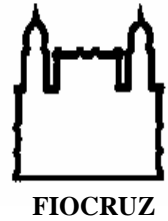




**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ - FIOCRUZ
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ**



Curso de Pós-graduação em Patologia Humana

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**AVALIAÇÃO DO PAPEL DAS CÉLULAS ESTRELADAS
HEPÁTICAS, CÉLULAS ENDOTELIAIS SINUSOIDAIS
E MACRÓFAGOS TIPO II, NO REMODELAMENTO
PÓS-QUIMIOTERÁPICO DAS LESÕES HEPÁTICAS NA
ESQUISTOSSOMOSE MANSÔNICA EXPERIMENTAL**

DELSILENE DOS SANTOS BORGES

Salvador – Bahia – Brasil
2013



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



Curso de Pós-graduação em Patologia Humana

**AVALIAÇÃO DO PAPEL DAS CÉLULAS ESTRELADAS
HEPÁTICAS, CÉLULAS ENDOTELIAIS SINUSOIDAIS
E MACRÓFAGOS TIPO II, NO REMODELAMENTO
PÓS-QUIMIOTERÁPICO DAS LESÕES HEPÁTICAS NA
ESQUISTOSSOMOSE MANSÔNICA EXPERIMENTAL**

DELSILENE DOS SANTOS BORGES

Orientador: Zilton de Araújo Andrade

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

Salvador – Bahia – Brasil
2013

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

B732a Borges, Delsilene dos Santos
Avaliação do papel das células estreladas hepáticas, células endoteliais sinusoidais e macrófagos tipo II, no remodelamento pós-quimioterápico das lesões hepáticas na esquistossomose mansônica experimental.[manuscrito] / Delsilene dos Santos Borges.- 2013.
69 f.; 30 cm

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal da Bahia. Fundação Oswaldo Cruz. Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz. Curso de Pós-Graduação em Patologia Humana, 2013.

Orientador: Dr^o.: Zilton de Araújo Andrade

1. Esquistossomose 2. Remodelamento 3. Angiogênese 4. Praziquantel I. Título


CDU 616.995.122

**"AVALIAÇÃO DO PAPEL DAS CÉLULAS ESTRELADAS HEPÁTICAS, CÉLULAS
ENDOTELIAIS SINUSOIDAIS E MACRÓFAGOS TIPO II, NO REMODELAMENTO PÓS-
QUIMIOTERÁPICO DAS LESÕES HEPÁTICAS NA ESQUISTOSSOMOSE MANSÔNICA
EXPERIMENTAL."**

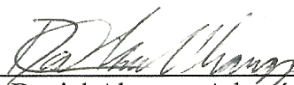
DELSILENE DOS SANTOS BORGES

FOLHA DE APROVAÇÃO


COMISSÃO EXAMINADORA



Dr. Eduardo Antônio Gonçalves Ramos
Pesquisador Titular
CPqGM/FIOCRUZ



Dr. Daniel Abensur Athanázio
Professor Assistente e Adjunto
UFBA



Dr. Zilton de Araújo Andrade
Pesquisador
CPqGM/FIOCRUZ

Aos meus pais Elza e José Francisco, por me darem a oportunidade de crescer como ser humano e como profissional. A minha avó Eufolosina (*in memoriam*), por me ensinar através de seus atos, a ser forte. A Ubirajara Benício, pelo amparo e carinho que nunca serão esquecidos.

AGRADECIMENTOS

À Deus, energia positiva que me fortalece diante dos obstáculos.

Ao Dr. Zilton Andrade, pela confiança, compreensão, ensinamentos científicos e gentileza com a qual trata a todos sem distinção. Meu respeito, admiração e gratidão.

À Dra. Sheilla Andrade, pela gentileza e disposição com a qual se doou para o desenvolvimento de parte deste trabalho. Minha gratidão.

À Dra. Márcia Souza, pelo agradável convívio e por viabilizar as diversas solicitações.

À doutoranda Ana Cristina, pela realização das imuno-histoquímicas e alegre convivência.

À mestranda Ana Flávia Gottschall, pela parceria nos experimentos e pela preciosa amizade.

À doutoranda Elisângela Trindade, pela graciosa atenção e orientação em diversos momentos dos experimentos.

Ao doutorando Thiago Almeida, pelas preciosas sugestões relacionadas à imuno-histoquímica.

A Antônio Carlos, por me apresentar ao Laboratório de Patologia Experimental (LAPEX), pelo auxílio técnico e descontração.

Aos colegas do LAPEX, Manuela Caldas, Florisvaldo Ramos, Samaly Souza, Everton Batista, Leonardo Cedraz, Tiago Landin, Marcelo Silva, Isabela Núñez e Juliana Argôlo pela troca de experiências e momentos de descontração.

Aos estudantes de iniciação científica, Luciano, Mariana, Tamires, pelo agradável convívio. Em especial à Fernanda Amália, pelo suporte nos experimentos com animais.

À Dra Sônia Andrade e colegas do Laboratório de Chagas Experimental, Autoimunidade, e Imunologia Celular (LACEI), pela parceria e excelente convivência.

Aos professores e colegas da pós-graduação, pelo maravilhoso convívio, aprendizado e oportunidade de fazer novos amigos.

Ao professor Paulo Mafalda, pelos ensinamentos estatísticos.

Às minhas sobrinhas, Laís, Talita e Izana pela colaboração neste trabalho.

Aos amigos, Valter, Érica, Leda, Dany, Patrícia e Cláudia, pela amizade duradoura.

À Coordenação de Ensino do curso de Pós-Graduação em Patologia (PGPAT), por viabilizar os serviços solicitados.

Às equipes dos Serviços de Histotecnologia e Microscopia do Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz (CPqGM), pela realização das técnicas e disponibilidade dos equipamentos solicitados.

Aos funcionários do Biotério do CPqGM, pelos cuidados dispensados aos animais utilizados neste trabalho.

Aos funcionários da Biblioteca Eurydice Pires de Sant'Anna (BEPS), pela atenção e dedicação na prestação dos serviços.

Ao CPqGM e à Universidade Federal da Bahia (UFBA), pelo apoio institucional.

Ao CNPq, pelo apoio financeiro.

“Mesmo quando tudo parece desabar, cabe a mim decidir entre rir ou chorar, ir ou ficar, desistir ou lutar; porque descobri, no caminho incerto da vida, que o mais importante é o decidir”

Cora Coralina

“Tudo parece impossível até que seja feito.”

Nelson Mandela

RESUMO

AVALIAÇÃO DO PAPEL DAS CÉLULAS ESTRELADAS HEPÁTICAS, CÉLULAS ENDOTELIAIS SINUSOIDAIS E MACRÓFAGOS TIPO II, NO REMODELAMENTO PÓS-QUIMIOTERÁPICO DAS LESÕES HEPÁTICAS NA ESQUISTOSSOMOSE MANSÔNICA EXPERIMENTAL. Na esquistossomose mansônica o fígado é o órgão alvo das agressões patogênicas, onde as lesões hepáticas caracterizam-se principalmente pela presença de granulomas periovulares e formação de fibrose periportal, além de alterações vasculares responsáveis pela hipertensão dentro do sistema venoso portal. A angiogênese precede a maioria dos casos de fibrose, onde se verifica participação direta das células estreladas hepáticas (CEH) e das células endoteliais sinusoidais (CES) que são estimuladas, principalmente por macrófagos do tipo II (M2) – ativados alternativamente. O tratamento para esquistossomose é feito pelo uso do praziquantel (PZQ), o qual é capaz de promover cura parasitológica e reparo das lesões hepáticas, todavia pouco se sabe sobre os componentes celulares envolvidos na angiogênese durante o reparo do fígado. Este trabalho teve como objetivo estudar o remodelamento das lesões hepáticas pós-tratamento e investigar a participação das CEH, CES e macrófagos M2 no processo de reparo das lesões. Após aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-CPqGM), protocolo nº 006/2011, 80 camundongos *Swiss Webster* foram utilizados, destes 70 foram infectados com 50 cercárias do *Schistosoma mansoni* e dez permaneceram intactos. Quatro meses após infecção foi realizado tratamento com PZQ (400mg/Kg) em parte dos animais infectados, formando assim três grupos: um controle, um infectado não tratado e outro infectado e tratado. Em diferentes intervalos de tempo foram realizadas três hepatectomias parciais: a primeira com quatro meses de infecção (antes do tratamento); a segunda com seis meses de infecção e dois meses de tratamento; a terceira com oito meses de infecção e quatro de tratamento. Os fragmentos hepáticos coletados foram submetidos a avaliações morfológicas e estudos imuno-histoquímicos para visualização de componentes celulares – macrófagos M2 (Ym1), CEH (α -SMA) e CES (CD31). Análises morfométricas foram realizadas para quantificação do percentual de tecido fibroso e das células imunomarcadas. Nossos resultados demonstraram que após dois meses de tratamento com PZQ foi possível observar reabsorção do tecido fibroso hepático com redução da expressão de macrófagos M2 e CEH. Quatro meses após a quimioterapia verifica-se aumento no número de células endoteliais. Esses resultados sugerem que macrófagos M2 e CEH têm participação ativa na formação do tecido fibroso, exercendo pouca influência na fase involutiva do granuloma. Todavia, a intensa proliferação de CES nos granulomas involutivos, confirma o importante papel da angiogênese no remodelamento das lesões hepáticas.

Palavra-Chave: Esquistossomose, Remodelamento, Angiogênese, Praziquantel.

ABSTRACT

EVALUATION OF THE ROLE OF HEPATIC STELLATE CELLS, ENDOTHELIAL SINUSOIDAL CELLS AND MACROPHAGES TYPE II ON POST-CHEMOTHERAPY REMODELING OF LIVER INJURIES CAUSED BY EXPERIMENTAL SCHISTOSOMIASIS. The liver is a target for pathogenic attacks during schistosomiasis, showing periovular granulomas and the formation of periportal fibrosis, besides vascular changes responsible for hypertension within portal venous system. Angiogenesis precedes most cases of fibrosis, which can be verified the presence of hepatic stellate cells (HSC) and liver sinusoidal endothelial cells (LSEC) stimulated mostly by macrophages type II (M2) – alternatively activated. Schistosomiasis treatment is based on praziquantel (PZQ), which enables parasitological cure and resolution of liver cells. However, knowledge regarding active cell components on angiogenesis during liver regeneration is scarce. Our goal was to study the remodeling of liver injuries during post-treatment phase and investigate the role of HSC, LSEC and macrophages (M2) on the process of resolution of injuries. After the approval of ethical committee for animal research of the CPQGM-FIOCRUZ, record number 006/2011, 80 mice Swiss Webster were used, which 70 were infected by 50 cercariae of *Schistosoma mansoni* and ten remained intact. Four months after infection a treatment with PZQ (400mg/Kg) was started in part of infected animals, constituting three different groups: normal, non-treated infected and treated and infected. In different times three partial hepatectomies were made: the first on four months of infection (before treatment); the second with six months of infection and two months of treatment; and the third with eight months of infection and four months of treatment. In all liver fragments collected for morphological evaluations were performed and immunohistochemistry studies were made to visualize macrophages M2 (Yml), HSC (α -SMA) and LSEC (CD31). Morphometric analysis was performed to quantify percentage of fibrosis and the immunostaining cells. Our results show that after two months of PZQ treatment it is possible to observe fibrosis resorption in the liver, with reduction of macrophages M2 expression and HSC. Four months after chemotherapy an increase on the number of LSEC was verified. These results suggest that macrophages M2 and HSC are active on the formation of fibrosis tissue, playing little influence on the evolving phase of the granuloma. Nevertheless, intense proliferation of LSEC observed on involute granulomas confirm the important role for angiogenesis on remodeling of liver injuries.

keyword: Schistosomiasis, Remodeling, Angiogenesis, Praziquantel.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Desenho Experimental. Salvador, Bahia, 2013.....	32
Figura 2	Aspectos morfológicos do fígado de camundongos tratados e não tratados para esquistossomose.....	42
Figura 3	Aspectos morfológicos e morfométricos da fibrose hepática em camundongos tratados e não tratados para esquistossomose.....	43
Figura 4	Caracterização das fibras elásticas que compõe a estrutura vascular hepática em camundongos tratados e não tratados para esquistossomose.....	44
Figura 5	Expressão de CEH ativadas nos granulomas hepáticos de camundongos tratados e não tratados para esquistossomose.....	45
Figura 6	Expressão de CES nos granulomas hepáticos de camundongos tratados e não tratados para esquistossomose.....	46
Figura 7	Expressão de macrófagos M2 nos granulomas hepáticos de camundongos tratados e não tratados para esquistossomose.....	47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	<u>Apresentação dos anticorpos primários, clones, diluição e fabricante. Salvador, Bahia, 2013</u>	35
----------	--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µm	Unidade de medida de tamanho micrômetros
mm²	Unidade de medida de tamanho milímetro quadrado
mg	Unidade de medida de massa miligrama
Kg	Unidade de medida de massa kilograma
%	Unidade de valor percentual
Arg-1	Arginase-1
α-SMA	Do inglês, <i>alpha - Smooth Muscle Actin</i>
CD31	Glicoproteína presente nas células endoteliais
CES	Célula Endotelial Sinusoidal
CEH	Célula Estrelada Hepática
Cols	Colaboradores
DAB	Diaminobenzidina
Fizz-1	Proteína expressa em macrófagos alternativamente ativados (tipo II)
GFAP	Do inglês, <i>Glial Fibrillary Acidic Protein</i>
HE	Hematoxilina e Eosina
IL-2	Interleucina-2
IL-4	Interleucina-4
IL-5	Interleucina-5
IL-10	Interleucina-10
IL-13	Interleucina-13
INF-γ	Interferon gama
iNOS	Do inglês, <i>Inducible Nitric Oxide Synthase</i>
M1	Macrófago classicamente ativados (tipo I)
M2	Macrófago alternativamente ativados (tipo II)
M2a	Macrófago alternativamente ativados -a
M2b	Macrófago alternativamente ativados -b
M2c	Macrófago alternativamente ativados -c
MEC	Matriz Extracelular
MMP	Do inglês, <i>Matrix Metalloproteinase</i>
NASH	Do inglês, <i>Nonalcoholic Steatohepatitis</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
PDGF	Do inglês, <i>Platelet Derived Growth Factors</i>
PBS	Do inglês, <i>Phosphate Buffered Saline</i>
PZQ	Praziquantel
SEA	Do inglês, <i>Soluble Egg Antigens</i>
<i>S. mansoni</i>	<i>Schistosoma mansoni</i>
<i>S. japonicum</i>	<i>Schistosoma japonicum</i>
T CD4+	Linfócito T que expressam glicoproteínas CD4
T CD8+	Linfócito T que expressam glicoproteínas CD8
TNF-α	Do inglês, <i>Tumor Necrosis Factor alpha</i>
TGF-β	Do inglês, <i>Transforming Growth Factor beta</i>
TIMP	Do inglês, <i>Tissue Inhibitor of Metalloproteinases</i>

Th1	Do inglês, <i>T helper 1</i>
Th2	Do inglês, <i>T helper 2</i>
VEGF	Do inglês, <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
WHO	Do inglês, <i>World Health Organization</i>
Ym1	Quinase expressa em macrófagos alternativamente ativados

,

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
1.1	JUSTIFICATIVA.....	18
2	REVISÃO DA LITERATURA	19
2.1	FIBROSE HEPÁTICA.....	19
2.1.1	Reversibilidade da Fibrose	21
2.2	ANGIOGÊNESE E FIBROSE.....	22
2.3	ESQUISTOSSOMOSE MANSÔNICA	23
2.3.1	Epidemiologia e Transmissão	23
2.3.2	Patogenia	24
2.3.3	Resposta Imune	26
2.3.4	Tratamento	28
3	OBJETIVOS	30
3.1	OBJETIVO GERAL.....	30
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	30
4	MATERIAIS E MÉTODOS	31
4.1	CONSIDERAÇÕES ÉTICAS.....	31
4.2	ANIMAIS.....	31
4.3	MODELO EXPERIMENTAL.....	31
4.4	GRUPOS EXPERIMENTAIS.....	32
4.4.1	Grupo Controle	32
4.4.2	Grupos Infectados: Tratados e Não Tratados	32
4.4.2.1	Infecção.....	32
4.4.2.2	Hepatectomia Parcial.....	33
4.4.2.3	Tratamento.....	33
4.4.2.4	Mortalidade.....	33
4.5	ANESTÉSICO.....	34
4.6	HISTOPATOLÓGIA.....	34
4.7	IMUNO-HISTOQUÍMICA.....	34
4.8	MORFOMETRIA.....	35
4.9	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	35

5	RESULTADOS.....	37
5.1	ANÁLISE MORFOLÓGICA E MORFOMÉTRICA DO FÍGADO.....	37
5.1.1	Grupo Controle	37
5.1.2	Grupo Infectado Não Tratado.....	37
5.1.3	Grupo Infectado e Tratado	38
5.1.4	Análise Morfométrica da Fibrose Hepática nos Grupos.....	38
5.2	ANÁLISE DA IMUNO-HISTOQUÍMICA	39
5.2.1	Grupo Controle	39
5.2.2	Grupo Infectado Não Tratado.....	39
5.2.3	Grupo Infectado e Tratado	40
5.2.4	Análise Morfométrica da Imuno-histoquímica nos Grupos.....	40
6	DISCUSSÃO.....	48
7	CONCLUSÃO.....	55
	REFERÊNCIAS.....	56

1 INTRODUÇÃO

O fígado desempenha diversas funções que contribuem para a homeostase do organismo, por exemplo, metabolismo de macromoléculas, armazenamento de vitaminas e ferro e desintoxicação (GAYTO & HALL, 2011). Entretanto, está suscetível a diversos agentes agressores como infecções virais, auto-imunidade, dieta, químicos e infecções parasitárias (WALLACE *et al.*, 2008). Nas doenças hepáticas crônicas ocorre síntese exagerada da matriz extracelular (MEC), não acompanhada, na mesma intensidade, pela degradação, logo há acúmulo de MEC no tecido hepático, processo patológico ao qual se denomina de fibrose hepática (BURT, 1993). Contudo, a reversibilidade da fibrose é possível desde que ocorra a remoção do agente etiológico (ANDRADE, 2005).

