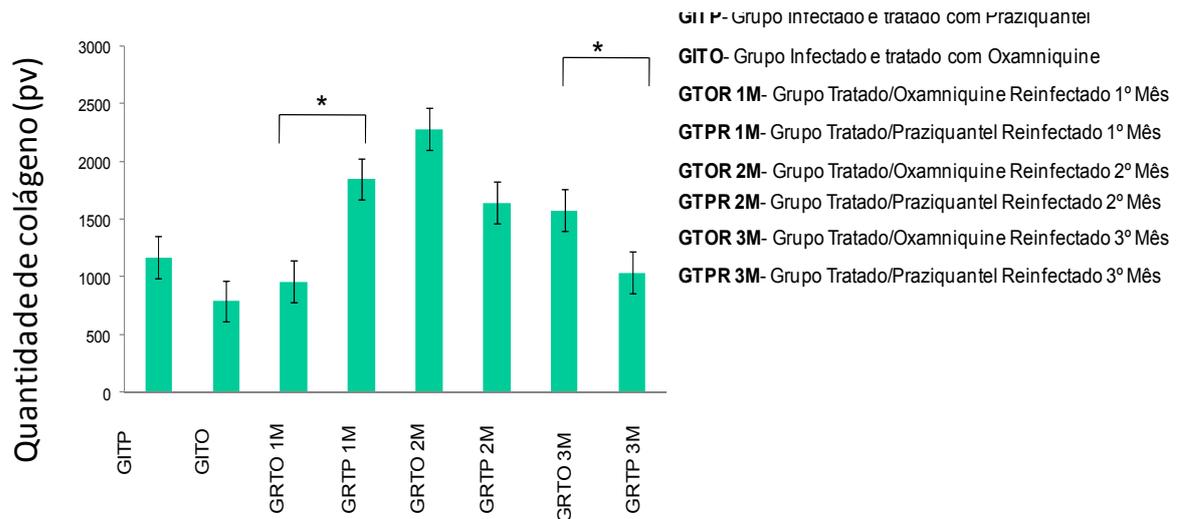


Figura – 17. Análise dos níveis de colágeno especificado o tipo de droga utilizada (Praziquantel ou Oxamniquine e o grupo não tratado. * $p < 0.05$ **.

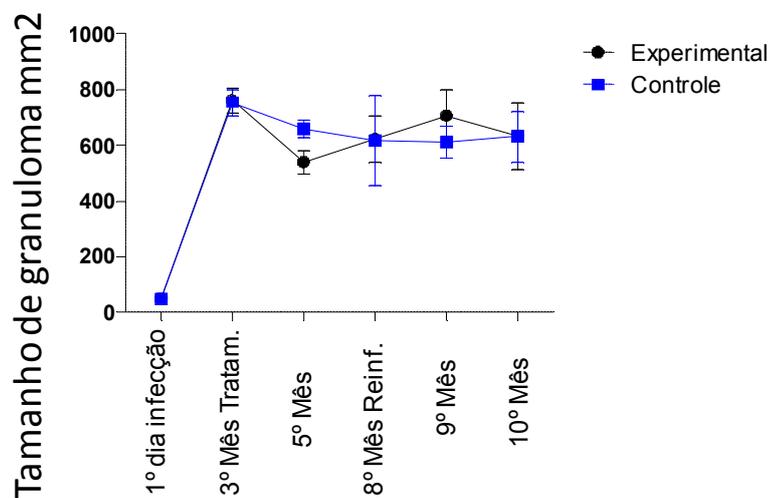


Figura – 18. Cinética do tamanho do granuloma durante todas as etapas do experimento.

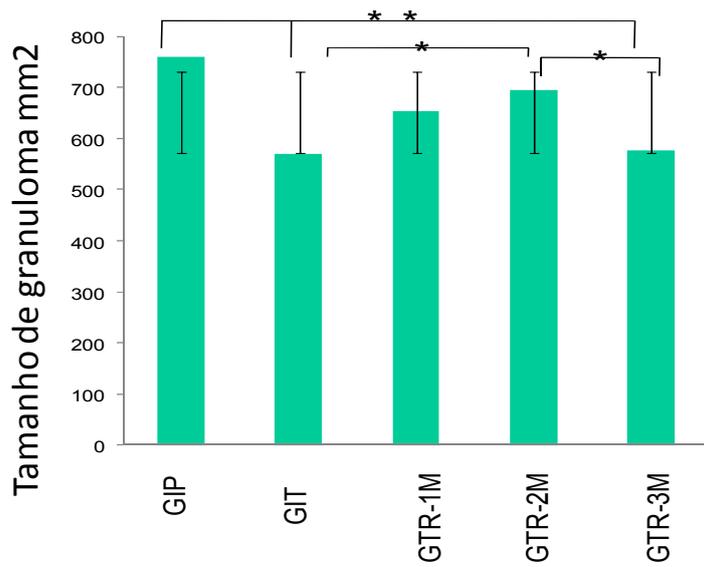


Figura – 19. Análise morfométrica do tamanho do granuloma, durante a infecção primária, tratamento e reinfecção. * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$