No Brasil, a esquistossomose é uma infecção causada pelo helminto *Schistosoma mansoni* e tem o fígado como alvo de agressão patogênica (ANDRADE, 2009). A esquistossomose mansônica caracteriza-se pela presença de granulomas periovulares e formação de fibrose periportal, além de alterações vasculares responsáveis pela hipertensão dentro do sistema venoso portal (ANDRADE *et al.*, 2006; ANDRADE, 2004).

Na esquistossomose mansônica observa-se a proliferação de capilares sanguíneos durante a formação dos granulomas periovulares (LEMOS & ANDRADE, 2010). Esse processo angiogênico parece ter importância no desenvolvimento da doença, estando associado ao reparo das lesões hepáticas meses após o tratamento curativo da esquistossomose (ABDEL FATTAH & AHMED, 2012; ANDRADE *et al.*, 2006). Para formação de um novo capilar dois elementos celulares são imprescindíveis: as células endoteliais e os pericitos (ARMULIK *et al.*, 2005). As células endoteliais se organizam em estruturas tubulares, que são envolvidos e estabilizados pelos pericitos, formando assim, um novo capilar (LEE *et al.*, 2007). Contudo, nas lesões hepáticas os pericitos – representados pelas células estreladas hepáticas (CEH) – se desprendem da parede do vaso neo formado, adquirem fenótipo de miofibroblastos e passam a depositar matriz extracelular na região com lesão (LEE *et al.*, 2007). Estudos também revelaram participação da angiogênese durante o processo de involução dos granulomas esquistossomóticos hepáticos pós-quimioterapia e estes sugerem investigações mais acuradas sobre o papel desempenhado pelos pericitos durante o reparo das lesões hepáticas (ABDEL FATTAH & AHMED, 2012; ANDRADE *et al.*, 2006).

Na infecção pelo *S. mansoni*, os antígenos solúveis de ovos (SEA) estimulam as células de Kupffer que, de forma autócrina e parácrina, induzem ativação alternativa de macrófagos

que induzem ativação de CEH e de células endoteliais sinusoidais (CES), contribuindo para angiogênese e fibrogênese esquistossomótica (PEREIRA *et al.*, 2013; BARRIE, *et al.*, 2012). Na esquistossomose crônica, os macrófagos tipo II (M2) – ativados alternativamente – desempenham funções anti-inflamatórias, participam da cicatrização de feridas e fibrose (PEARCE & MACDONALD, 2002), também induz ativação de CEH e CES (PEREIRA *et al.*, 2013). Estudos que visem um maior entendimento da população de macrófagos envolvida na fase de resolução da esquistossomose são de suma relevância para compreender as funções desempenhadas por estas células durante o processo de reparo (BARRON & WYNN, 2011).

1.1 JUSTIFICATIVA

O tratamento feito pelo uso do praziquantel (PZQ) é capaz de promover a cura parasitológica e o reparo das lesões hepáticas na esquistossomose. Apesar da eficácia do tratamento curativo a pesquisa investigativa estava voltada para as fases aguda e crônica da doença. Os poucos estudos relacionados ao estágio de resolução da doença estavam concentrados na degradação/reabsorção do tecido fibroso hepático e na patogenia, com análise limitada às alterações vasculares hepáticas e componentes celulares. Este direcionamento pode ser explicado pela falsa ideia de que a fibrose era a única responsável pelos distúrbios hepáticos.

Considerando a participação da angiogênese também durante a fase de resolução das lesões esquistossomóticas e sua possível relação com o remodelamento do tecido conjuntivo e da arquitetura vascular (ANDRADE *et al.*, 2006; ANDRADE & SANTANA, 2010), surgiu o interesse de investigar a participação das CEH, CES e macrófago M2 nos granulomas esquistossomóticos durante a fase resolução.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 FIBROSE HEPÁTICA

O fígado é um órgão com elevado metabolismo, sendo responsável pela síntese, armazenamento, excreção e secreção de diversas substâncias, estes processos são vitais para o indivíduo (GAYTO & HALL, 2011). Apesar de sua importância na homeostasia do organismo, o fígado é vulnerável a uma série de agressões, tais como, infecção viral (hepatite B, C e D), doenças auto-imunidade (cirrose biliar primária, hepatite auto-imune), doenças hereditárias (fibrose cística, hemocromatose hereditária), dieta (doença do fígado gorduroso não alcoólica), substâncias químicas (hepatite alcoólica) (WALLACE *et al.*, 2008) e infecção parasitária (esquistossomose, capilaríase hepática) (ANDRADE, 2005).

Lesões crônicas do fígado, causadas por diversas etiologias, induzem a formação de fibrose hepática (IWAISAKO *et al.*, 2012). Esta resposta de cicatrização é caracterizada pelo acúmulo de proteínas da matriz extracelular (MEC), incluindo colágeno fibrilar (BATALLER & BRENNER, 2005). No fígado normal, a MEC é um substrato dinâmico regulado pela síntese e degradação de seus componentes (HERNANDEZ-GEA & FRIEDMAN, 2011). Entretanto, durante uma lesão há destruição tecidual substancial e, conseqüentemente, à fibrogênese sobrepõe a fibrólise (ANDRADE, 2005; ANDRADE, 2008), aumentando a deposição de colágeno que substitui as células danificadas e forma fibrose.

As mudanças quantitativas e qualitativas na composição da MEC são inerentes à fibrose hepática. Normalmente, a MEC – constituída por colágeno (I, III, IV e VI), elastina, ácido hialurônico e glicoproteínas estruturais – correspondem a menos de 3% da área de uma secção histológica do fígado (HERNANDEZ-GEA & FRIEDMAN, 2011), mas durante lesões crônicas pode aumentar em cerca de 06 vezes seus componentes (BATALLER & BRENNER, 2005), principalmente, colágeno I e III e fibronectina (HERNANDEZ-GEA & FRIEDMAN, 2011).

Os diferentes padrões de lesão do fígado podem levar a graus variados de alterações hepáticas (ALVES & MELLO, 2011). Se a lesão for aguda as alterações são passageiras, visto que, as células lesionadas são substituídas por células regeneradas, a pouca matriz fibrosa produzida é degradada e o fígado restaura sua composição normal. No entanto, se a lesão persiste a regeneração do fígado falha e há uma progressiva substituição do parênquima hepático por tecido cicatricial, acompanhado de alterações vasculares, podendo progredir para o estágio de cirrose (HERNANDEZ-GEA & FRIEDMAN, 2011).

A resposta inicial à lesão hepática é o recrutamento de células inflamatórias que secretam citocinas reguladoras da resposta inflamatória. Alguns destes mediadores – fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento transformante-beta (TGF- β), fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α), fator de crescimento vascular endotelial (VEGF), entre outros – desempenham um importante papel na fibrogênese hepática, pois, estimulam à proliferação, migração e ativação de células produtoras de MEC, principalmente, as CEH (HERNANDEZ-GEA & FRIEDMAN, 2011; LEE & FRIEDMAN, 2011).

A fibrose hepática despertou maior interesse na década de 1980, quando as CEH conhecidas como células de Ito ou células perisinusoidais, foram identificadas como as principais produtoras de colágeno no fígado (FRIEDMAN *et al.*, 1985). Este tipo de célula, foi descrita por von Kupffer em 1876 como *sternzellen* (célula em forma de estrela) do fígado (HENDERSON & FORBES, 2008) e residem no espaço de Disse entre os hepatócitos e os sinusóides. Atualmente, as CEH permanecem como a principal, mas, não única, via celular de fibrogênese hepática (IWAISAKO *et al.*, 2012). Além das CEH, os fibroblastos portais (IWAISAKO *et al.*, 2012), os fibrócitos circulantes (KISSELEVA *et al.*, 2006), as células da medula óssea (FORBES *et al.*, 2004; RUSSO *et al.*, 2006) e as células da transição epitélio-mesenquimal (CHOI & DIEHL, 2009), também participam da fibrogênese hepática. Segundo Bataller & Brenner (2005), a importância de cada tipo celular na fibrogênese hepática pode está associada ao local da lesão, assim, enquanto as CEH são as principais produtoras de colágeno em áreas pericentrais os miofibroblastos portais predominam nas lesões em torno dos tratos portais.

As CEH são pericitos que, em estado de quiescência, estocam vitamina A e lipídio, secretam componentes da MEC em pequenas quantidades (CABALLERO MENDONZA *et al.*, 1999; BROWN *et al.*, 2006) e expressam proteínas do citoesqueleto a exemplo da proteína glial fibrilar ácida (GFAP) (GARD *et al.*, 1985) e desmina (Yokoi *et al.*, 1984). Após dano hepático, as CEH quiescentes tornam-se o principal alvo das citocinas fibrogênicas e se diferenciam em miofibroblastos (BURT 1993; IWAISAKO *et al.*, 2012). Ativadas, as CEH proliferam, liberam vitamina A e lipídio, adquirem contratilidade, expressam marcadores para alfa-actina de músculo liso (α -SMA), secretam citocinas pró-inflamatórias e aumentam a produção dos componentes da MEC, principalmente, colágeno I e III (BURT, 1993; FRIEDMAN, 1999).

2.1.1 Reversibilidade da Fibrose

A fibrose hepática, extensa e de longa duração, foi considerada por muito tempo um processo irreversível (ANDRADE, 2005). Na década de 1970 surgiram os primeiros relatórios clínicos relacionados ao potencial de reversibilidade da fibrose hepática avançada (SOYER *et al.*, 1976). Atualmente, não há dúvidas sobre a regressão de qualquer tipo de fibrose, bastando para isso remover o agente etiológico (ANDRADE, 2005; BATALLER & BRENNER, 2005).

A regressão da fibrose hepática foi evidenciada em modelos experimentais, dentre os quais, tetracloreto de carbono (IREDALE *et al.*, 1998) e esquistossomose (ANDRADE, *et al.*, 1993). Nos seres humanos também foi registrado a regressão da fibrose nas doenças hepáticas após tratamento bem sucedido, como na hepatite crônica C e D (ARTHUR, 2002) e esteato-hepatite não-alcoólica (NASH) (DIXON *et al.*, 2004).

A degradação do colágeno é um importante mecanismo para resolução da fibrose (ARTHUR, 2002). Sendo as metaloproteinases intersticiais (MMP) as enzimas responsáveis pela degradação do colágeno fibrilar (I e III) acumulado durante lesão hepática (BATALLER & BRENNER, 2005). Este tecido fibroso torna-se progressivamente insolúvel e resiste à digestão de outras proteases devido ao espessamento dos septos fibróticos e modificações químicas na molécula de colágeno – formação de pontes de lisina, *cross-linkings* (ISSA *et al.*, 2004).

Estudos demonstraram que o aumento da atividade das MMPs, após remoção do estímulo indutor da fibrose, estava associado à redução nos níveis do inibidor tecidual de metaloproteinases (TIMPs) (IREDALE *et al.*, 1998; ISSA *et al.*, 2004; WYNN, 2007). Em paralelo ocorre redução da população de células fibrogênicas, que segundo Hernandez-Gea & Friedman (2001) é a melhor explicação válida para regressão da fibrose.

A alta expressão de TIMPs pelas CEH ativadas, durante a fibrogênese, além de inibir as MMPs, também, realizam um *feedback* positivo que mantém a sobrevivência destas células (IRADELE *et al.*, 2012). Entretanto, durante a resolução da fibrose a estimulação dos receptores de morte associada à diminuição na taxa de sobrevivência, incluindo TIMP, pode induzir a apoptose das CEH (BATALLER & BRENNER, 2005) e, conseqüentemente, a fibrólise sobrepõe a fibrogênese.

2.2 ANGIOGÊNESE E FIBROSE

Durante o desenvolvimento embrionário os vasos sanguíneos são originados a partir de células progenitoras, que formam tubos vasculares rudimentares durante a vasculogênese, e posteriormente, se desenvolvem em vasos maduros (UENO *et al.*, 2006; LEE *et al.*, 2007). Diferente da vasculogênese, a angiogênese é definida como o crescimento de novos vasos sanguíneos a partir de vasos pré-existentes. A angiogênese é fundamental para uma série de eventos fisiológicos e patológicos, tais como, reparo tecidual, ciclo ovariano, inflamação, doenças crônicas do fígado, neoplasias (VEIKKOLA *et al.*, 1999; LEE *et al.*, 2007). A angiogênese é de suma importância para regularização do fluxo sanguíneo que proporciona aporte de oxigênio, nutrientes e transporte de células de defesa para o tecido lesionado (WALSH & PEARSON, 2001; McDONALD *et al.*, 2001).

As etapas da angiogênese envolvem degradação e remodelação da membrana basal do vaso, proliferação, migração e organização de células endoteliais em estruturas tubulares, seguida do recrutamento de pericitos (ADAMS & ALITALO, 2007). Neste contexto, dois elementos celulares são imprescindíveis para formação de um capilar: as células endoteliais e os pericitos (ARMULIK *et al.*, 2005). Apesar das células endoteliais serem o tipo de célula mais reconhecido na formação de novos vasos, os pericitos também contribuem para esse processo, bem como, para estabilização e manutenção de vasos sanguíneos (LEE *et al.*, 2007). As células endoteliais estão na parte interna do microvaso em contato íntimo com os pericitos, localizados na periferia externa, envolvidos pela membrana basal (BERGERS & SONG, 2005).

O VEGF é o principal regulador positivo da angiogênese (BAERISWYL & CHRISTOFORI, 2009), produzido pelas CEH, estimula a migração e proliferação das células endoteliais de vasos pré-existentes. Em contrapartida, as células endoteliais secretam PDGF que agem nas CEH promovendo migração, proliferação e recrutamento destas células para o novo vaso (LEE *et al.*, 2007). A comunicação entre as CEH e as CES, através de mediadores, caracterizam a relação do trabalho em conjunto destas células para o processo de angiogênese e remodelamento vascular hepático (LEE *et al.*, 2007).

A angiogênese antecede a deposição de fibrose no processo de reparo tecidual em diversas doenças crônicas do fígado (LEMOES & ANDRADE, 2010, MARIA De SOUZA *et al.*, 2006). Vários estudos têm demonstrado que pericitos presentes nos capilares proliferados podem se destacar da parede do capilar e se acumular nos tecidos lesionados onde se diferenciam em miofibroblastos e passam a depositar matriz extracelular (LEE *et al.*, 2007).

Em contrapartida, estudos recentes relatam proliferação de novos vasos no tecido hepático de camundongos tratados para esquistossomose (ABDEL FATTAH & AHMED, 2012; ANDRADE *et al.*, 2006). Este papel aparentemente duplo e paradoxal da angiogênese na esquistossomose, associado à plasticidade fenotípica das CEH – contratilidade vascular, deposição de colágeno e remodelamento vascular – sugere uma possível participação destas células no remodelamento das lesões hepáticas esquistossomóticas pós-quimioterapia (ABDEL FATTAH & AHMED, 2012; ANDRADE *et al.*, 2006).

2.3 ESQUISTOSSOMOSE MANSÔNICA

2.3.1 Epidemiologia e Transmissão

A esquistossomose é uma doença parasitária que acomete cerca de 240 milhões de pessoas em 77 países e coloca em risco outras 700 milhões que vivem em áreas endêmicas, portanto ocasiona um grande impacto socioeconômico e constitui um importante problema de saúde pública (WHO, 2012). Apresenta uma ampla distribuição geográfica abrangendo regiões tropicais e subtropicais do globo, principalmente, os continentes Africanos, Asiáticos e América do Sul (CHITSULO, 2000; WHO 2012). Tem como agente etiológico o verme platelminto do gênero *Schistosoma* e as espécies com importância para medicina humana são: *Schistosoma mansoni*, *Schistosoma haematobium*, *Schistosoma japonicum*, *Schistosoma intercalatum* e *Schistosoma mekongi* (MELO & COELHO, 2010).

No Brasil, a única espécie encontrada é o *S. mansoni* que, provavelmente, foi introduzida na região nordeste durante o tráfico de escravos africanos infectados e, com os fluxos migratórios que ocorreram no país, o parasito se expandiu para outras regiões. Apenas esta espécie aqui se fixou, seguramente por ter encontrado hospedeiro intermediário suscetível e condições ambientais favoráveis (MELO & COELHO, 2010). A transmissão da esquistossomose mansônica ocorre em uma vasta área endêmica desde o estado do Maranhão até Minas Gerais, com certa penetração no estado do Espírito Santo, além disso, são relatados focos isolados no estado do Pará, Piauí, Distrito Federal, Goiás, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul (COURA & AMARAL, 2004). Calcula-se que no Brasil, atualmente, 25 milhões de pessoas vivem em área de risco e 4 a 6 milhões estejam infectadas pelo parasito *S. mansoni* (LAMBERTUCCI, 2010).