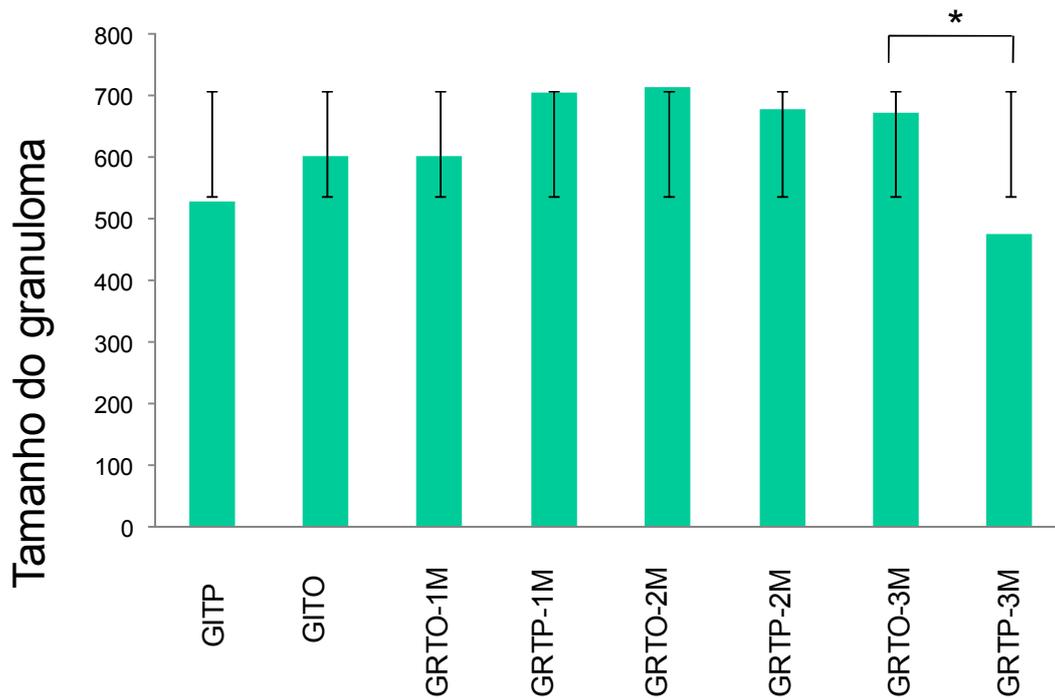


Figura – 20. Análise do tamanho do granuloma comparando-se os dois tipos de tratamento utilizado. $p < 0.05$

7- Discussão

Este estudo procurou averiguar as características histológicas da fibrose hepática em animais esquistossomóticos em diversos momentos. Alterações hepáticas provocadas pela infecção pelo *S.mansoni* têm aspectos distintos da fibrose provocada por outros agentes. Esta patologia geralmente está acompanhada pelo surgimento de granulomas periovulares, com predominante componente exsudativo, excessiva produção de tecido fibroso, com conseqüentes lesões obstrutivas no espaço porta. A fibrose periportal é o achado histológico mais característico da esquistossomose mansoni, e esta característica é facilmente percebida através da análise microscópica, a qual revela extensas áreas de fibrose nos espaços portais de animais infectados (Andrade e Ferraz, 1971).

Através do estudo histológico utilizando a coloração HE foi possível verificar que durante os primeiros meses da infecção primária houve uma excessiva resposta tecidual, onde era possível observar várias alterações na arquitetura hepática, além da presença de células mononucleares, neutrófilos e eosinófilos ao redor dos ovos depositados no tecido. Camundongos desenvolvem aspectos clínicos e patológicos semelhantes aos encontrados em pacientes humanos, como forma aguda e crônica da doença. Nossos achados obtidos pela análise do grupo com infecção primária são semelhantes aos descritos na literatura (Reis e Andrade, 1987), apresentando extensas áreas de reações granulomatosas distribuídas em todo parênquima hepático, e acúmulo focal de células epitelióides e histiócitos.

Em 1983 Emanuel e Prata desenvolveram um estudo com objetivo de comparar o efeito da Oxamniquine e do Praziquantel em pacientes esquistossomóticos, e concluíram que ambas as drogas se mostraram eficazes no tratamento da doença. Todavia no grupo analisado após a administração de quimioterápicos específicos (Praziquantel e Oxamniquine), a hepatite reacional regrediu e a arquitetura hepática estava bem recuperada. Alguns animais exibiam pequenos granulomas isolados. Estudos sobre tratamento da esquistossomose revelam que indivíduos tratados desenvolvem uma melhor resposta imune adquirida, devido a alterações específicas na resposta celular e

humoral, principalmente em crianças. Estas alterações podem auxiliar a amenizar efeitos lesivos em uma possível reinfecção (Frenchet *et al.* 2010).

Estudos recentes apontam que a degeneração e desintegração dos ovos caracterizam a regressão da doença. Neste momento a presença de fibrócitos e fibras colágenas tornam-se mais evidentes, havendo diminuição numérica dos tipos celulares encontrados na fase aguda da doença. Com o tratamento há regressão dos granulomas e estes podem ser reduzidos a restos hialinos que podem calcificar ou serem reabsorvidos (Burke *et al.* 2009).