O helminto *S. mansoni* possui sexos separados, dimorfismo sexual e diferenças morfológicas acentuadas em cada estágio do ciclo biológico, o que representa uma notável

interação adaptativa entre o parasito e seus hospedeiros (MELO & COELHO, 2010). O homem é o principal hospedeiro definitivo, mas roedores e primatas podem ser infectados; contudo a transmissão da doença, numa região, depende da existência dos hospedeiros intermediários, os moluscos das espécies *Biomphalaria glabrata*, *Biomphalaria straminea* e *Biomphalaria tenagophila* (BRASIL, 2005).

A transmissão da doença inicia-se quando as fêmeas do verme – que habitam as veias mesentéricas do hospedeiro vertebrado – fazem a oviposição de aproximadamente 400 ovos/fêmea/dia (GRYSEELS, 2012, MELO & COELHO, 2010). Os ovos quando eliminados pela fêmea são ainda imaturos, necessitando 5-6 dias para o desenvolvimento do miracídio, que passa a eliminar secreções líticas e tóxicas pelos microporos presentes na casca do ovo. Estas secreções são fundamentais para que ocorra passagem do ovo para luz intestinal de onde são eliminados com as fezes. Eventualmente alguns desses ovos são carregados para a veia porta pela corrente circulatória. Fezes contendo ovos de *S. mansoni* podem contaminar coleções hídricas (rios, córregos, lagoas e açudes) e sob condições adequadas de temperatura e luz os ovos eclodem e liberam os miracídios, que migram em busca do hospedeiro intermediário, o molusco do gênero *Biomphalaria*. Quando o encontra, penetra ativamente e nos tecidos do molusco, efetuam reproduções assexuadas que posteriormente formarão novo tipo de larva, as cercárias. Estas rompem os tecidos dos moluscos e se dispersam no ambiente aquático e, ao entrarem em contato com o hospedeiro definitivo, penetram na sua pele e/ou mucosa iniciando assim o processo infeccioso humano (GRYSEELS, 2012; MELO & COELHO, 2010; BARBOSA *et al.*, 2008). Após a penetração na pele ou mucosa, a larva sofre algumas modificações e recebe o nome de esquistossômulo. Neste estágio evolutivo entra na corrente circulatória e chega aos pulmões, via coração. Dos pulmões, os esquistossômulos se dirigem para o sistema porta intra-hepático, onde se transformam em machos e fêmeas. Do fígado migram, acasalados, para as veias mesentéricas onde as fêmeas fazem a oviposição (GRYSEELS, 2012, MELO & COELHO, 2010).

2.3.2 Patogenia

A evolução e sintomatologia do processo patológico provocado pelo *S. mansoni* no hospedeiro vertebrado dependem de fatores importantes que influenciam no desenvolvimento da doença. A carga parasitária, a frequência das reinfecções, o estado imunológico e a idade do indivíduo podem ser citados como fatores determinantes da gravidade da esquistossomose mansônica (KABATEREINE *et al.*, 1999).

A patogênese da esquistossomose mansônica não está vinculada diretamente à presença dos vermes adultos no organismo, mas, sim, aos ovos eliminados pelas fêmeas. Parte destes ovos chega à luz intestinal, ficando o restante retido nos tecidos provocando reações inflamatórias. Os ovos que não se aderem ao epitélio intestinal são carregados para veia porta, e no fígado ocasiona o principal e mais importante efeito patológico da infecção (CHEN, 1991). O fígado é o foco das agressões, pois, os ovos do *S. mansoni* que chegam através da veia porta ficam retidos nas vênulas pré-sinusoidais, onde o diâmetro dos vasos não permite maior progressão. Neste ponto, substâncias líticas liberadas pelos ovos do parasito, chamadas antígenos solúveis do ovo (*Soluble Egg Antigens – SEA*), afetam, inicialmente, o endotélio vascular e, em seguida, os hepatócitos locais (LENZI *et al.*, 1998; ANDRADE, 2009). A lesão hepática é ampliada pelo sistema imune do hospedeiro e seguida por deposição excessiva de matriz extracelular (fibrose) em torno dos ovos, resultando na lesão básica da esquistossomose – o granuloma periovular (LENZI *et al.*, 1998; DE JESUS *et al.*, 2004; BURKE *et al.*, 2009).

Os granulomas esquistossomóticos que se formam no tecido hepático são lesões fibrosantes, compostas por vários tipos celulares como linfócitos, macrófagos e eosinófilos (ANDRADE, 1987; REIS *et al.*, 2001). As CEH e os macrófagos M2 assumem importante papel na fibrogênese (PEREIRA *et al.*, 2013) e as CES são responsáveis pela formação dos novos vasos (angiogênese) (LOEFFLER *et al.*, 2002; PEREIRA *et al.*, 2013). Os diversos tipos celulares envolvidos na formação do granuloma desempenham funções variadas com o objetivo de aprisionar e reter os antígenos dos ovos evitando assim, uma necrose tissular mais ampla (AMIRI *et al.*, 1992).

A fase aguda da esquistossomose é uma reação de hipersensibilidade ao esquistossômulo e a deposição inicial do ovo (LAMBERTUCCI, 2010), sendo caracterizada por dermatite cercariana e febre Katayama. Por volta da oitava semana tem-se o ápice da fase aguda, período em que há intensa resposta granulomatosa periovular e surgimento da sintomatologia – febre alta, diarreia, dores abdominais, eosinofilia e hepatoesplenomegalia (GUIGUET LEAL *et al.*, 2012; VITORINO, 2012; GRYSEELS, 2012; SOUZA *et al.*, 2011).

No curso crônico da infecção podem ocorrer dois tipos de formas clínicas: a hepatointestinal e a hepatoesplênica. A esquistossomose hepatointestinal, muito comum em áreas endêmicas, é representada histologicamente por granulomas periovulares isolados na periferia da veia porta. As manifestações clínicas leves ou assintomáticas são explicadas pela baixa carga parasitária que permite a existência de um equilíbrio entre a resposta do hospedeiro aos novos ovos e a reabsorção de lesões antigas (ANDRADE, 2004).

Com a evolução da infecção e o depósito constante de ovos aumenta a gravidade da doença, fase hepatoesplênica. O elevado número de ovos que chega ao sistema vascular intra-hepático obstrui, inicialmente, os ramos finos periféricos da veia porta e incita o aumento da pressão portal. Com a chegada contínua dos ovos há oclusão dos ramos médios e grandes, logo o número de granulomas torna-se muito grande (ANDRADE, 2004). Assim, estes granulomas podem coalescer e formar extensas áreas de fibrose no tecido hepático. Essas áreas fibrosadas ao longo dos vasos hepáticos podem levar a uma fibrose perivascular, conhecida como fibrose de Symmers (SYMMERS, 1904). A obstrução dos vasos intra-hepáticos pelos ovos de *S. mansoni* e a diminuição da luz e/ou da elasticidade dos mesmos pela fibrose resulta no aumento da pressão na veia porta. A hipertensão porta, principal complicação dessa sequência de eventos, proporciona o surgimento da esplenomegalia, circulação colateral, além de levar a formação de varizes esofagianas. Eventualmente, estas varizes esofagianas (ou gástricas) se rompem provocando fortes hemorragias, responsáveis por um número considerável de óbitos dos pacientes. (TANABE, 2003; ANDRADE, 2004; GRYSSELS *et al.*, 2006).

O depósito de fibrose nos granulomas hepáticos poderia deixar a impressão de ser esta a causa da patogenicidade da esquistossomose mansônica, pois, obstrui o fluxo sanguíneo e aumenta a pressão portal. Mas, Andrade (2005) afirma que a fibrose hepática, *per se*, apresenta pouca significância fisiopatológica e que sua gravidade está relacionada às alterações vasculares que as acompanham. As alterações vasculares hepáticas observadas são distorção e redução severa do sistema da veia porta; hiperplasia e hipertrofia do sistema arterial; contudo, o sistema venoso hepático permanece sem alterações (DA SILVA & CARRILHO, 1992; ANDRADE, 2009, 2004).

2.3.3 Resposta Imune

Os mecanismos imunológicos envolvidos na esquistossomose estão relacionados às células T CD4+ e sua diferenciação nos padrões de resposta Th1 e Th2. Nos estágios iniciais da infecção, a reação imunológica envolve células Th1 e produção das citocinas pró-inflamatórias IL-2, INF- γ em resposta aos antígenos do parasita. Entretanto, a postura dos ovos e a secreção SEA induz uma resposta Th2 com produção das citocinas IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13, que suprime a resposta pró-inflamatórias Th1 e promove a formação do granuloma esquistossomótico fibrótico, rico em eosinófilo, em torno de ovo recém-depositado (BURKE *et al.*, 2009; WILSON *et al.*, 2007; LAMBERTUCCI, 2010).

Os granulomas esquistossomóticos hepáticos sofrem alterações na constituição, tamanho e elementos celulares de acordo com as fases da infecção, sendo que na fase aguda o volume do granuloma é muito maior quando comparados com a fase crônica (FLANNERY, 2000; ANDRADE & WARREN, 1964). Este processo denominado “modulação imunológica” do granuloma esquistossomótico pode ser explicado por várias hipóteses. Entre elas a função supressora de células T (COLLEY, 1976), anticorpos antiidiotípicos (PARRA *et al.*, 1991), anergia de células T (STADECKER, 1994) e regulação por células T CD8⁺ (PEDRAS VASCONCELOS e PEARCE, 1996; FLANNERY, 2000). Assim, ao longo do tempo, os granulomas mais velhos sofrem involução e os que são formados em torno dos ovos recém-chegados são menores, apresentam pouca matriz extracelular e há predominância de macrófagos quando comparados com granulomas na fase aguda (ANDRADE, 2009).

Estudos relatam ativação diferenciada de macrófagos associada à mudança no perfil de resposta imune Th1 e Th2 na esquistossomose. As citocinas com padrão Th1 (IFN- γ , IL-12, TNF- α , IL-1 β) promovem ativação clássica de macrófagos (M1) que passam a secretar citocinas pró-inflamatórias. Em contraste, as citocinas com padrão Th2 (IL-4, IL-13, IL-21) induzem ativação alternativa de macrófagos (M2) que passam a expressar marcadores como Arg-1, Fizz-1, Ym-1 (GORDON, 2003; GORDON & MARTINEZ, 2010; BARRIE, *et al.*, 2012).

Os macrófagos M2 são subdivididos em: M2a, ativados por IL-4, IL-13, promovem inflamação do tipo Th2 nas respostas imune a parasitas e alergias; M2b, estimulado por imunocomplexos, também promovem inflamação tipo Th2 e possuem algumas propriedades de imunorregulação; e M2c, ativados por estímulos anti-inflamatórios, são macrófagos desativadores capazes de controlar a inflamação e o remodelamento do tecido (RODERO *et al.*, 2010; CASSETA *et al.*, 2011). A resposta Th2, associada à deposição de ovos no fígado, promove aumento de macrófagos M2 nos granulomas. Estas células podem auxiliar na fibrogênese tanto pela supressão de citocinas anti-fibrogênicas como pela atuação da enzima arginase-1 (STEMPIN & CERBAN, 2007; WILSON *et al.* 2007; GORDON & MARTINEZ, 2010). Estudos que visem um maior entendimento da população de macrófagos envolvidas durante a fase de resolução da esquistossomose são de suma relevância para compreender as funções desempenhadas por estas células durante o processo de reparo (BARRON & WYNN, 2011).

2.3.4 Tratamento

Entre as diversas ações adotadas para controlar a esquistossomose, o tratamento específico se mostra muito eficaz, pois, consiste na cura da doença, redução da carga parasitária, impede evolução para formas graves e minimiza a produção e eliminação dos ovos (VITORINO *et al.*, 2012). Entretanto, não impede a ocorrência de reinfecções, devendo ser associada a outros métodos de controle em áreas endêmicas (COURA & AMARAL, 2004).

Atualmente, o praziquantel (PZQ) é o único medicamento recomendado pela Organização Mundial de Saúde (OMS) para o tratamento da esquistossomose (WHO, 2002). Este fármaco surgiu na década de 70 e se tornou a droga de escolha para tratar esta parasitose por apresentar baixa toxicidade, baixo custo, maior eficácia e tolerabilidade, além de agir contra todas as espécies do gênero *Schistosoma* que afeta o homem (NOVAES *et al.*, 1999; COURA & AMARAL, 2004; CEFFREY & SECOR, 2011). Este quimioterápico revelou eficiência terapêutica tanto em animais experimentais quanto em humanos infectados por *S. mansoni* (ANDREWS, 1981).

O PZQ pertence ao grupo químico isoquinolino-pirazino e sua administração no hospedeiro vertebrado eliminam os vermes adultos, interfere na oviposição das fêmeas do parasito e provoca a mortalidade dos ovos maduros de *S. mansoni* retidos nos tecidos do hospedeiro (CUNHA, 1992; GIBODA & SMITH, 1994; LIANG *et al.*, 2002; FREZZA *et al.*, 2007). Esta droga atua, nos vermes adultos, promovendo influxo de Ca^{++} que provoca intensa contração da musculatura e paralisia do parasito, também induz alterações estruturais do tegumento tornando-os vulneráveis ao sistema imunológico do hospedeiro (PAX *et al.*, 1978; BRINDLEY & SHER, 1987; FETTERER *et al.*, 1980; MELO & COELHO, 2010). Apesar da eficácia comprovada do PZQ algumas linhagens do *Schistosoma* apresentam resistência ao medicamento e diversos estudos chamam atenção para necessidade de encontrar drogas alternativas para esquistossomose (CEFFREY & SECOR, 2011; PITTA *et al.*, 2013).

A quimioterapia com PZQ elimina o agente agressor – ovos do parasito – responsável pelas lesões hepáticas esquistossomóticas. Estudos revelaram que o tratamento para esquistossomose promove regressão da fibrose hepática, nos granulomas periovulares e da fibrose periportal, bem como, desobstrução e remodelamento das veias porta danificadas (ANDRADE, 2005; ANDRADE *et al.*, 2006; ANDRADE & SANTANA, 2010). Na esquistossomose hepatoesplênica, a consequência do remodelamento das lesões hepáticas, pós-tratamento, se traduz na desobstrução e reestruturação vascular, clinicamente na redução

da esplenomegalia, varizes esofágicas e hipertensão porta (ANDRADE, 2008; ANDRADE, 2009). Contudo, achados interessantes foram obtidos por Andrade e cols (2006) em um estudo sobre remodelamento das lesões vasculares hepáticas pós-tratamento, através da técnica de moldes plásticos de vinilite, com injeção do sistema porta. Os moldes obtidos de animais infectados, antes e depois do tratamento, revelaram que nestes últimos ocorria formação de novos vasos em regiões antes preenchida por fibrose. Inicialmente, poder-se-ia imaginar que a desobstrução dos ramos maiores e a retomada do fluxo sanguíneo exerceria uma pressão e dilataria numerosos vasos finos antes colapsados. Mas, a forte presença de fator de VEGF e CES revelam proliferação de novos vasos, ou seja, angiogênese (ANDRADE *et al.*, 2006; ANDRADE & SANTANA, 2010).

Estes dados revelaram participação da angiogênese tanto na formação quanto na regressão da fibrose, bem como, a participação das células endoteliais e pericitos em ambos os casos, provavelmente, diferenciando apenas nos fatores locais produzidos em cada situação (ANDRADE *et al.*, 2006; ANDRADE & SANTANA, 2010). Assim, este trabalho teve por objetivo avaliar o papel de componentes celulares – CEH, CES e macrófagos M2 – durante o estágio de resolução das lesões hepáticas esquistossomóticas pós-quimioterapia com PZQ.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliação do papel das células estreladas hepáticas, células endoteliais sinusoidais e macrófagos tipo II no remodelamento pós-quimioterápico das lesões hepáticas na esquistossomose mansônica experimental.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o aspecto morfológico do fígado na esquistossomose, antes e depois do tratamento com praziquantel.

- Determinar o teor de colágeno nas lesões hepáticas esquistossomóticas, antes e depois do tratamento com praziquantel.

- Avaliar a expressão de células estreladas hepáticas ativadas, células endoteliais sinusoidais ativadas e macrófagos alternativamente ativados nas lesões hepáticas esquistossomóticas, antes e depois do tratamento com praziquantel.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

O presente estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz (CPqGM/FIOCRUZ), protocolo nº 006/2011.

4.2 ANIMAIS

Foram utilizados 80 camundongos da linhagem *Swiss Webster*, de ambos os sexos, contendo, inicialmente, entre 18-20 gramas, provenientes do Biotério do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz (CPqGM/FIOCRUZ), onde permaneceram durante todo o experimento. Tais animais foram mantidos em caixas convencionais, climatização e luminosidade controlada, acesso à água e à ração padrão em regime *ad libitum*.

4.3 MODELO EXPERIMENTAL

Dos 80 animais, 70 foram infectados com 50 cercarias do *S. mansoni* (cepa de Feira de Santana) e dez permaneceram como controles não infectados. Após quatro meses de infecção foi realizado o tratamento em 58% dos animais infectados. Assim, foram formados três grupos: Controle normal; Infectado não tratado; Infectado e tratado.