Existem vários estudos que reportam a eficiência dos quimioterápicos utilizados no tratamento da esquistossomose. (Stelmaet *et al.* 1995, Cioli, 1998). Contudo, apesar do bom desempenho destes medicamentos, os indivíduos tratados podem ser expostos a novas infecções. Mesmo diante desta questão, pouco se sabe sobre a patologia e fisiopatologia de uma reinfecção em indivíduos tratados para esquistossomose. Durante algumas décadas aconteceram surtos de esquistossomose em vários países inclusive no Brasil e em algumas regiões do continente africano. Houve então a necessidade de desenvolver estratégias eficazes com o intuito de conter o avanço da doença, e um dos principais métodos de ação foi a administração em massa de quimioterápicos nas regiões afetadas (Barbosa, *et al.* 2010, Foekjet *et al.* 1996,1995, Gryseels B 1993). Durante a 54^a Assembléia Mundial da Saúde ficou acordado que até 2010, 75% de todas as crianças em idade escolar residentes em áreas endêmicas receberiam o tratamento com Praziquantel. O tratamento em massa de comunidades residentes em áreas endêmicas trouxe novas preocupações a comunidade científica, dentre estas preocupações destaca-se o surgimento de tolerância aos medicamentos utilizados (Colley *et al.* 2001, Fallon *et al.* 1994, Ismaile *et al.* 1999).

Farah e colaboradores verificaram que a reinfecção após o tratamento específico resulta em melhora da reação granulomatosa em camundongos Balb/c, e que modulações da resposta imune podem ser responsáveis pelo desenvolvimento de uma proteção residual. Coura e Conceição em 2010, realizando um estudo de coorte verificaram que o tratamento específico reduz a prevalência da infecção.

Pesquisas realizadas por Butterworth *et al.* e Wilkins *et al.* demonstraram que a quimioterapia curativa para esquistossomose adultos induz resistência a reinfecções quando comparados a resultados obtidos de crianças tratadas. Entretanto, em nosso estudo com o advento da reinfecção os animais voltaram a desenvolver uma forte resposta tecidual, acompanhada por uma excessiva deposição de matriz extracelular. As lesões teciduais provocadas pela nova infecção tiveram seu ápice no segundo mês pós reinfecção. Contudo, no terceiro mês a deposição de colágeno já exibia níveis de redução. Estes achados corroboram com os achados de Santos e colaboradores em 2000 em um estudo onde os animais eram submetidos a reinfecções pelo *S. mansoni* e ao final do experimento observou-se um aumento na deposição de colágeno, além do desenvolvimento da fibrose periportal durante a reinfecção.

Estudos realizados por Karanja *et al.* (2002) demonstraram que indivíduos adultos ocupacionalmente expostos ao *S. mansoni* desenvolvem resistência a reinfecções após serem submetidos a repetidos ciclos de reinfecções e retratamentos.

A intensidade da fibrose foi avaliada pela análise morfométrica da intensidade de coloração vermelha (Sírius-res) no parênquima hepático de todos os grupos. Em nosso estudo foi possível verificar que durante a infecção primária os níveis de fibrose eram se mostravam elevados, e após o tratamento estes níveis reduziam. Estes resultados já eram esperados uma vez que as drogas utilizadas são eficazes na grande maioria dos casos, eliminando o verme em poucas semanas de tratamento.

Após a reinfecção os níveis de colágeno presentes no parênquima hepático voltaram a subir, tanto nos animais tratados quanto nos controles. Contudo nos animais previamente tratados os índices de produção de colágeno foram semelhantes aos animais que não receberam tratamento. Estes dados discordam com os estudos atuais que apontam que a quimioterapia específica para esquistossomose diminui a intensidade das reinfecções.

Apesar do alto risco de exposição presente nas comunidades endêmicas, somente 6 a 10% dos indivíduos infectados desenvolvem a forma

hepatoesplênica da doença. As razões pelas quais este fato acontece ainda não estão bem esclarecidas, mas sabe-se que diversos fatores como intensidade da carga parasitária, reinfecções sucessivas e resposta imunológica dos indivíduos parasitados podem estar envolvidos na progressão da doença para a forma grave. Além disso, pessoas que nascem em áreas de risco podem ter adquirido memória imunológica ou terem sofrido mudanças no sistema imunológico devido a estímulos recebidos da mãe infectada, e esta sensibilização pré-natal pode ter conseqüências como desenvolvimento de resistência. Prata *et al.* 1968, King *et al.* 1998.

Durante a análise ultraestrutural através da Microscopia Eletrônica de Varredura observou-se que no grupo representante da infecção primária houve a presença de muitas células inflamatórias principalmente eosinófilos, e queparênquima hepático apresentava fibras colágenas de forma frouxa e irregular. Depois do tratamento a presença das fibras colágenas diminuiu de forma evidente. Com a exposição a uma nova infecção os animais voltaram a apresentar um parênquima hepático com células inflamatórias e formação de feixes colágenos, como também a presença de fibroblastos e eosinófilos. Além desses achados durante o terceiro mês de reinfecção os animais exibiam fibras colágenas extremamente densas e organizadas.

Devido às alterações causadas pela esquistossomose, existe uma deposição de componentes da membrana basal na região comprometida, dentre estes componentes, a laminina é bastante freqüente. A laminina está relacionada com diversos tipos de fenômenos biológicos como: adesão, migração celular e manutenção do citoesqueleto. Clemente *et al.* analisando tecido hepático normal e com fibrose verificaram que no fígado normal, a laminina é encontrada ao redor dos vasos, ductos biliares e outros sistemas onde membrana basal está presente. Entretanto nos animais com fibrose houve um aumento na quantidade de laminina extracelular. Em nossos resultados, com a técnica de imunofluorescência para laminina foi possível evidenciar que na infecção primária a marcação positiva concentrava-se principalmente na periferia do granuloma, e tanto depois do tratamento quanto depois das reinfecções este padrão de marcação foi predominante. O aumento na quantidade de laminina e colágeno no parênquima hepático estão

relacionados com as lesões causadas pela esquistossomose. Este acúmulo na região sinusoidal pode levar ao desenvolvimento de uma membrana ao longo dos sinusóides fenômeno conhecido como capilarização sinusoidal. Indicando desta forma que a infecção por esquistossomose resulta em alterações na produção de laminina. Isso nos levar a apoiar as afirmações de Wyszomirska *et al.* em 2005 que em seu estudo demonstra que pacientes esquistossomóticos nos diferentes estágios exibem grandes níveis de lamina nos soros examinados (Rosa *et al.* 2008).

Outro importante elemento a ser considerado no desenvolvimento da fibrose periportal é a angiogênese. Vanheule e colaboradores (2008) utilizando CD31 como marcador de angiogênese referem que existe uma elevação deste marcador em áreas fibróticas de animais tratados com CCL4 durante 16 semanas, sugerindo assim que a angiogênese acompanha o estabelecimento da fibrose induzida por CCL4. No presente estudo a marcação com o anticorpo CD31 (PECAM-1) em camundongos durante a infecção primária demonstrou marcação positiva nas áreas medial a periférica do granuloma. Os animais avaliados após o tratamento exibiram níveis de marcação semelhantes. Entretanto animais avaliados após o primeiro mês de reinfecção voltaram a exibir altos níveis de marcação. O padrão de marcação encontrado nesta fase da doença apresentou variações, sendo observada positividade em toda região granulomatosa. No segundo e terceiro mês pós reinfecção o padrão de marcação foi predominantemente periférico.

Entretanto, os animais avaliados após o tratamento e após a reinfecção apresentaram células endoteliais sinusoidais (SEC) exibindo altos níveis de marcação para CD31. SEC são uma população celular especial, pois possuem um fenótipo diferenciados para atender as necessidades específicas do fígado. Estas células apresentam fenestrações que facilitam a passagem do sangue e nutrientes para os hepatócitos. DeLevee *et al.* (2004) em estudo *in vitro* verificaram que as SEC que perdem a fenestração em cultura apresentam superfície celular positiva para CD31, enquanto as SEC em condições normal expressam CD31 na região citoplasmática, mas não na superfície celular. Em 2006, Silva e colaboradores através estudos realizados em nosso laboratório avaliaram as características patológicas da fibrose periportal e de granulomas

isolados enfatizando a importância das alterações vasculares e verificaram que animais que desenvolviam fibrose periportal apresentavam alterações na estrutura vascular.

Nossos achados confirmam e reforçam os dados acima analisados, que indicam que SECs desempenham uma importante função no desenvolvimento e resolução da fibrose periportal, uma vez que após a infecção com *S. mansoni*, estas células podem sofrer alterações patológicas como capilarização sinusoidal. Desse modo, os resultados demonstram que há proliferação vascular durante a infecção primária, durante o tratamento e reinfeção.

O granuloma peri-ovular originado pela resposta do hospedeiro aos ovos do verme, surge como um denso nódulo fibroso, e sua formação induz uma importante participação da angiogênese. Entretanto mesmo que a formação do granuloma e proliferação de fatores pro-angiogênicos sejam evidentes na fase aguda da infecção, a consequência final do processo é o estabelecimento da fibrose. Ao longo do tempo há um progressivo desaparecimento dos vasos formados pela estimulação do SEA (antígeno ovular solúvel), evento típico do mecanismo de reparo, onde um tecido de granulação rico em vasos evolui para uma cicatriz resistente, esbranquiçada e retrátil. Esta fase caracteriza-se pelas alterações vasculares e imunomodulação do granuloma com mudança nos componentes celulares e extracelulares envolvidos. Nas infecções com carga parasitária elevada, os ovos vão sendo depositados em espaços porta cada vez mais calibrosos causando a fibrose periportal sistematizada (Andrade 2009, K.K. Van de Vijver *et al.* 2006).

Em recente trabalho Couto (2007) demonstrou que o dano hepático leva a ruptura da homeostase no fígado, resultando assim em estresse oxidativo com maior produção e liberação de radicais livres extracelulares, citocinas e moléculas sinalizadoras e que a lesão hepática é tipicamente inflamatória. O fígado contém células de defesa residentes que constituem a primeira resposta a reação inflamatória local. Uma lesão hepática transitória pode evoluir com restituição completa da integridade do parênquima.

Contudo, lesões persistentes como as que ocorrem na esquistossomose resultam em dano tissular e ativação celular. Numerosos estudos indicam que

em resposta a lesões hepáticas as HSC passam por um processo de ativação caracterizado pela proliferação e transformação em miofibroblastos. Por exibirem um fenótipo miofibroblástico estas células expressam positividade para os marcadores como α -actina de músculo liso.