Para acompanhar a evolução das lesões hepáticas esquistossomóticas entre os grupos foram realizadas três hepatectomias parciais, em diferentes períodos de tempo. A primeira foi realizada com quatro meses de infecção, ou seja, antes do tratamento. A segunda ocorreu com seis meses de infecção e dois meses de tratamento. A terceira biópsia ocorreu com oito meses de infecção e quatro meses de tratamento (Figura 1). Para cada sessão de hepatectomia parcial foram utilizados cinco animais diferentes de cada grupo estudado.

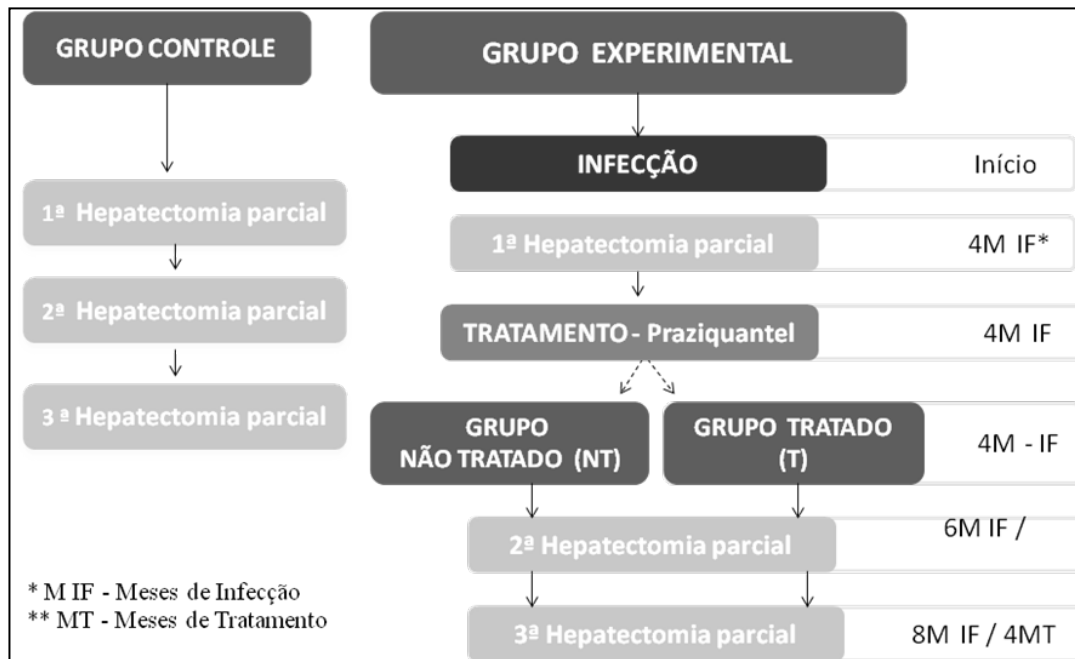


Figura 1. Desenho Experimental. Salvador, Bahia, 2013.

4.4 GRUPOS EXPERIMENTAIS

4.4.1 Grupo Controle

Constituídos por dez animais normais (não infectados e não tratados) submetidos à hepatectomia parcial nos mesmos períodos que os grupos experimentais. Este grupo foi utilizado como parâmetro de normalidade para os resultados obtidos nos grupos experimentais.

4.4.2 Grupos Infectados: Tratados e Não Tratados

4.4.2.1 Infecção

Setenta (70) animais foram infectados com 50 cercarias do *S. mansoni*, cepa de Feira de Santana, por via transcutânea. Os camundongos com os pelos previamente, umedecidos foram inseridos em frascos individuais, de boca larga e tampas aeradas, com água chegando ao nível das patas e cauda. O inóculo ajustado, anteriormente, dentro dos frascos, ficou em contato com os animais, por 30 minutos. Uma fonte de luz foi direcionada aos frascos para estimular a penetração do patógeno. Após 45 dias, a infecção foi confirmada pela presença de ovos do patógeno nas fezes dos hospedeiros.

4.4.2.2 Hepatectomia Parcial

Animais que compunham os três grupos foram submetidos à hepatectomia parcial. Anestesiados e em condições estéreis, foram submetidos a uma laparotomia e, através dela, um lobo hepático foi exposto, amarrado e retirado. Ao finalizar o procedimento, a incisão foi suturada com linha de nylon nº 4, em pontos simples. O fragmento hepático coletado foi devidamente fixado para realização das técnicas histológicas e imuno-histoquímicas.

4.4.2.3 Tratamento

Com quatro meses de infecção, 27 animais infectados receberam tratamento curativo para esquistossomose o qual consistiu de dose única, 400mg/Kg, do quimioterápico PZQ (Farmanguinhos Praziquantel, comprimidos 600 mg), diluído em salina 0,85% e administrada por via orogástrica. O grupo controle e os demais animais infectados receberam salina 0,85%, também, por via orogástrica. Assim, o grupo infectado foi subdividido em dois: grupo infectado tratado e grupo infectado não tratado.

Após o tratamento, ambos os grupos – tratados e não tratados – foram acompanhados, em dois intervalos regulares de 60 dias através da hepatectomia parcial. No grupo infectado não tratado estes intervalos equivalem a seis e oito meses de infecção. No grupo tratado estes períodos correspondem a seis meses de infecção e dois de tratamento; oito de infecção e quatro meses de tratamento. Em cada hepatectomia parcial foram utilizados cinco animais diferentes por grupo e o material biológico coletado foi submetido às técnicas a serem citadas.

4.4.2.4 Mortalidade

Quatro meses após infecção constatou-se, aproximadamente, 27% de mortalidade entre os animais infectados. Dos sobreviventes, cinco animais foram hepatectomizados parcialmente, porém, não sobreviveram ao procedimento. Dos 46 animais infectados restantes 27 foram tratados para esquistossomose e 19 passaram a fazer parte do grupo não tratado.

4.5 ANESTÉSICO

Para realização da hepatectomia parcial os animais foram anestesiados com uma solução de cloridrato de Ketamina (0,1ml), cloridrato de Xilasina (0,1ml) e salina 0,85% (0,2ml) em uma proporção de 0,05ml para cada 10g de massa corpórea.

4.6 HISTOPATOLOGIA

Os fragmentos de fígado coletados nas hepatectomias parciais foram fixados em formol Millonig (pH 7.4), desidratados, clareados e incluídos em parafina. Os blocos de parafina foram seccionados no micrótomo com espessura de 5µm. As secções foram coradas por hematoxilina e eosina (HE), evidenciando em azul o núcleo e rosa o citoplasma; picrossírios vermelho para fibras colágenas e Weigert para fibras elásticas. As lâminas geradas foram analisadas ao microscópio óptico Olympus BX 53.

4.7 IMUNO-HISTOQUÍMICA

Para realização da imunomarcção, os cortes foram inicialmente desparafinizados com xilol e re-hidratados em etanol (95% e 75%) e água destilada. A recuperação antigênica foi realizada em banho-maria, com tampão citrato pH 6,0 e para o bloqueio da peroxidase endógena foi utilizado o peróxido de hidrogênio a 3%. As proteínas teciduais foram bloqueadas com substância específica para este fim (Protein Blocking SolutionTM, Dako, Carpinteria, USA). Os anticorpos primários e, respectivos, clones e diluições podem ser visualizados na Tabela 1. Os anticorpos primários foram diluídos em solução salina fosfatada (PBS) e incubados por 16 horas (*overnight* 4⁰C). Os controles negativos continham apenas PBS. Em temperatura ambiente, o excesso do anticorpo primário foi removido com PBS/Tween e adicionou o anticorpo secundário conjugado à peroxidase. Para revelação foi utilizado 3,3-diaminobenzidina (DAB). Em seguida, os cortes foram contra-corados com Hematoxilina de Harris, desidratados em etanol e diafanizados em xilol. Para montagem das lâminas foram utilizados bálsamo do Canadá e lamínulas. A análise das lâminas geradas foi realizada em microscópio óptico Olympus BX 53.

Tabela1. Apresentação dos anticorpos primários, clones, diluição e fabricante. Salvador, Bahia, 2013.

Anticorpos Primários	Clone	Diluição	Fabricante
α -SMA	E184	1: 2000	Abcam
PECAM-1(M-20) (CD31)	Policlonal	1: 1000	Santa Cruz Biotechnology
Ym1	Policlonal	1: 5000	StemCell Technologies

4.8 MORFOMETRIA

Para realização da morfométrica foi utilizado um microscópio óptico Olympus BX53 acoplado a uma videocâmara Q Imaging – MicroPublisher, um monitor em cores, teclado e *mouse*. As imagens foram capturadas através do *Image Pro Plus™ 7.0 software* (Media Cybernetics, Inc, Silver Spring, MD), com o sistema calibrado para uma ampliação de 400X. Foram selecionados 06 campos microscópicos por lâmina de cada animal. Cada campo selecionado envolvia lesões esquistossomóticas (granulomas), exceto nos animais normais. Para mensurar a área desejada em cada imagem foi utilizado o *software Adobe® Photoshop® CS5 Extended* (Adobe systems Inc. San Jose, CA/USA).

4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os valores numéricos obtidos por medidas morfométricas foram analisados estatisticamente através dos *softwares* BioEstat, 5.0 e GraphPad Prism 5.01. A normalidade dos dados foi determinada através da análise descritiva e do teste de hipótese Shapiro-Wilk. Quando os resultados apresentavam distribuição normal foram utilizados testes paramétricos e quando a distribuição não foi normal foram utilizados testes não paramétricos.

Para análise estatística do percentual fibroso e da área ocupada pelas CES (CD31) foi utilizado o teste paramétrico ANOVA e o pós-teste de Tukey. E, para análise estatística da área ocupada pelas CEH ativadas (α -SMA) e por macrófagos M2 (Ym1) foi utilizado o teste não paramétrico Kruskal-Wallis e o pós-teste de Dunn.

O valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo para todos os testes estatísticos realizados.

5 RESULTADOS

5.1 ANÁLISE MORFOLÓGICA E MORFOMÉTRICA DO FÍGADO

Para avaliar o aspecto geral do fígado foram utilizadas colorações padrões como hematoxilina e eosina (HE), picrossírios vermelho para colágeno e a coloração especial de Weigert para fibras elásticas. A análise morfométrica foi utilizada para avaliar o percentual de fibrose hepática através da área ocupada pelas fibras colágenas coradas por picrossírios vermelho.

5.1.1 Grupo Controle

Os animais deste grupo apresentaram arquitetura hepática normal (Figura 2A) com fibras colágenas escassas e delgadas em torno dos componentes vasculares hepáticos (Figura 3A). As fibras elásticas apareceram delgadas nas paredes das veias e artérias (Figura 4A).

5.1.2 Grupo Infectado Não Tratado

O fígado dos camundongos com 04 meses de infecção, por *S. mansoni*, demonstraram grande quantidade de reações granulomatosas nos espaços porta. Tais granulomas se encontravam em estágio avançado, com intenso infiltrado inflamatório e com limites periféricos definidos. As células inflamatórias, polimorfonucleares e mononucleares, não se restringiam concentricamente à região periovular e se infiltravam no parênquima próximo à reação granulomatosa (Figura 2B). As fibras colágenas apresentavam-se em excesso, espessas e organizadas em lâminas compactas em torno dos ovos, evidenciando a fibrose periportal. Esta última contribuía para expansão dos espaços porta promovendo conexão e fusão entre espaços porta vizinhos (Figura 3B). Foram observados muitos granulomas confluentes e proliferação de ductos biliares.

Após seis meses de infecção, a hepatite perdurou nos animais, porém, com predomínio de células mononucleares (Figura 2C). As fibras colágenas apresentam-se mais espessas e compactas, tornando o granuloma periovular mais circunscrito e modelado (Figura 3C). A presença de ovos e pigmento enegrecido dos vermes foram achados constantes no interior dos granulomas hepáticos.

Seguidos oito meses de infecção os camundongos apresentaram padrões similares aos vistos com quatro e seis meses. Contudo, as reações granulomatosas tornaram-se, gradualmente, menores, com limites bem definidos e células mononucleares em grande quantidade (Figura 2D). As fibras colágenas apresentavam-se organizadas e delimitavam com nitidez os granulomas (Figura 3D). O parênquima hepático, presente entre as áreas de fibrose, apresentavam arquitetura normal em todos os pontos analisados.

Nos camundongos as lesões vasculares hepáticas evidenciadas após quatro, seis e oito meses de infecção demonstraram fibras elásticas das veias porta desorganizadas, fragmentadas e, por vezes, em múltiplas camadas concêntricas aos ovos (Figura 4B-C). Fragmentos das fibras elásticas foram observados no interior de reações granulomatosas. A descontinuidade das fibras elásticas presentes na parede das veias porta e o preenchimento da luz vascular por tecido inflamatório e fibrose evidencia a destruição dos vasos em decorrência da ação dos ovos (Figura 4B-D). Nas veias porta de menor calibre foi possível observar delgados filamentos de fibras elásticas contornando a reação granulomatosa (Figura 4B-D). A organização das fibras elásticas nas artérias hepáticas foi preservada.

5.1.3 Grupo Infectado e Tratado

Nos animais submetidos ao tratamento com PZQ foi verificada involução das lesões hepáticas, evidenciada por redução da área ocupada pelas reações granulomatosas, decréscimo do infiltrado inflamatório e dos ductos biliares. A fibrose portal diminuiu em extensão e densidade, tornando as conexões entre os espaços porta cada vez mais discretas. Após dois e quatro meses de tratamento verificou-se, no fígado dos camundongos, granulomas involutivos contendo em seu interior casca de ovos ou restos de ovos calcificados (Figura 2E-F), tecido fibroso com fibras colágenas fragmentadas, áreas focais de dissolução e aspecto frouxo (Figura 3E-F), os pigmentos escuros dos vermes permaneceram na fase de resolução das lesões (Figuras 2E-F e 3E-F).

O reparo vascular hepático, nos animais tratados, foi marcado pela desobstrução da luz dos vasos que se tornaram numerosos, dilatados, congestionados e com paredes delgadas (Figura 4E-F). A organização das fibras elásticas variou de acordo com o diâmetro dos vasos, ou seja, vasos de grande calibre mantinham duplicação das fibras elásticas, enquanto vasos vizinhos, de menor calibre, apresentavam camadas delgadas destas fibras. Todavia, a organização das fibras elásticas em torno dos vasos ainda era irregular e podia-se notar a descontinuidade

destas em alguns vasos. Fragmentos de fibras elásticas presentes nas reações granulomatosas foram verificados, apenas, ao redor de alguns vasos que mantinham duplicação das fibras.

5.1.4 Análise Morfométrica da Fibrose Hepática nos Grupos

A análise morfométrica revelou aumento significativo de colágeno nos animais submetidos à infecção por *S. mansoni* ($p < 0,001$). No grupo infectado e não tratado houve redução gradativa do percentual de colágeno ao longo dos meses de infecção, os dados foram significativos quando comparados os animais com quatro e oito meses de infecção ($p < 0,001$) (Figura 3G). No grupo submetido ao tratamento para esquistossomos houve redução de colágeno, contudo os valores não foram significativos quando comparamos os grupos tratados e não tratados com mesmo tempo de infecção ($p > 0,05$) (Figura 3G).

5.2 ANÁLISE DA IMUNO-HISTOQUÍMICA

As imunomarcações para α -SMA, CD31 e Ym1 foram empregadas para identificar e avaliar, respectivamente, CEH ativadas, CES e macrófagos M2 nas lesões hepáticas. Os dados quantitativos destas imunomarcações foram obtidos através da morfometria e análise estatística.

5.2.1 Grupo Controle

Neste grupo, houve expressão de α -SMA, exclusivamente, na parede dos vasos portais e veias centrolobulares (Figura 5A). Enquanto, a marcação para CD31 foi expressa nas células endoteliais vasculares (veias e artérias) e CES revelando arquitetura vascular hepática normal (Figura 6A). A imunomarcação para Ym1 demonstrou ausência de macrófagos M2 no tecido hepático (Figura 7A).

5.2.2 Grupo Infectado Não Tratado

Neste grupo, verificou-se a expressão de CEH ativadas nos granulomas e, por vezes, no parênquima hepático. A presença simultânea de granulomas positivos e negativos para CEH ativadas foi um achado constante nos tecidos hepáticos em todos os pontos de infecção analisados (Figura 5B-D). Também houve expressão das CES nos granulomas hepáticos com

predomínio na região periférica e, por vezes, no interior de alguns granulomas recém-formados. Colares vasculares foram verificados em torno de alguns granulomas, assim como, proliferação vascular em áreas de confluência entre granulomas (Figura 6B-D). Adicionalmente, houve expressão de macrófago M2 na região central dos granulomas. Estas células margeavam os ovos que continham miracídios em seu interior, além de aparecer envolvidas aos fragmentos dos ovos em outros granulomas. O parênquima hepático apareceu livre de marcação, assim, como a periferia da maioria dos granulomas (Figura 7B-D).

5.2.3 Grupo Infectado e Tratado

O tratamento com PZQ favoreceu a redução de macrófagos M2 nas lesões hepáticas, principalmente, nos períodos mais avançados do tratamento. Dois meses após o tratamento ainda havia poucos granulomas expressando macrófagos M2 em seu interior, entretanto quatro meses após o tratamento as lesões esquistossomóticas não apresentavam estas células, exceto em alguns pontos esporádicos (Figura 7E-F). Resultado semelhante foi observado em relação às CEH ativadas, as quais não mais se expressavam na maior parte granulomas involutivos (Figura 5E-F). Em contraste, houve aumento na proliferação de CES nos interior dos granulomas involutivos hepáticos. A imunomarcação para estas células tornou-se mais expressiva nos granulomas quatro meses após tratamento; microvasos foram identificados em toda área granulomatosa e região de fibrose no fígado (Figura 6E-F).