Em 2005 Akpolat e colaboradores utilizando material de pacientes infectados com Hepatite B Crônica (CHB) avaliaram a expressão de α -actina de músculo liso no processo de ativação de células hepáticas estrelares e no desenvolvimento da fibrose hepática. Na fibrose esquistosomótica as lesões se destacam pela presença de fibroblastos e de células com características morfológicas semelhantes aos fibroblastos. Devido a semelhanças biológicas a marcação para alfa-actina de músculo liso pode se mostrar positiva em subpopulações de células distintas, que exibem algum tipo de semelhança. Em nosso trabalho observamos o comportamento das células com perfil miofibroblástico durante a evolução da doença; os resultados mostram que durante a infecção primária os níveis deste componente estão elevados e a marcação positiva podia ser observada em toda área granulomatosa. Já os animais que receberam tratamento específico exibiram baixos índices de marcação positiva e quando expostos a uma nova infecção os níveis de marcação positiva voltaram a crescer, indicando que durante as reinfecções tanto células com perfil miofibroblástico quanto as células estrelares hepáticas são novamente ativadas. Entretanto, com a reinfecção, os animais passaram a exibir um padrão de marcação diferente do grupo pertencente a infecção primária, apresentando marcação positiva predominantemente na região periférica.

Embora as células estreladas hepáticas sejam capazes de exibir marcação positiva para α -actina de músculo liso (α -SMA), a fibrogênese hepática é sustentada por uma população heteróloga de células que exibem perfil positivo para α -actina de músculo liso. Os miofibroblastos são um exemplo de células que também apresentam positividade para α -SMA. A origem dos miofibroblastos hepáticos ainda não está bem esclarecida. Alguns estudos têm sugerido que os miofibroblastos a depender do tecido e ocasião podem originar-se de formas diferentes (Parola *et al.* 2008).

Miofibroblastos exibindo marcação positiva para α -actina de músculo liso podem ser encontrados em diversos estados patológicos. Takeji e colaboradores(2006) utilizando camundongos knock-out demonstraram que a deficiência de α -SMA esta relacionada com a progressão de doenças renais uma vez que animais que apresentavam maior expressão de α -SMA apresentavam melhor resposta tecidual. Isso indicou o importante papel da α -SMA no estabelecimento de lesões.

Em 2006 Bartley e colaboradores utilizando camundongos CBA avaliaram o papel de HSCs na progressão da fibrose hepática em animais infectados com *Schistosoma japonicum* através das técnicas de imunohistoquímica e PCR. E demonstraram que na periferia do granuloma existiam células que expressavam α -SMA, sugerindo desta forma que as HSCs contribuem de maneira efetora para a progressão da fibrose em animais com *S. hematobium*.

Na presente investigação, detectou-se a presença de α -SMA através da técnica de imunohistoquímica e os resultados obtidos indicam que esta molécula desempenha uma importante função no estabelecimento da fibrose periportal tanto na infecção primária como durante reinfecções. Entretanto os padrões de marcação podem ser diferentes de acordo com a fase da doença.

8- CONCLUSÃO

- A reinfecção pelo *S.mansoni* em animais previamente tratados, foi capaz de induzir uma resposta fibrótica semelhante a encontrada nos animais com infecção primária.
- O padrão de marcação para laminina estava alterado em animais com esquistossomose.
- Animais esquistossomóticos reinfectedos tratados ou não mantêm níveis semelhantes de fibrose.
- Animais tratados com Praziquantel exibem maiores níveis de fibrose durante o primeiro mês de reinfecção.
- Houve diferença no diâmetro dos granulomas dos grupos com infecção primária e infecção secundária.
- O tratamento com Praziquantel foi capaz de induzir menores níveis de fibrose durante o terceiro mês de reinfecção.

9- Bibliografia

ABDUL-GHANI R. A, LOUTFY N, HASSAN A. Experimentally promising antischistosomal drugs: a review of some drug candidates not reaching the clinical use. *Parasitol Res.* 105(4): 899-906. 2009.

AKPOLAT N, YAHSI S, GODEKMERDAN A, YALNIZ M, DEMIRBAGK. The value of alpha-SMA in the evaluation of hepatic fibrosis severity in hepatitis B infection and cirrhosis development: a histopathological and immunohistochemical study. *Histopathology.* 47(3): 276-80, 2005.

ANDRADE Z.A E FERRAZ GS A hepatopatia esquistossomótica. *Arq.Gastroenterol,* 8 131-36, 1971.

ANDRADE Z.A. ,Schistosomiasis and hepatic fibrosis regression *Acta Tropica* 108, I 2-3, 79-82, 2008.

ANDRADE Z.A. Regressão da fibrose hepática *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 38(6):514-520, 2005.

BARBOSA C.S, ARAÚJO KC, SEVILLA MA, MELO F, GOMES EC, SOUZA-SANTOS R. Current epidemiological status of schistosomiasis in the state of Pernambuco, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 105(4):549-54, 2010.

BATALLER, R. AND BRENNER, A. D. - Liver fibrosis, *J Clin Invest.* 1; 115(2): 209–218, 2005.

BARTLEY PAUL B., GRANT A. RAMM, MALCOLM K. JONESA, RICHARD G. RUDELL, YUESHENG LI AND DONALD P. MCMANUS. A contributory role for activated hepatic stellate cells in the dynamics of *Schistosoma japonicum* egg-induced fibrosis. *International Journal for Parasitology* V 36, I 9, P 993-1001, 2006.

BECK LILIAN, DANIELE S.M. VAN-LÜME, JOELMA R. SOUZA, ANA L.C. DOMINGUES, TEREZA FAVRE, FREDERICO G.C. ABATH, AND SILVIA M.L. Montenegro, Discriminating acute from chronic human schistosomiasis *Acta Tropica* V 108, I 2-3, P 229-233, 2008.

BRINDLEY PAUL J' AND ALAN SHER. The chemotherapeutic effect of mansoni is dependent on praziquantel against schistosoma host antibody response. *thejournaoflhmunology* vol. 139. 215-220. no. 1.j 1. 1987.

BOTROS S , SAYED H , AMER N , EL-GHANNAM M , BENNETT JL , DAY T.A. Current status of sensitivity to praziquantel in a focus of potential drug resistance in Egypt . *Int J Parasitol* 35: 787 – 791, 2005 .

BURKE M.L, JONES MK, GOBERT GN, LI YS, ELLIS MK, MCMANUS DP. Immunopathogenesis of human schistosomiasis.*Parasite Immunol.* 31(4):163-76, 2009.

BUTTERWORTH, A. E., M. CAPRON, J. S. CORDINGLEY, P. R. DALTON, D. W. DUNNE, H. C. KARIUKI, G. KIMANI, D. KOECH, M. MUGAMBI, J. H. OUMA, M. A. PRENTICE, B. A. RICHARDSON, T. K. SIONGOK, R. F. STURROCK, AND D. W. TAYLOR. Immunity after treatment of human schistosomiasismansoni. II. Identification of resistant individuals, and analysis of their immune responses.*Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 79:393-408, 1985.

CALDAS I. R., CAMPI-AZEVEDO AC, OLIVEIRA LF, SILVEIRA AM, OLIVEIRA RC &GRAZZINELLI G. Human schistosomiasismansoni: Imune responses during acute and chronic phases of the infection. *Acta Trop* V.108, Is 2-3, P 109-117. 2008.

CIOLI D. Chemotherapy of schistosomiasis: An update. *Parasitol Today* 14:418±22, 1998.

CAREY EMILY , D.O Noninvasive tests for liver disease, fibrosis, and cirrhosis: Is liver biopsy obsolete?*AbstractCleveClin J Med.* 77(8):519-2, 2010.

CLÉMENT B, RESCAN P.Y, BAFFET G, LORÉAL O, LEHRY D, CAMPION JP, GUILLOUZO A. Hepatocytes may produce laminin in fibrotic liver and in primary culture. *Hepatology.* 8(4):794-803, 1988.

COLLEY DG, LOVERDE P.T, SAVIOLI L. Infectious disease.*Medical helminthology in the 21st century.Science.* 24;293(5534):1437-8, 2001.

COURA JR, CONCEIÇÃO M.J. Specific schistosomiasis treatment as a strategy for disease control. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 105(4):598-603, 2010.

DELEVE L.D, WANG X, HU L, MCCUSKEY MK, MCCUSKEY RS. Rat liver sinusoidal endothelial cell phenotype is maintained by paracrine and autocrine regulation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 287(4):G757-63. 2004.

ERNOULDJ. C., BA K, SELLIN B. Increase of intestinal schistosomiasis after praziquantel treatment in a Schistosoma haematobium and Schistosoma mansoni mixed focus. *Acta Tropica* 73, 143–152 , 1999.

FALLON P.G, DOENHOFF MJ. Drug-resistant schistosomiasis: resistance to praziquantel and oxamniquine induced in Schistosoma mansoni in mice is drug specific. *Am J Trop Med Hyg* 51:83–8, 1994.

FARAH I.O, JOHANSSON M, LÖVGREN-BENGTSON K, HAUJ. Schistosoma mansoni in mice: the pattern of primary cercarial exposure determines whether a secondary infection post-chemotherapy elicits a T helper 1- or a T helper 2-associated immune response. *Scand J Immunol*. 51(3):237-43. 2000.

FRENCH M.D, CHURCHER TS, GAMBHIR M, FENWICK A, WEBSTER JP, KABATEREINE NB, BASÁÑEZ MG. Observed reductions in Schistosoma mansoni transmission from large-scale administration of praziquantel in Uganda: a mathematical modelling study. *PLoS Negl Trop Dis*. 23;4(11), 2010.

FOEKJE F. STELMA, SOULEYMANESALL, BOCARDAFF, SEYDOU SOW, MALICKNIANG, AND BRUNO GRYSEELS. Oxamniquine Cures Schistosoma mansoni Infection in a Focus in Which Cure Rates with Praziquantel Are Unusually Low. Department of Parasitology, University of Leiden, Leiden, Netherlands; *The Journal of Infectious Diseases* 1997;176:304–7.

FRIEDMAN S. L, Mechanisms of hepatic fibrosis and therapeutic implications, *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 1 pp. 98–105v, 2004.