5.2.4 Análise Morfométrica da Imuno-histoquímica nos Grupos

Através da análise morfométrica foi possível verificar aumento na expressão das CEH ativadas no fígado dos camundongos infectados por *S. mansoni* em relação ao grupo controle ($p < 0,05$). No entanto, houve redução gradativa destas células nos granulomas à medida que a infecção se tornava longa, embora não houve significância estatística entre os diferentes pontos de infecção observados ($p > 0,05$). O tratamento com PZQ favoreceu uma redução mais acentuada da expressão destas células no tecido hepático, todavia os resultados não foram estatisticamente significativos quando comparou os grupos tratados e não tratados ($p > 0,05$) (Figura 5G). Resultados semelhantes foram obtidos com os macrófagos M2, pois houve diferença estatística significativa entre o grupo controle e o grupo infectado não tratado ($p < 0,05$). O tratamento também promoveu decréscimo estatisticamente significativo dos macrófagos M2, principalmente, nos períodos mais avançados do tratamento ($p < 0,05$) (Figura

7G). Por outro lado, os dados demonstraram aumento na expressão das CES nos granulomas do grupo infectado e não tratado, todavia não houve diferença estatística quando comparados com o grupo controle ($p > 0,05$). Em oposição aos resultados obtidos com as CEH e os macrófagos M2, houve aumento na expressão das CES nos granulomas involutivos hepáticos no grupo tratado, embora não seja estatisticamente significativo quando comparado com o grupo não tratado ($p > 0,05$); a exceção foi verificada entre dois pontos de observação (06 meses de infecção e 04 meses pós-tratamento) onde houve significância estatística antes e depois do tratamento ($p < 0,01$) (Figura 6G).

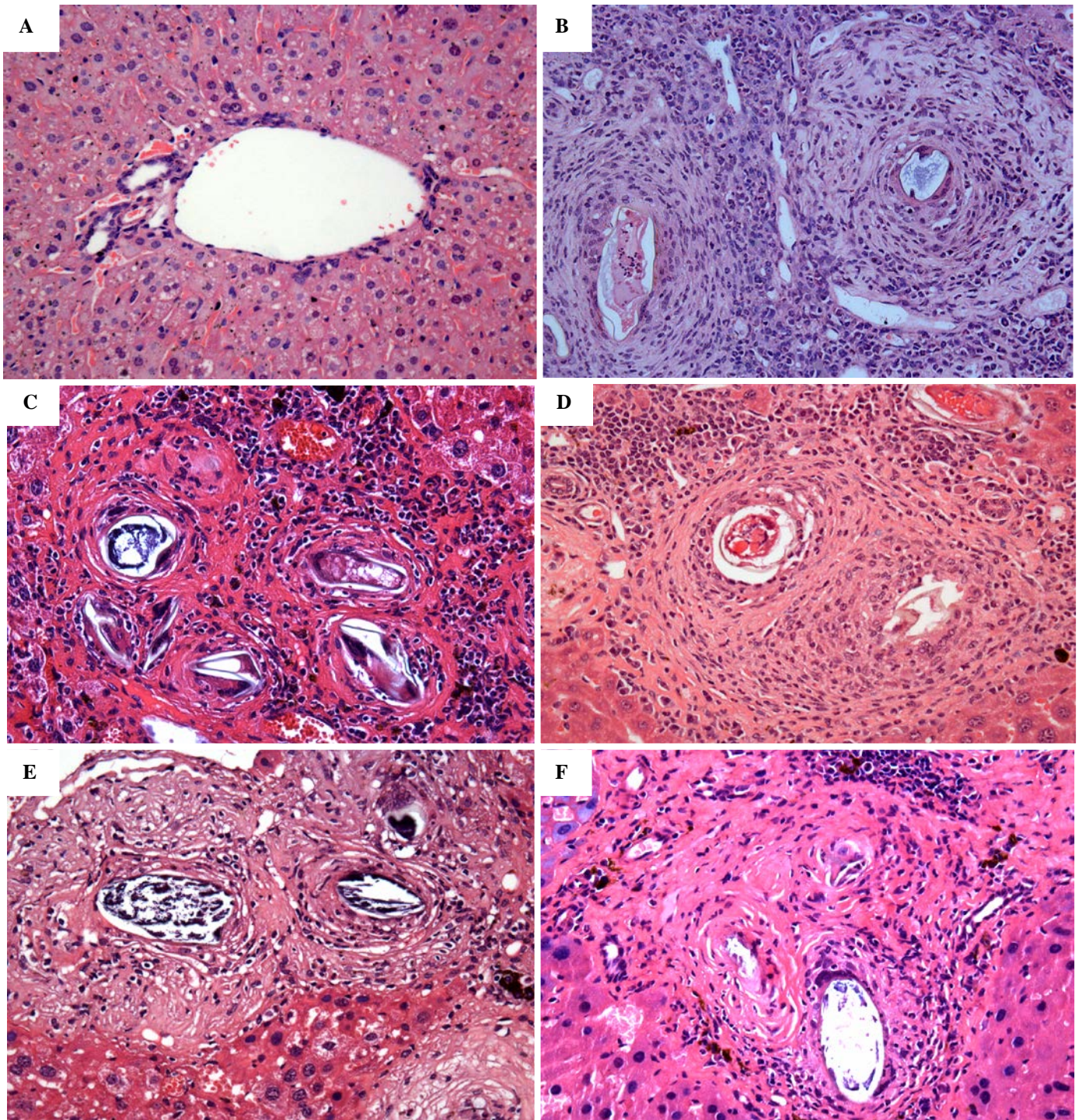


Figura 2. Aspectos morfológicos do fígado de camundongos tratados e não tratados para esquistossomose. (A) Grupo controle. Destaque para o espaço porta e representação da arquitetura hepática normal. (B, C, D) Grupo infectado por *S. mansoni* (NT), respectivamente, quatro, seis e oito meses de infecção. As reações granulomatosas periovulares e fibrose periportal tornaram-se menores, mais circunscritas e com predomínio de células mononucleares a medida que a infecção se tornava longeva. (E, F) Grupo tratado com PZQ (T), respectivamente, dois e quatro meses pós-tratamento. Representa granulomas involutivos contendo em seu interior casca de ovos ou mesmo restos de ovos calcificados, redução do infiltrado inflamatório e da área ocupada pela fibrose. (HE, 400X). (NT = animais não tratados; T = animais tratados).

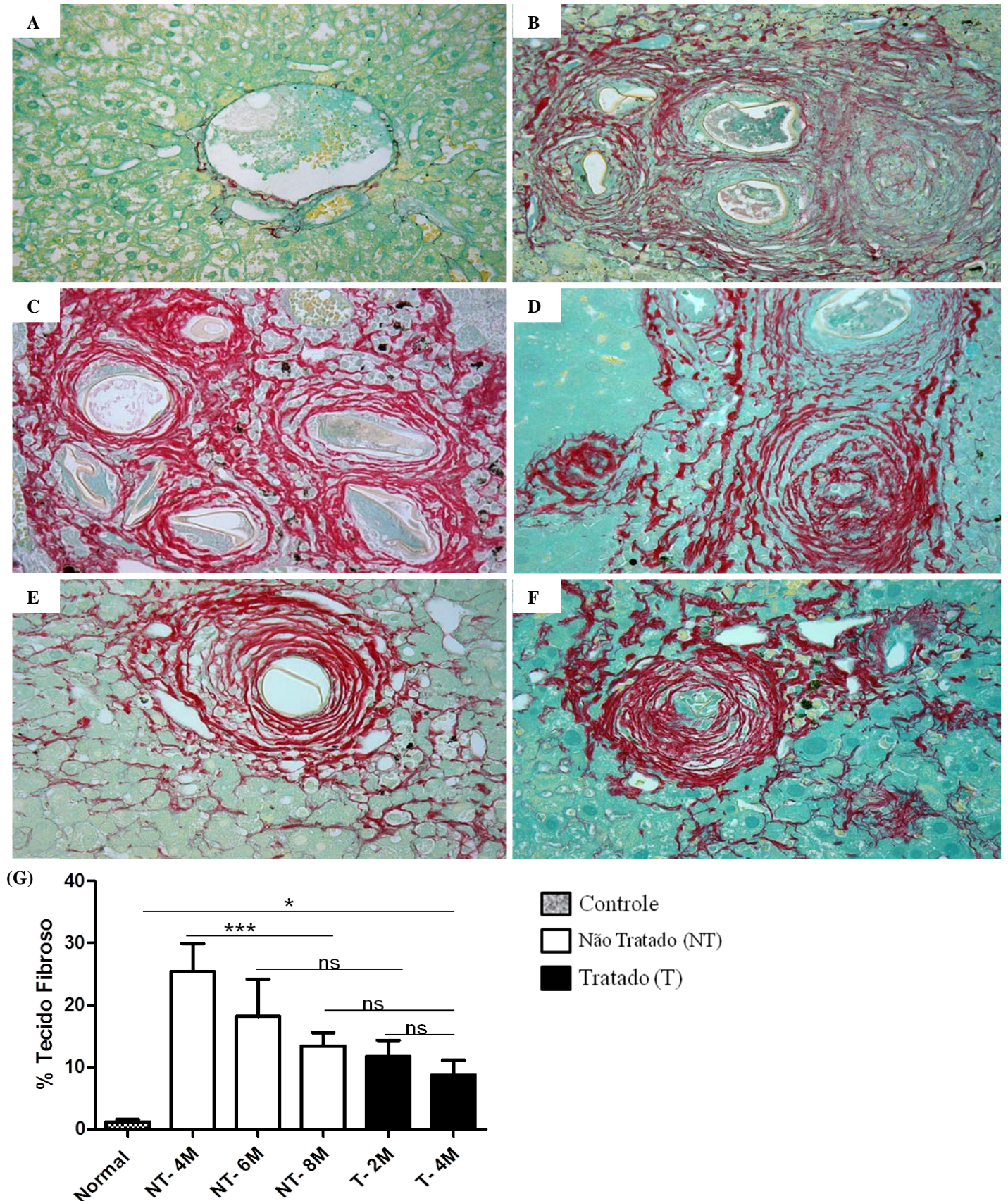


Figura 3. Aspectos morfológicos e morfométricos da fibrose hepática em camundongos tratados e não tratados para esquistossomose. (A) Grupo controle. Demonstra fibras colágenas escassas e delgadas em torno das estruturas vasculares. (B, C, D) Grupo infectado por *S. mansoni* (NT) - quatro, seis e oito meses de infecção. Destacam fibras colágenas espessas e em excesso ao redor dos ovos, ampliando o espaço porta e evidenciando a fibrose periportal. (E, F) Grupo tratado com PZQ (T) - dois e quatro meses pós-tratamento. Representam granulomas com fibras colágenas fragmentadas (Picosírios, 400X). (G) O tratamento para esquistossomose favoreceu a regressão do tecido fibroso (* p < 0,05; *** p < 0,001; ns = não significativo). (NT = animais não tratados; T = animais tratados).

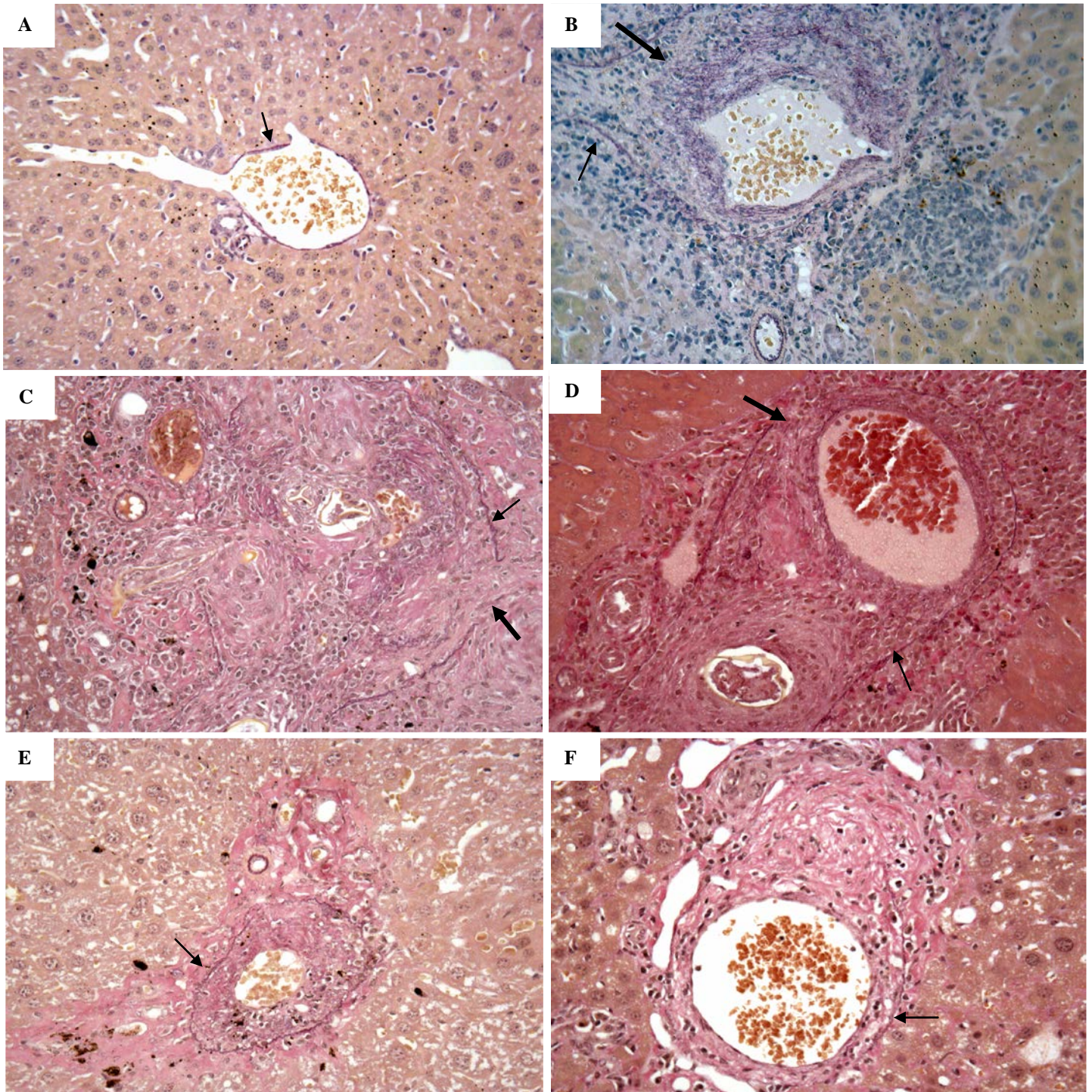


Figura 4. Caracterização das fibras elásticas que compõe a estrutura vascular hepática em camundongos tratados e não tratados para esquistossomose. (A) Grupo controle. Revela fibras elásticas (setas finas) íntegras e organizadas compondo a parede das veias e artérias. (B, C, D) Grupo infectado por *S. mansoni* (NT), respectivamente, quatro, seis e oito meses de infecção. As lesões vasculares são evidenciadas pela descontinuidade e desorganização das fibras elásticas que compõem as paredes das veias portas, bem como, o preenchimento da luz dos vasos por tecido inflamatório e fibrose (setas grossas). (E, F) Grupo tratado com PZQ (T), respectivamente, dois e quatro meses pós-tratamento. O reparo vascular é caracterizado por desobstrução da luz das veias portas que aparecem dilatadas, congestionadas e com paredes delgadas. (Weigert, 400X). (NT = animais não tratados; T = animais tratados).