FRIEDMAN SCOTT L. AND MEENA B. BANSAL. Reversal of Hepatic Fibrosis — Fact or Fantasy? *Hepatology*, Vol. 43, No. 2, Suppl. 1, 2006

FRIEDMAN S.L. Cytokines and fibrogenesis. *Semin Liver Dis.* 19(2):129-40, 1999.

GRYSEELS B. Praziquantel in Senegal schistosomiasis outbreak. *Trop Dis* 115–6. *Res News* 42:10–2, 1993.

ISMAIL M, BOTROS S , METWALLY A , WILLIAM S , FARGHALLY A , TAO LF , DAY TA , BENNETT JL. Resistance to praziquantel: direct evidence from *Schistosoma mansoni* isolated from Egyptian villagers . *Am J Trop Med Hyg* 60: 932 – 935, 1999.

IREDALE, J.P. R C BENYON, J PICKERING, M MCCULLEN, M NORTHROP, S PAWLEY, C HOVELL, M J ARTHUR. Mechanisms of spontaneous resolution of rat liver fibrosis. Hepatic stellate cell apoptosis and reduced hepatic expression of metalloproteinase inhibitors. *J Clin Invest.* V 102, Is 31, 102(3):538 1998.

KING C.L, MALHOTRA I, MUNGAI P, WAMACHI A, KIOKO J, OUMA JH, KAZURA JW. B cell sensitization to helminthic infection develops in utero in humans. *J Immunol* , V 160(7):3578-84, 1998.

LAMBERTON PH, HOGAN SC, KABATEREINE NB, FENWICK A, WEBSTER JP. In vitro praziquantel test capable of detecting reduced in vivo efficacy in *Schistosoma mansoni* human infections. *Am J Trop Med Hyg.* 83(6):1340-7, 2010.

LAMBERTUCCI J.R.. Acute schistosomiasis mansoni: revisited and reconsidered. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 105(4):422-35, 2010.

LOEFFLER D.A, LUNDY SK, SINGH KP, GERARD HC, HUDSON AP, BOROS DL. Soluble egg antigens from *Schistosoma mansoni* induce angiogenesis-related processes by up-regulating vascular endothelial growth factor in human endothelial cells. *J Infect Dis.* 1;185(11):1650-6, 2002 .

LEE U.E, FRIEDMAN SL. Mechanisms of hepatic fibrogenesis. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 25(2):195-206, 2011

Luciana Cavalcanti Pordeus, Lucilene Rafael Aguiar, Louisiana Regadas de crônica da esquistossomose mansônica no Brasil no período de 1997 a 2006: uma revisão de literatura. *Epidemiol. Serv. Saúde*, Brasília, 17(3):163-175, 2008.

MANSOUR M.M, P.O. ALI, Z. FARID, A.J.G. SIMPSON AND J.W. WOODY. Serological differentiation of acute and chronic schistosomiasis mansoni by antibody responded to keyhole limpet hemocyanin, *Am. J. Trop. Med. Hyg.* V 41, p. 338–344, 1989.

MASUR S.K., H. S. DEWALT, T. T. DINH, I. ERENBURG, AND S. PETRIDOU. Myofibroblasts differentiate from fibroblasts when plated at low density. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA Cell Biology* Vol. 93, pp. 4219-4223, 1996.

MARTINEZ-HERNANDEZ A, DELGADO FM, AMENTAPS. The extracellular matrix in hepatic regeneration. Localization of collagen types I, III, IV, laminin, and fibronectin. *Lab Invest.* 64(2):157-66, 1991.

MATTHEW E. KUTCHER , IRA M. HERMAN. The pericyte: Cellular regulator of microvascular blood flow. *Microvascular Research* V 77, 3, 235-246, 2009.

MICHAEL J. P. ARTHUR, JOHN P. IREDALE, AND DEREK A. MANN. Tissue Inhibitors of Metalloproteinases: Role in Liver Fibrosis and Alcoholic Liver Disease. *Alcohol Clin Exp Res*, Vol 23, No 5, pp 940-943, 1999.

MIDZI AND PATRICIA D. NDHLOVU. Similar cellular responses after treatment with either praziquantel or oxamniquine in *Schistosoma mansoni* infection. *Malawi Medical Journal*; 21(4)176-181, 2009.

PAROLA M, MARRA F, PINZANI M. Myofibroblast-like cells and liver fibrogenesis: emerging concepts in a rapidly moving scenario. *Mol Asp Med.* 29:58-66, 2008.

PARSONS CJ, TAKASHIMA M, RIPPE RA. Molecular mechanisms of hepatic fibrogenesis. *J Gastroenterol Hepatol.* Jun;22Suppl 1:S79-84, 2007.

PEARCE E J, P. CASPER, J.M. GRZYCH, F.A. LEWIS AND A. SHER. Downregulation of Th1 cytokine production accompanies induction of Th2

responses by a parasitic helminth, *Schistosomamansoni*, J. Exp. Med. 173 (1991), pp. 159–166. 1991

PICA-MOTTOCIA L, CIOLI D. Studies on the mode of action of Oxamniquine and related schistosomal drugs. Am J. Trop. MED. Hyg.34(1) 112-8. 1985.