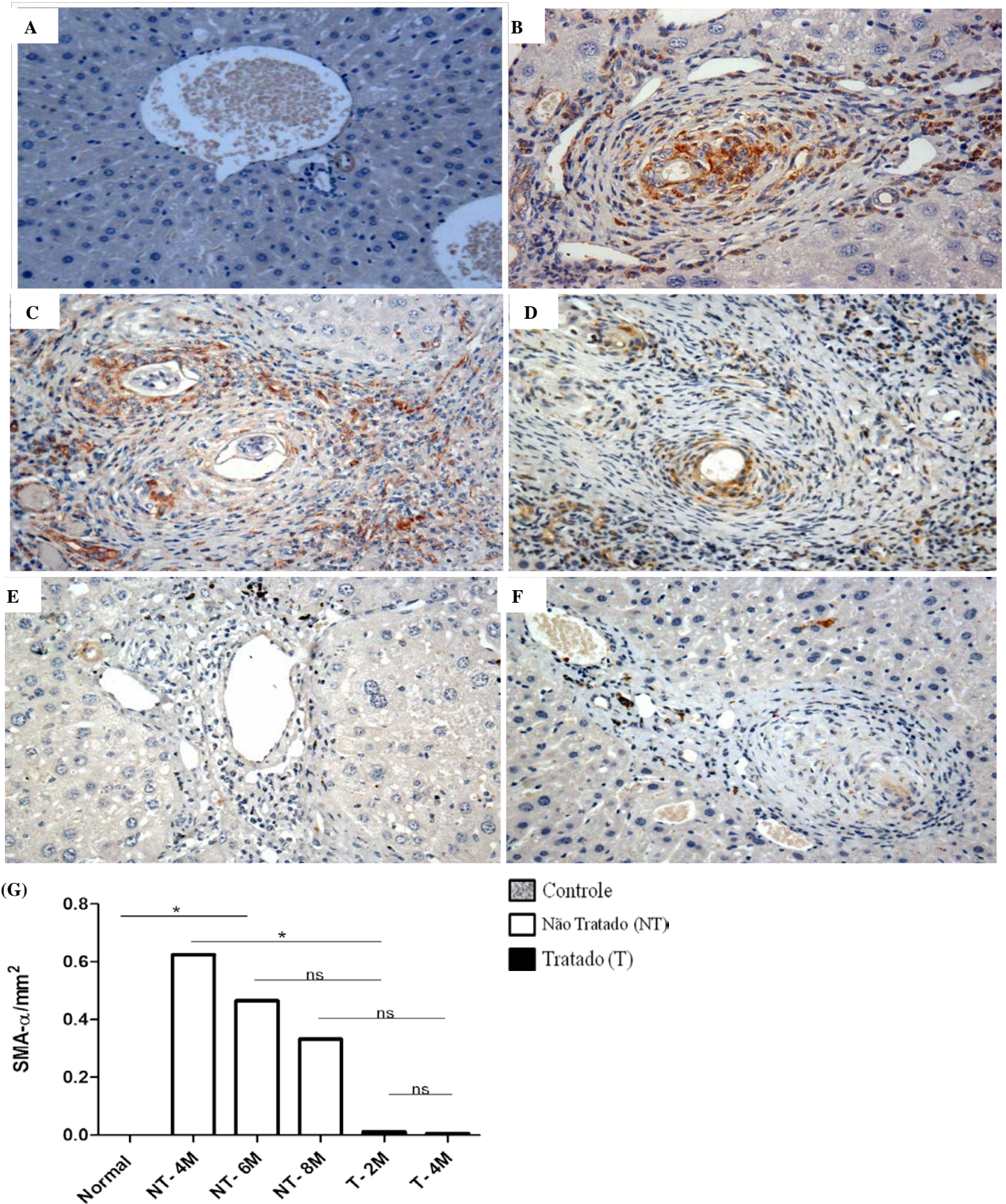


Figura 5. Expressão de CEH ativadas nos granulomas hepáticos de camundongos tratados e não tratados para esquistossomose. (A) Grupo controle. Representa expressão de α -SMA, exclusivamente, na parede das veias e artérias (Imuno-histoquímica, α -SMA, 200X). (B, C, D) Grupo infectado por *S. mansoni* (NT) - quatro, seis e oito meses de infecção. Revela expressão de CEH ativadas em alguns granulomas e, por vezes, no parênquima hepático. (E, F) Grupo tratado com PZQ (T) - dois e quatro meses pós-tratamento. Revelam que os granulomas involutivos não expressam CEH ativadas (Imuno-histoquímica, α -SMA, 400X). (G) Com o tratamento houve redução na expressão de CEH ativadas nas lesões hepáticas (* p <0,05; ns = não significativo). (NT = animais não tratados; T = animais tratados).

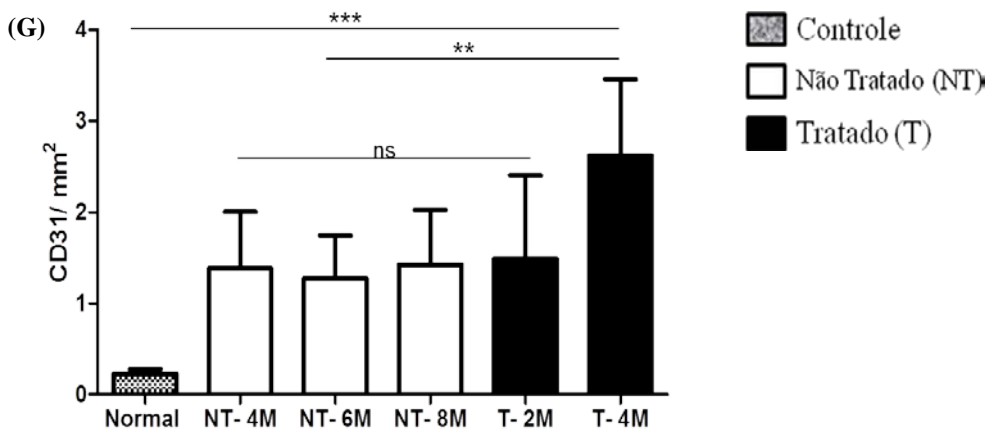
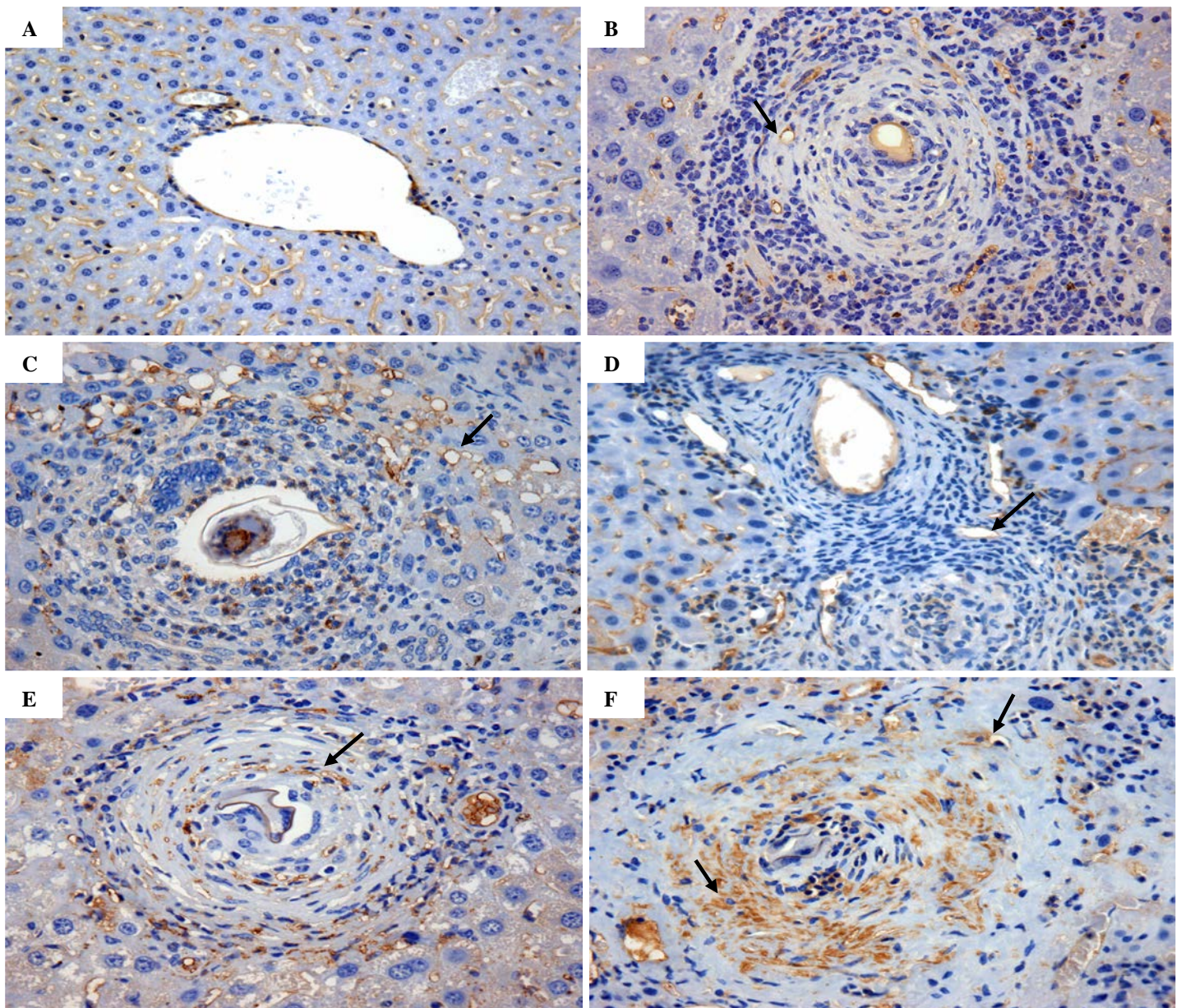


Figura 6. Expressão de CES nos granulomas hepáticos de camundongos tratados e não tratados para esquistossomose. (A) Grupo controle. Expressão das CES nas veias, artérias e sinusóides. (B, C, D) Grupo infectado por *S. mansoni* (NT), respectivamente, quatro, seis e oito meses de infecção. Revela proliferação de CES na periferia dos granulomas e a formação de microvasos (setas). (E, F) Grupo tratado com PZQ (T), respectivamente, dois e quatro meses pós-tratamento. Proliferação de CES e microvasos no interior dos granulomas involutivos (Imuno-histoquímica, CD31, 400X). (G) Revelou uma tendência ao aumento na expressão de CES, nos granulomas hepáticos, durante o reparo das lesões pós-tratamento (** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; ns = não significativo). (NT = animais não tratados; T = animais tratados).

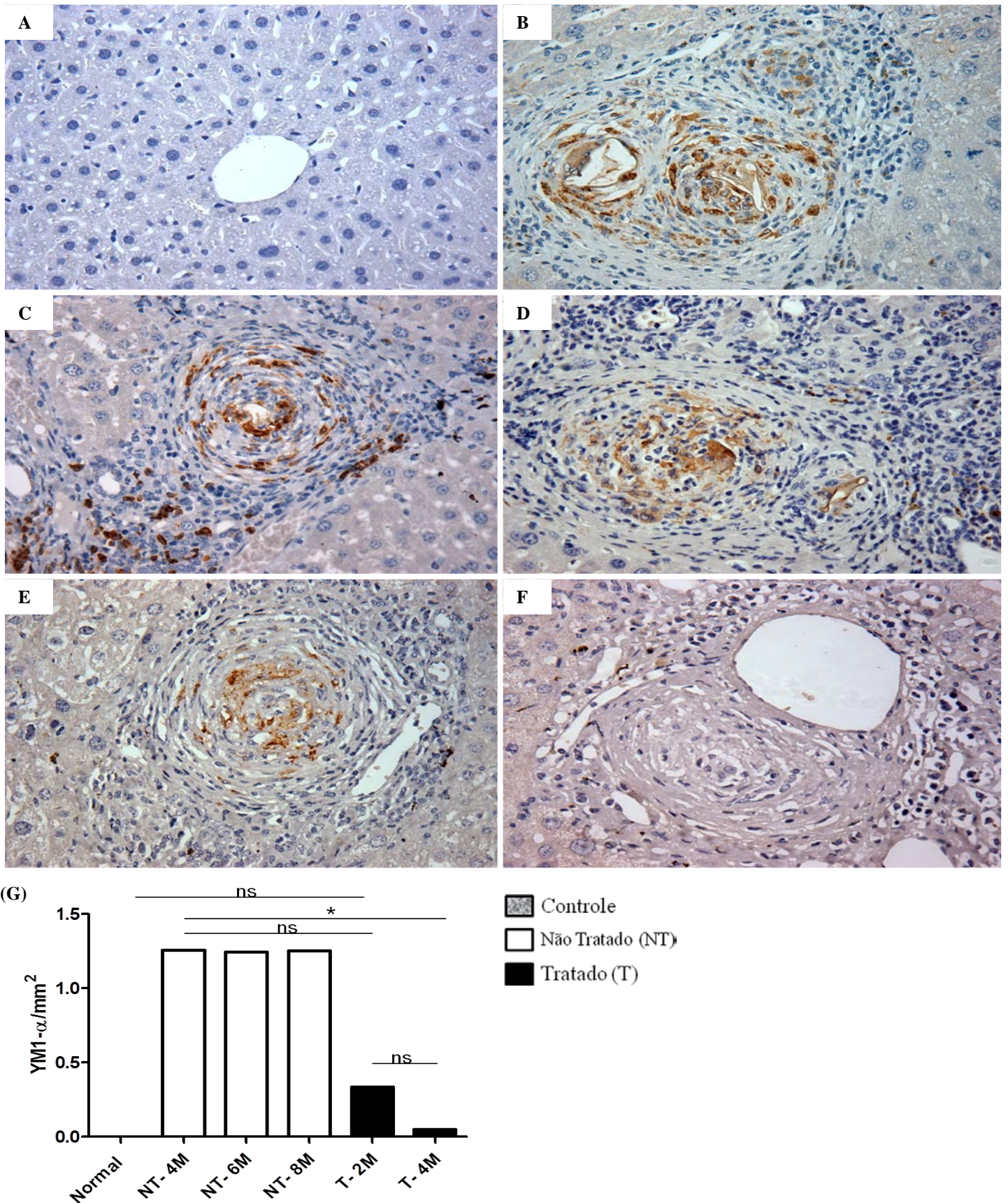


Figura 7. Expressão de macrófagos M2 nos granulomas hepáticos de camundongos tratados e não tratados para esquistossomose. (A) Grupo controle. Ausência de macrófagos M2 no fígado. (B, C, D) Grupo não tratado (NT) - quatro, seis e oito meses de infecção. Revela expressão de macrófagos M2 na região central dos granulomas hepáticos. (E, F) Grupo tratado com PZQ (T) - dois e quatro meses pós-tratamento. Demonstra redução de macrófagos M2 nas lesões hepáticas, principalmente, no período mais avançado de tratamento (Imuno-histoquímica, Ym1, 400X). (G) Demonstrou que o tratamento favoreceu a redução de macrófagos M2 nas lesões hepáticas (* $p < 0,05$; ns = não significativo). (NT = animais não tratados; T = animais tratados).

6 DISCUSSÃO

A esquistossomose mansônica é uma infecção de evolução crônica (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005) e a forma avançada da doença (hepatoesplênica) é responsável por altas taxas de morbidade e mortalidade (BINA, 1992). Neste contexto, estudos clínico-epidemiológicos relataram que o tratamento específico para esquistossomose tem relevância no controle da doença, não apenas por promover cura parasitológica, mas, também, pela prevenção e/ou reversão das formas graves (BINA, 1992; ANDRADE, 1998; COURA & AMARAL, 2004). Estas constatações clínicas foram apoiadas por estudos morfológicos que demonstraram reversibilidade das lesões hepáticas em camundongos esquistossomóticos submetidos ao tratamento específico (ANDRADE & GRIMAUD, 1996, 1988; ANDRADE *et al.*, 2006).

No presente estudo os granulomas periovulares, a fibrose periportal e os danos vasculares representaram as lesões hepáticas mais proeminentes. Em contrapartida o tratamento com PZQ contribuiu para resolução destas lesões, evidenciada por involução dos granulomas e desobstrução vascular, logo estes resultados estão de acordo com os outros trabalhos experimentais descritos na literatura (ANDRADE & GRIMAUD, 1988; ANDRADE *et al.*, 2006; CHAIWORAPORN *et al.*, 2005; BARROS *et al.*, 2009).

Na esquistossomose, trabalhos clínicos e experimentais consolidaram a noção de que a redução da fibrose hepática é uma característica marcante durante a reversibilidade das lesões hepáticas pós-tratamento (MORCOS *et al.*, 1985; DOEHRING-SCHWERDTFEGER *et al.*, 1992; BERHE *et al.*, 2008; LIANG *et al.*, 2011), pois esta vinculada a modificação da estrutura da MEC (ANDRADE & GRIMAUD, 1986). A fragmentação das fibras de colágeno e o desaparecimento de muitas delas nos granuloma hepáticos de camundongos submetidos ao tratamento específico para esquistossomose foi demonstrada na presente investigação e por estudos anteriores (ANDRADE & GRIMAUD, 1988; ANDRADE *et al.*, 1993; ANDRADE *et al.*, 2006; BARROS *et al.*, 2009).

Na década de 80, Andrade e Grimaud (1986) definiram o granuloma periovular como uma lesão essencialmente fibrosante, porém reversível. Estes autores sugeriram a participação de enzimas na degradação do colágeno e de células na internalização dos fragmentos (fagocitose) durante o processo de reabsorção da fibrose. Estudos demonstraram que o desequilíbrio entre as atividades das MMPs – enzimas estas que degradam o colágeno – e de seus inibidores TIMPs desempenha um papel importante na síntese e degradação na fibrose hepática (ARTHUR, 2002; MCCRUDDEN & IRADELE, 2000). Singh e colaboradores (2004) demonstraram que o tratamento com PZQ favoreceu a reabsorção do tecido fibroso

hepático em camundongos infectados por *S. mansoni* e atribuiu este evento à queda nos níveis de TIMP-1 e, conseqüentemente, aumento da expressão e atividade das MMPs. Resultados e conclusões semelhantes foram descritos por Liang e colaboradores (2011) em camundongos infectados por *S. japonicum* e submetidos ao tratamento com PZQ na fase avançada da esquistossomose.

Estudos anteriores relacionavam fibrose hepática com a gravidade do quadro clínico nas doenças crônicas do fígado (PRATA & ANDRADE, 1963; BINA & PRATA, 1983; LAMBERTUCCI *et al.*, 1996). Por outro lado, estudos clínicos relataram que na esquistossomose hepatoesplênica pode não haver correlação entre a intensidade da fibrose periportal e a gravidade clínica da doença. Ou seja, pacientes esquistossomóticos com fibrose leve podem apresentar a forma clínica mais grave, ou mesmo, apresentar fibrose “pipestem” e ser assintomático (VOIETA *et al.*, 2010).

Neste contexto, a fibrose hepática, *per se*, apresenta pouca significância fisiopatológica e a gravidade da esquistossomose hepatoesplênica está vinculada às alterações vasculares promovidas pelos ovos dos vermes e por vermes mortos (ANDRADE, 2004; SILVA *et al.*, 2006). Os ramos da veia porta sofrem os efeitos mais devastadores, pois, os ovos retidos nestes vasos promovem obstrução vascular e, conseqüentemente, aumento da pressão portal. Logo, a hipertrofia arterial ocorre para compensar a redução do fluxo sanguíneo da veia porta, porém, isto torna o parênquima hepático dependente de sangue arterial. E, em situações de redução brusca da pressão arterial – ruptura de varizes esofágicas – o aporte de fluxo sanguíneo arterial torna-se deficiente no fígado, resultando em insuficiência hepática e óbito do indivíduo (ANDRADE, 2009). As alterações vasculares na esquistossomose avançada são responsáveis pelo quadro clínico de hipertensão portal, esplenomegalia e varizes esofágicas (ANDRADE, 2004).

Neste estudo verificamos, morfológicamente, a relação entre a estrutura das fibras elásticas e a destruição da veia porta durante a infecção esquistossomótica. Andrade e Freitas (1991), em estudo prévio, relatavam hiperplasia do tecido elástico portal apenas na esquistossomose humana, entretanto estudo posterior realizado Andrade e cols (2006), bem como, os resultados do presente estudo demonstraram que na esquistossomose murina, também, ocorre elastose nos ramos da veia porta. Andrade e Freitas (1991) sugeriram que a hiperplasia do tecido elástico poderia causar estreitamento vascular e, portanto, influenciar na patogênese da hipertensão portal. De acordo com Andrade e cols (1992) a elastose subendotelial evidenciada nos ramos de maior calibre da veia porta pode ser explicada pela

proliferação de células endoteliais e células musculares lisas na lesão hepática, pois as células endoteliais sintetizariam elastina.

Além da desordem da parede vascular portal verificou-se, na presente investigação, o preenchimento da luz do vaso resultando na obstrução vascular e, conseqüentemente, na patogênese da hipertensão portal. Por outro lado, Andrade e cols (2006) demonstraram que o tratamento específico da esquistossomose é seguido não apenas de regressão da fibrose hepática, mas, também, por um considerável remodelamento vascular – desobstrução vascular e redução do tecido elástico –, assim como evidenciado neste estudo. Em adição, estudos experimentais e clínicos revelaram que a regressão da fibrose hepática é acompanhada por redução da esplenomegalia e da hipertensão portal (DOEHRING-SCHWERDTFEGER *et al.*, 1992; RUIZ-GUEVARA *et al.*, 2007; LIANG *et al.*, 2011). Assim, estes dados sugerem uma correlação positiva entre a regressão da fibrose hepática, o remodelamento vascular e melhora do quadro clínico da esquistossomose avançada pós-tratamento.

No presente estudo, CES ativadas foram identificadas em granulomas esquistossomóticos hepáticos não só durante a sua formação, mas também durante a involução precoce após tratamento. Na literatura há poucos esclarecimentos sobre o papel das CES na esquistossomose, porém é sabido que estas células são imprescindíveis para angiogênese (BARRIE *et al.*, 2012). Estudos com camundongos demonstraram proliferação vascular nas fases iniciais dos granulomas esquistossomóticos, a qual diminuía gradualmente à medida que os granulomas se tornavam mais longevos e se apresentavam como estruturas avasculares, por vezes, delimitados na periferia por uma rica rede vascular (BAPTISTA & ANDRADE, 2005; LEMOS & ANDRADE, 2010). Sendo assim, a ativação das células endoteliais dentro destes granulomas pode contribuir para o seu desenvolvimento e para o aumento da vascularização periférica (LOEFFLER *et al.*, 2002).

Adicionalmente, estudos *in vitro* mostraram que SEA induzem a proliferação de células endoteliais (FREEDMAN & OTTESEN, 1988), a formação de tubo vascular (LOEFFLER *et al.*, 2002; PEREIRA *et al.*, 2013), exerce efeito anti-apoptótico e aumenta expressão de VEGF nas células endoteliais (LOEFFLER *et al.*, 2002). O VEGF desempenha um importante papel nas fases iniciais de formação de novos vasos sanguíneos, pois estimulam a ativação e proliferação das células endoteliais e, subsequente, a formação de túbulos endoteliais (FERNÁNDEZ *et al.*, 2009). Com efeito, Loeffler e cols (2002) atribuíram ao VEGF o efeito angiogênico mediado pelo SEA na esquistossomose mansônica. Em contrapartida, Pereira e cols (2013) propuseram que macrófagos ativados alternativamente por

SEA secretam fatores biológicos que induzem ativação de CES e, conseqüentemente, angiogênese nos granulomas esquistossomóticos.

A angiogênese recentemente associada à resolução das lesões esquistossomótica (ABDEL FATTAH & AHMED, 2012; ANDRADE *et al.*, 2006) é descrita na literatura como um processo imprescindível para fibrogênese em diversos modelos experimentais de fibrose hepática (BAPTISTA & ANDRADE, 2005; LEMOS & ANDRADE, 2010), pois antecede a deposição de fibrose no fígado (MARIA De SOUZA *et al.*, 2006). Em consonância com o conceito de que a angiogênese é a raiz de fibrogênese Lai & Adams (2005) sugeriram o uso de drogas anti-angiogênicas para tratar doenças crônicas do fígado. Todavia, Abdel Fattah & Ahmed (2012) sugeriram que o bloqueio da angiogênese não representa o alvo terapêutico adequado para o tratamento precoce da fibrose hepática esquistossomótica, pois a proliferação de vascular durante a fase de resolução do granuloma levanta evidências sobre seus efeitos benéficos no remodelamento das estruturas e funções hepáticas.

Assim, nossos resultados revelaram – através das células endoteliais – estruturas vasculares nos granulomas esquistossomóticos hepáticos. O aumento na expressão das CES e a formação de microvasos no interior dos granulomas involutivos sugerem remodelamento vascular (angiogênese) pós-tratamento com PZQ, evidenciando um possível benefício desse processo durante a involução das lesões esquistossomóticas. Estes dados são fortalecidos por estudos recentes que demonstraram coloração positiva para o VEGF dentro dos granulomas hepáticos de camundongos esquistossomóticos submetidos ao tratamento para esquistossomose (ANDRADE & SANTANA, 2010; ABDEL FATTAH & AHMED, 2012). Estes autores sugerem que a angiogênese desempenha um duplo papel na fibrogênese hepática e levanta a necessidade de continuar a examinar o papel de pericitos (CEH) na formação e remodelação dos tecidos conjuntivos e na reestrutura vascular.

Na presente investigação, a imunomarcagem para α -SMA demonstrou um declínio de CEH ativadas nos granulomas hepáticos nos períodos mais avançados da infecção esquistossomótica e, principalmente, após o tratamento com PZQ. As CEH quando ativadas adquirem fenótipo de miofibroblastos, passam a expressar microfilamento de α -SMA e a produzirem componentes da matriz extracelular (MEC). Acredita-se que estas células sejam a principal fonte de colágeno no fígado e, assim, desempenhando um importante papel na fibrogênese de doenças crônicas hepáticas, bem como, na remodelação da matriz extracelular na esquistossomose (BOOTH *et al.*, 2004).

Na esquistossomose, os ovos do verme induzem uma resposta polarizada Th2, com elevada produção de IL-13. Esta interleucina presente na reação granulomatosa estimula a

transdiferenciação da CEH em miofibroblasto que, por sua vez, conduz diretamente a produção de colágeno (BARRIE *et al.*, 2012). Em estudos com camundongos infectados com *S. japonicum*, a presença de CEH ativada foi verificada nos granulomas por meio da marcação para α -SMA e desmina (BARTLEY *et al.*, 2006; BURKE *et al.*, 2010). A imunomarcação para α -SMA e proteína glial fibrilar ácida (GFAP), também, revelou expressão de CEH ativadas em granulomas de pacientes com esquistossomose avançada, infectados com *S. mansoni* e *S. japonicum* (CHANG *et al.*, 2006; BARTLEY *et al.*, 2006; PEREIRA *et al.*, 2013).

Adicionalmente, um estudo considerou a expressão α -SMA incapaz de diferenciar CEH ativadas dos miofibroblastos do fígado, sugerindo que, como na fibrose colestática os fibroblastos poderiam ser as principais células relacionadas à fibrogênese hepática e não às CEH (RAMADORI & SAILE, 2004). Todavia, Chang e cols (2006) sustentam que as CEH são a fonte de fibrose periportal na esquistossomose humana, devido à elevada expressão de células GFAP positivas nestas lesões. Visto que, em humanos a proteína GFAP se expressa tanto nas CEH quiescente quanto nas CEH ativadas.

Bartley e cols (2006) demonstraram que CEH ativadas foram detectadas nos granulomas hepáticos 06 semanas após infecção com *S. japonicum*, atingindo ápice com 8-10 semanas, entretanto, na 14 semana houve declínio na expressão destas células. Nossos resultados, também, revelaram declínio gradativo de CEH ativadas ao longo da infecção com *S. mansoni*. Estes achados sugerem que a importância das CEH ativadas nos granulomas esquistossomóticos diminui consideravelmente com o passar do tempo.

Na esquistossomose o tratamento com PZQ elimina o agente etiológico – os ovos do verme (LIANG *et al.*, 2002; FREZZA *et al.*, 2007). Sendo assim, quando o agente agressor hepático é removido inicia-se um processo de involução das lesões hepáticas e durante este processo as CEH ativadas desaparecem – por reversão ao estado quiescente ou por apoptose – e o tecido fibroso é reabsorvido (BARRIE *et al.*, 2012). Com a remoção das CEH ativadas há redução na deposição de colágeno e declínio na expressão de TIMPs, o que favorece a atividade das MMPs e, conseqüentemente, a regressão da fibrose (IRADELE, 2001; IRADELE *et al.*, 2012). Um estudo recente demonstrou que houve redução na expressão de CEH ativadas e de genes pró-fibróticos no fígado de camundongos infectados com *S. japonicum* pós-tratamento com PZQ (LIANG *et al.*, 2011). Os nossos resultados são consistentes com estudos anteriores, pois após o tratamento com PZQ praticamente não houve expressão das CEH, sugerindo que estas células, no estado ativado, exercem pouca influência na involução dos granulomas.

Os macrófagos são componentes centrais da resposta imune inata após dano tecidual (RAMACHANDRAN & IREDALE, 2012). Estas células podem ser ativadas em duas subpopulações principais, designadas ativação clássica (M1) e ativação alternativa (M2), respectivamente, associadas à resposta Th1 e Th2 (WILSON *et al.*, 2007). O estado de ativação está relacionado à função desempenhada pelos macrófagos, visto que, estes regulam a iniciação, manutenção e resolução de respostas inflamatórias crônicas (BARRON & WYNN, 2011).

Na esquistossomose, estudos prévios com camundongos demonstraram que SEA induzem uma forte resposta Th2 que, por sua vez, proporciona aumento de macrófagos M2 nos granulomas (HESSE *et al.*, 2000; SMITH *et al.*, 2004). Estes dados são consistentes com os achados do presente estudo, que revelou presença de macrófagos M2 nos granulomas hepáticos na fase avançada da doença. Na infecção crônica, estas células contribuem para progressão da fibrose e formação dos granulomas, mas, ao mesmo tempo desempenham um papel protetor associado à imunorregulação (BARRIE *et al.*, 2012).

Os macrófagos M2 também expressam arginase-1 que converte L-arginina em prolina, essencial para síntese do colágeno. A L-arginina também é matéria prima para macrófagos M1, porém, associada à induzível síntase óxido nítrico (iNOS) resultando em óxido nítrico (NO) (BARRON & WYNN, 2011). A relação de macrófago M2 com fibrogênese esquistossomótica foi demonstrado por um estudo utilizando camundongos deficientes em iNOS, onde L-arginina só conduz formação de prolina, resultando em maior deposição de colágeno e formação de granulomas, os quais eram oito vezes maiores quando comparados com granulomas de camundongos selvagens (HESSE *et al.*, 2000).

Macrófagos M2 atuam na imunorregulação (FLORES VILLANUEVA *et al.*, 1994), através do rápido consumo de L-arginina, promovendo uma depleção deste substrato no meio extracelular e, assim, inibe a proliferação de células T e B que também dependem deste substrato (BRONTE *et al.*, 2003). Assim, os macrófagos podem inicialmente induzir uma resposta inflamatória e auxiliar no desenvolvimento do granuloma e depois adotar um papel anti-inflamatório durante infecção crônica, suprimir outras células e reduzir o volume do granuloma (WILSON *et al.*, 2007).

Neste estudo, a análise morfométrica demonstrou redução expressiva de macrófagos M2 nos períodos mais avançados do tratamento para esquistossomose. Resultados semelhantes foram observados durante recuperação espontânea de lesões hepáticas induzidas por tetracloreto de carbono (CCl₄) (DUFIELD *et al.*, 2005). Estes autores sugeriram uma interdependência entre macrófagos e CEH ativadas, pois o declínio das mesmas ocorre de

forma simultânea durante a resolução da lesão. Adicionalmente, propõe que macrófagos regulam tanto a proliferação, quanto a apoptose de CEH ativadas, o que influencia no comportamento de síntese ou degradação da fibrose.

Pereira e cols (2013) demonstraram que SEA promove ativação alternativa de macrófagos que passam a ativar CEH e CES, ou seja, induzem a fibrogênese e angiogênese na esquistossomose. Por outro lado, nossos resultados sugerem que os macrófagos M2 exerce pouca ou nenhuma influência na angiogênese durante a resolução das lesões esquistossomóticas. O suporte para esta observação foi proporcionado pelos dados de imunohistoquímica, os quais demonstram aumento na expressão das CES nos granulomas involutivos ao mesmo tempo em que houve redução na expressão de macrófagos M2.

Ativação alternativa de macrófagos tem sido associada a um fenótipo que envolve regulação negativa da inflamação, indução de angiogênese, reparo tecidual e, também, alta capacidade para a fagocitose (ADAMS *et al.*, 2010). Estes autores avaliaram a capacidade dos macrófagos M2 de fagocitar células em apoptose *in vitro* e *in vivo*, e revelaram que estes macrófagos são semelhantes aos potentes fagócitos descritos na literatura. Também, concluíram que o potencial de fagocitose destas células, provavelmente, contribui para o seu papel na resolução da inflamação e reparação do tecido após lesão do fígado.

A capacidade de fagocitose dos macrófagos M2 pode justificar, no presente estudo, a intensa expressão destas células na zona central de alguns granulomas – tanto no grupo tratado quanto no grupo não tratado – onde eram encontrados restos da casca do ovo e miracídio. No entanto, quatro meses após tratamento não houve expressão de macrófago M2 nos granulomas que apresentavam a região central livre de resíduos dos ovos.

O remodelamento é a última fase do processo de cicatrização de ferida, o qual consiste numa involução gradual do tecido de granulação (angiogênese) e regeneração tecidual. Este passo está associado a apoptose dos miofibroblastos, células endoteliais e macrófagos. O tecido restante é então composto principalmente de proteínas da matriz extracelular, que será remodelado pelas metaloproteinases (RODERO *et al.*, 2010). Na presente investigação, o remodelamento das lesões hepáticas esquistossomóticas, pós-quimioterapia, foi acompanhado por regressão na expressão das CEH ativadas e dos macrófagos M2, reabsorção do tecido conjuntivo e remodelamento vascular. Entretanto, diferente do clássico processo de reparo, as CES ativadas demonstraram tendência à proliferação e, conseqüentemente, formação de novos vasos. Sugerindo que a angiogênese ou seus componentes celulares desempenham um importante papel, também, durante a regressão das lesões hepáticas na esquistossomose.

7 CONCLUSÃO

O tratamento para esquistossomose promoveu involução das lesões hepáticas caracterizadas por reabsorção gradativa do tecido conjuntivo (fibrose) e remodelamento vascular. Adicionalmente, nossos resultados sugerem que CEH ativadas estão presentes e têm participam ativamente da fibrogênese hepática durante a formação do granuloma esquistossomótico, bem como os macrófagos M2. No entanto, ambas as células exercem pouca influência na fase involutiva dos granulomas. Também confirmam que a angiogênese desempenha um importante papel na involução da lesão hepática esquistossomótica, pois houve intensa proliferação de CES nos granulomas involutivos.

Estudos futuros devem considerar a análise celular e molecular dos componentes da angiogênese (CEH quiescente e CES) e dos macrófagos M2 durante a fase de involução da esquistossomose.

REFERÊNCIAS

ABDEL FATTAH, N. S.; AHMED, N. S. **Evidence of intra-hepatic vascular proliferation remodeling early after cure in experimental schistosomiasis mansoni: an immunohistochemical descriptive study.** *Exp Parasitol.* 130(1):58-62. 2012.

ADAMS, R. H.; ALITALO, K. **Molecular regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis.** *Nature.* 8: 464-8. 2007.

ADAMS, D. H.; JU, C.; RAMAIAH, S. K.; UETRECHT, J.; JAESCHKE, H. **Mechanisms of immune-mediated liver injury.** *Toxicol Sci.* 115:307–321. 2010.

ALVES, V. A. F.; MELLO, E. S. Fígado e vias biliares. In. BRASILEIRO FILHO, G. **Bogliolo Patologia.** 8 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2011.