PETER, J. HOTEZ, DONALD A. P. BUNDY, KATHLEEN BEEGLE, SIMON BROOKER, LESLEY DRAKE, NILANTHI DE SILVA, ANTONIO MONTRESOR, DIRK ENGELS, MATTHEW JUKES, LESTER CHITSULO, JEFFREY CHOW, RAMANANLAXMINARAYAN, CATHERINE M. MICHAUD, JEFF BETHONY, RODRIGO CORREA-OLIVEIRA, XIAO SHU-HUA, ALAN FENWICK, AND LORENZO SAVIOLI. Helminth Infections: Soil-Transmitted Helminth Infections and Schistosomiasis. Disease Control Priorities in Developing Countries, Jamison DT, Breman JG, Measham AR, et al., editors. Washington (DC): World Bank; 2006.

PRATA A. BINA JC. Development of the hepatoesplenic form of schistosomiasis. *Gazeta Médica da Bahia*. V68 p 49-60 1968.

RAMADORI G, SAILE B. Portal tract fibrogenesis in the liver. *Lab Invest*. Feb;84(2):153-9, 2004.

REIS M, ANDRADE Z.A. Functional significance of periovular granuloma in schistosomiasis. *Braz.J.Med. Biol. Res.*, 20 , 55-62, 1987

ROSA. HEITOR, EDISON ROBERTO PARISE. Is there a place for serum laminin determination in patients with liver disease and cancer? *World J Gastroenterol* 21; 14(23): 3628-3632, 2008.

SĂNDULESCU L, ROGOVEANU I, CIUREA T, COMĂNESCU MV, STREBA CT, IONESCU AG, OPROAICA A, ENE M. Immunohistochemical study of stellate cells in patients with chronic viral hepatitis C genotype 1. *Rom J MorpholEmbryol*. 2011;52(1):137-43. 2011.

SANTOS, A. B. A.; SOUZA, M. M.; ANDRADE, Z. A. Reinfecções e desenvolvimento da fibrose periportalesquistossomótica no modelo murino. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, Uberaba, v. 33, n. 2, 2000 .

SILVA LM, RIBEIRO-DOS-SANTOS R., SOARES M.B.P. AND ANDRADE Z.A. Characterization of the vascular changes in schistosomal portal (pipestem) fibrosis of mice. *Acta Tropica* Vol 98, Is1, P 34-42, 2006

STELMA FF, TALLA I, SOW S. Efficacy and side effects of praziquantel in an epidemic focus of *Schistosoma mansoni*. *Am J Trop Med Hyg* 53:167–70, 1995.

TALLIMAHATEM, RASHIKA EL RIDI. Praziquantel binds *Schistosoma mansoni* adult worm actin. *International Journal of Antimicrobial Agents*.570–575.2007.

TAKAFIRAMDULUZA, FRANCISCA MUTAPI, TINASHERUWONA, DANIEL KALUKA , NICHOLAS TAKEJI M, MORIYAMA T, OSETO S, KAWADA N, HORI M, IMAI E, MIWA T. Smooth muscle alpha-actin deficiency in myofibroblasts leads to enhanced renal tissue fibrosis. *J Biol Chem*. 29 ;281(52):40193-200. 2006.

THOMAS G T , LEWIS M P, SPHEIGHT P M. Matrix Metalloproteinases and oral cancer. *Oral Oncol* V 36 p 227-233, 1999.

VAN DE VIJVER KK, COLPAERT CG, JACOBS W, KUYPERS K, HOKKE CH, DEELDER AM, VAN MARCK EA. The host's genetic background determines the extent of angiogenesis induced by schistosome egg antigens. *Acta Trop*. 99(2-3):243-51. 2006.

VANHEULE E, GEERTS AM, VAN HUYSSSE J, SCHELFHOUT D, PRAET M, VAN VLIERBERGHE H, DE VOS M, COLLE I . An intravital microscopic study of the hepatic microcirculation in cirrhotic mice models: relationship between fibrosis and angiogenesis. *Int J Exp Pathol*. 89(6):419-32, 2008.

VARGAS, D.M.; AUDI, L. AND CARRASCOSA, A. Peptídeos derivados do colágeno: novos marcadores bioquímicos do metabolismo ósseo. *Rev. Assoc. Med. Bras*. vol.43, n.4 , pp. 367-370 1997.

WATANABE K, CARTER JM, NEELY-BURNAM M, AND COLLEY DG. Relative imbalance between T regulatory cells and activated T cells in mice with differential morbidity in chronic *Schistosoma mansoni* infections. *Parasite immunology*. Vol31(8):440-6, 2009.

WILDINS, H. A., U. J. BLUMENTHAL, P. HAGAN, R. J. HAYES, AND S. TULLOCH. Resistance to reinfection after treatment of urinary schistosomiasis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 81: 29-35, 1987.

WORLD HEALTH ORGANIZATION: Schistosomiasis and soil transmitted helminth infections. Fifty-fourth World health Assembly, resolution WHA54.19 WORLD HEALTH ORGANIZATION, Geneva, 2001.

WYSZOMIRSKA ROZANGELA MARIA DE ALMEIDA FERNANDES, NISHIMURA NANCY FUSAE, ALMEIDA JAZONROMILSON SOUZA, YAMANAKA ADEMAR, SOARES ELZA COTRIM. High serum laminin and type IV collagen levels in schistosomiasis mansoni. *Arq. Gastroenterol.* 2005.