AMIRI, P., LOCKSLEY, R.M., PARSLow, T.G., SADICK, M., RECTOR, E., RITTER, D. e MCKERROW, J.H. **Tumour necrosis factor alpha restores granulomas and induces parasite egg-laying in schistosome-infected SCID mice.** *Nature.* 356 (6370): 604-607. 1992.

ANDRADE, Z. A.; WARREN, K. S. **Mild prolonged schistosomiasis in mice. Alterations in host response with time and the development of portal fibrosis.** *Trans Roy Soc Trop Med Hyg.* 58: 53–57. 1964.

ANDRADE, Z. A.; GRIMAUD, J. A. **Evolution of the schistosomal hepatic lesions in mice after curative chemotherapy.** *Am J Pathol.* 124(1):59-65. 1986.

ANDRADE, Z.A. **Pathogenesis of "pipestem" fibrosis of the liver (Experimental observation on murine schistosomiasis).** *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 82 (3): 325-334. 1987.

ANDRADE, Z. A.; GRIMAUD, J. A. **Morphology of chronic collagen resorption. A study on the late stages of schistosomal granuloma involution.** *Am J Pathol.* 132(2):389-99. 1988.

ANDRADE, Z. A.; FREITAS, A. L. R. **Hyperplasia of elastic tissue in hepatic schistosomal fibrosis.** Mem Inst Oswaldo Cruz. 86(4):447-456. 1991.

ANDRADE, Z. A.; PEIXOTO, E.; GUERRET, S.; GRIMAUD, J. A. **Hepatic connective tissue changes in hepatosplenic schistosomiasis.** Hum Pathol. 23(5):566-73. 1992.

ANDRADE, Z. A.; COX, T. M.; CHEEVER, A. M. **Regression of hepatic lesions after treatment of Schistosoma mansoni or Schistosoma japonicum infection in mice: a comparative study.** Am J Trop Med Hyg. 49:1-9. 1993.

ANDRADE, Z. A. **The situation of hepatosplenic schistosomiasis in Brazil today.** Mem Inst Oswaldo Cruz. 93(1):313-316. 1998.

ANDRADE, Z. A. **Schistosomal hepatopathy.** Mem Inst Oswaldo Cruz. 99 (5 Suppl. 1): 51–7. 2004.

ANDRADE, Z. A. **Regressão da fibrose hepática.** Rev Soc Bras Med Trop. 38(6):514-520. 2005.

ANDRADE, Z. A.; BAPTISTA, A. P.; SANTANA, T. S. **Remodeling of hepatic vascular changes after specific chemotherapy of schistosomal periportal fibrosis.** Mem Inst Oswaldo Cruz. 101: 267-272. 2006.

ANDRADE, Z. A. **Schistosomiasis and hepatic fibrosis regression.** Acta Trop. 108(2-3):79-82. 2008.

ANDRADE, Z. A. **Tecido conjuntivo, reparo, regeneração e cicatrização.** In: MONTENEGRO, M. R.; FRANCO, M. **Patologia Processos Gerais.** 4. ed. São Paulo: Atheneu, 2008.

ANDRADE, Z. A. **Schistosomiasis and liver fibrosis.** Parasite Immunol. 31(11):656-63. 2009.

ANDRADE, Z. A.; SANTANA, T. S. **Angiogenesis and schistosomiasis**. Mem Inst Oswaldo Cruz. 105: 436–439. 2010.

ANDREWS, P. A. **Summary of the efficacy of praziquantel against schistosomes in animal experiments and notes on its mode of action**. Arzneimittelforschung. 31(3a):538-41. 1981.

ARMULIK, A.; ABRAMSSON, A.; BETSHOLTZ, C. **Endothelial/pericyte interactions**. Circ Res.16; 97(6):512-23. 2005.

ARTHUR, M. J. **Reversibility of liver fibrosis and cirrhosis following treatment for hepatitis C**. Gastroenterology. 122:1525–1528. 2002.

BAERISWYL, V.; CHRISTOFORI, G. **The angiogenic switch in carcinogenesis**. Semin Cancer Biol. 19(5):329-37. 2009.

BAPTISTA, A. P.; ANDRADE, Z. A. **Angiogenesis and schistosomal granuloma formation**. Mem Inst Oswaldo Cruz. 100:183–185. 2005.

BARBOSA, C.S; FAVRE, T.C; AMARAL, R.S; PIERI, O.S. Epidemiologia e controle da esquistossomose mansoni. In: CARVALHO, O.S; COELHO; P.M.Z; LENZI, H.L. **Schistosoma mansoni e Esquistossomose: uma visão multidisciplinar**. 20^a ed., Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 2008.

BARRIE, J. A.; GRANT, A. R.; DONALD, P. M. **Role of resident liver cells in the pathogenesis of schistosomiasis**. Trends Parasitol. 28: 572-579. 2012.

BARRON, L.; WYNN, T. A. **Macrophage activation governs schistosomiasis-induced inflammation and fibrosis**. Eur J Immunol. 41(9): 2509–2514. 2011.

BARROS, L. A.; COSTA-SILVA, M.; BIOLCHINI, C. L.; NEVES, R. H.; MACHADO-SILVA, J. R. **Effect of praziquantel administration on hepatic stereology of mice infected with Schistosoma mansoni and fed a low-protein diet**. Braz J Med Biol Res. 42(9):812-5. 2009.

BARTLEY, P. B.; RAMM, G. A.; JONES, M. K.; RUDDELL, R. G., LI, Y.; MCMANUS, D. **P. A contributory role for activated hepatic stellate cells in the dynamics of Schistosoma japonicum egg-induced fibrosis.** Int J Parasitol. 36:993-1001. 2006.

BATALLER, R.; BRENNER, D. A. **Liver fibrosis.** J Clin Invest. 115:209–18. 2005.

BERGERS, G.; SONG, S. **The role of pericytes in blood-vessel formation and maintenance.** Neuro Oncol. 7(4):452-64. 2005.

BERHE, N.; MYRVANG, B.; GUNDERSEN, S. G. **Reversibility of schistosomal periportal thickening / fibrosis after praziquantel therapy: a 26 months follow-up study in Ethiopia.** Am J Trop Med Hyg 78: 228-234.2008.

BINA, J. C.; PRATA, A. **Regressão da hepatosplenomegalia pelo tratamento específico da esquistossomose.** Rev Soc Bras Med Trop. 16(4):213-218. 1983.

BINA, J. C. **O Tratamento específico como arma no controle da esquistossomose.** Mem Inst Oswaldo Cruz. 87(4):195-202. 1992.

BOOTH, M.; MWATHA, J. K.; JOSEPH, S.; JONES, F. M.; KADZO, H.; IRERI, E.; KAZIBWE, F.; KEMIJUMBI, J.; KARIUKI, C.; KIMANI, G.; OUMA, J. H.; KABATEREINE, N. B.; VENNERVALD, B. J.; DUNNE, D. W. **Periportal fibrosis in human Schistosoma mansoni infection is associated with low IL-10, low IFN-gamma, high TNF-alpha, or low RANTES, depending on age and gender.** J Immunol. 172: 1295–1303. 2004.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Guia de Vigilância Epidemiológica.** Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica 6ª ed., Brasília: Ministério da Saúde, 2005.

BRINDLEY, P. J.; SHER, A. **The chemotherapeutic effect of praziquantel against *Schistosoma mansoni* is dependent on host antibody response.** J Immunol 139: 215-220. 1987.

BRONTE, V.; SERAFINI, P.; MAZZONI, A.; SEGAL, D. M.; ZANOVELLO, P. **l-Arginine metabolism in myeloid cells controls T-lymphocyte functions.** Trends Immunol. 24:302–306. 2003.

BROWN, B.; LINDBERG K.; REING, J. **The basement membrane component of biologic scaffolds derived from extracellular matrix.** Tissue Eng. 12:519–26. 2006.

BURT, A. D. **Cellular and molecular aspects of hepatic fibrosis.** J Pathol. 170:105-14. 1993.

BURKE, M. L.; JONES, M. K.; GOBERT, G. N.; LI, Y. S.; ELLIS, M. K.; MCMANUS, D. P. **Immunopathogenesis of human schistosomiasis.** Parasit Immunol. 31: 163–176. 2009.

BURKE, M. L.; MCMANUS, D. P.; RAMM, G. A.; DUKE, M.; LI, Y.; JONES, M. K.; GOBERT, G. N. **Temporal expression of chemokines dictates the hepatic inflammatory infiltrate in a murine model of schistosomiasis.** Plos Negl Trop Dis. 4:598. 2010.

CABALLERO-MENDONZA, E.; RIDAURA-SANZ, C.; ANGELES-ANGELES, A. **La celula estelar hepatica (celula de Ito).** Patologia 37: 307-14. 1999.

CAFFREY, C. R.; SECOR, W. E. **Schistosomiasis: from drug deployment to drug development.** Curr Opin Infect Dis. 24(5):410-7. 2011.

CASSETTA, L.; CASSOL, E.; POLI, G. **Macrophage polarization in health and disease.** Scient Worl J. 11:2391–2402. 2011.

CHAIWORAPORN, R.; MANEERAT, Y.; ROJEKITTIKHUN, W.; RAMASOOTA, P.; JANECHARU, T.; MATSUDA, H.; KITIKOON, V. **Comparative studies on the**

pathological findings and mortality in *Schistosoma mansoni* infected mice after treatment with artesunate and the current antischistosomal drugs. Southeast Asian J Trop Med Public Health. 36 (5): 1118-24. 2005.

CHANG, D.; RAMALHO, L. N.; RAMALHO, F. S.; MARTINELLI, A. L.; ZUCOLOTO, S. **Hepatic stellate cells in human schistosomiasis mansoni: a comparative immunohistochemical study with liver cirrhosis.** Acta Trop. 97:318-323. 2006.

CHEN, M.G. **Relative distribution of *Schistosoma japonicum* eggs in the intestine of man: a subject of inconsistency.** Acta Trop. 48 (3):163-171. 1991.

CHITSULO, L.; ENGELS, D.; MONTRESOR, A.; SAVIOLI, L. **The global status of schistosomiasis and its control.** Acta Trop. 77: 41-51. 2000.

CHOI, S. S.; DIEHL, A. M. **Epithelial-to-mesenchymal transition in the liver.** Hepatology. 50:2007-13. 2009.

COLLEY, D. G. **Adoptive suppression of granuloma formation.** J Exp Med. 143(3):696-700. 1976.

COURA, J. R.; AMARAL, R. S. **Epidemiological and Control Aspects of Schistosomiasis in Brazilian Endemic Areas.** Mem Inst Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro. 99: 13-19, 2004.

CUNHA, A. S. **Esquistossomose mansoni: Tratamento medicamentoso.** Mem Inst Oswaldo Cruz. 87(4):341-351. 1992.

DA SILVA, L. C.; CARRILHO, F. J. **Hepatic Schistosomiasis – Pathophysiology and Treatment.** Gastroenterol Clin North Am. 21(1):163-177. 1992.

DE JESUS, A. R.; MAGALHÃES, A.; MIRANDA, D. G.; MIRANDA, R. G.; ARAÚJO, M. I.; DE JESUS, A. A.; SILVA, A.; SANTANA, L. B.; PEARCE, E.; CARVALHO, E. M. **Association of Type 2 Cytokines with Hepatic Fibrosis in Human *Schistosoma mansoni* Infection.** Infect immun. 72(6): 3391–3397. 2004.

DIXON, J. B.; BHATHAL, P. S.; HUGHES, N. R.; AND O'BRIEN, P. E. **Nonalcoholic fatty liver disease: Improvement in liver histological analysis with weight loss.** *Hepatology*. 39:1647–1654. 2004.

DOEHRING-SCHWERDTFEGER, E.; ABDEL-RAHIM, I.M.; KARDORFF, R.; KAISER, C.; FRANKE, D.; SCHLAKE, J.; RICHTER, J.; ELSHEIKH, M.; MOHAMED-ALI, Q.; EHRICH, J.H. **Ultrasonographical investigation of periportal fibrosis in children with *Schistosoma mansoni* infection: reversibility of morbidity twenty-three months after treatment with praziquantel.** *Am J Trop Med Hyg*. 46:409-415. 1992.

DUFFIELD, J. S.; FORBES, S. J.; CONSTANDINOU, C. M.; CLAY, S.; PARTOLINA, M.; VUTHOORI, S.; WU, S.; LANG, R.; IREDALE, J. P. **Selective depletion of macrophages reveals distinct, opposing roles during liver injury and repair.** *J Clin Invest*. 115:56–65. 2005.

FERNÁNDEZ, M.; SEMELA, D.; BRUIX, J.; COLLE, I.; PINZANI, M.; BOSCH, J. **Angiogenesis in liver disease.** *J Hepatol*. 50(3):604-20. 2009.

FETTERER, R. H.; PAX, R. A.; BENNETT, J. L. **Praziquantel, potassium and 2,4-dinitrophenol: analysis of their action on the musculature of *Schistosoma mansoni*.** *Eur J Pharmacol*. 64 (1):31-8. 1980.

FLANNERY, L. M. S. **Modulação do granuloma periovular esquistossomótico: morfometria e comportamento da matriz extracelular.** Dissertação de Mestrado, Pós-graduação em Patologia, CPqGM-Fiocruz/UFBA, Salvador 2000. 15-16 pg.

FLORES VILLANUEVA, P. O.; HARRIS, T. S.; RICKLAN, D. E.; STADECKER, M. J. **Macrophages from schistosomal egg granulomas induce unresponsiveness in specific cloned Th-1 lymphocytes in vitro and downregulate schistosomal granulomatous disease in vivo.** *J Immunol*. 152:1847–1855. 1994.

FORBES, S. J.; RUSSO, F. P.; REY, V.; BURRA, P.; RUGGE, M.; WRIGHT N. A.; ALISON, M. R. **A significant proportion of myofibroblasts are of bone marrow origin in human liver fibrosis.** *Gastroenterology*. 126(4):955-63. 2004.

- FREEDMAN, D.O.; OTTESEN, E. A. **Eggs of *Schistosoma mansoni* stimulate endothelial cell proliferation in vitro**. J Infect Dis. 158:556–62. 1988.
- FREZZA, T. F.; MADI, R. R.; BANIN, T. M.; PINTO, M. C.; SOUZA, A. L. R.; GREMIÃO, M. P. D.; ALLEGRETTI, S. M. **Efeito do praziquantel incorporado a lipossomas nos diferentes estágios de desenvolvimento dos ovos de *Schistosoma mansoni***. Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada. 28(2):209-214. 2009.
- FRIEDMAN, S. L.; ROLL, F. J.; BOYLES, J.; BISSELL, D. M. **Hepatic lipocytes: the principal collagen-producing cells of normal rat liver**. Proc Natl Acad Sci U S A. 82:8681–8685. 1985.
- FRIEDMAN, S. L. **Cytokines and Fibrogenesis**. Semin. Liver Dis. 19:129-37. 1999.
- GARD, A. L.; WHITE, F. P.; DUTTON, G. R. **Extra-neural glial fibrillary acidic protein (GFAP) immunoreactivity in perisinusoidal stellate cells of rat liver**. J Neuroimmunol. 8: 359–375. 1985.
- GAYTON, A. C., HALL, J. E. O fígado como um Órgão. In:_____. **Tratado de Fisiologia Médica**. 12. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011.
- GIBODA, M.; SMITH, J. M. ***Schistosoma mansoni* eggs as target for praziquantel: efficacy of oral application in mice**. J Trop Med Hyg. 97:98-102. 1994.
- GORDON, S. **Alternative activation of macrophages**. Nat Rev Immunol. 3:23–35. 2003.
- GORDON, S.; MARTINEZ, F. O. **Alternative Activation of Macrophages: Mechanism and Functions**. Immunity. 32 (5):593-604. 2010.
- GRYSEELS, B. **Schistosomiasis** Infect Dis Clin N Am. 26: 383–397. 2012.
- GRYSEELS, B.; POLMAN, K.; CLERINX, J.; KESTENS, L. **Human schistosomiasis**. Lancet. 368: 1106-1118. 2006.

GUIGUET LEAL, D. A.; FRANCO, R. M.; NEVES, M. F.; SIMÕES, L. F.; BASTOS, L. A.; ALLEGRETTI, S. M.; ZANOTTI-MAGALHÃES, E. M.; MAGALHÃES, L. A. **Acute schistosomiasis in brazilian traveler: the importance of tourism in the epidemiology of neglected parasitic diseases.** Case Rep Infect Dis. 2012:650929. 2012.

HENDERSON, N. C.; FORBES, S. J. **Hepatic fibrogenesis: from within and outwith.** Toxicology. 254(3):130-5. 2008.

HERNANDEZ-GEA, V.; FRIEDMAN S. L. **Pathogenesis of liver fibrosis.** Annu Rev Pathol. 6:425-56. 2011.

HESSE, M.; CHEEVER, A. W.; JANKOVIC, D.; WYNN, T. A. **NOS-2 mediates the protective anti-inflammatory and antifibrotic effects of the Th1-inducing adjuvant, IL-12, in a Th2 model of granulomatous disease.** Am J Pathol. 157:945–955. 2000.

IREDALE, J. P.; BENYON, R. C.; PICKERING, J.; MCCULLEN, M.; NORTHROP, S.; PAWLEY, S.; HOVELL, C. J.; ARTHUR, M. J. P. **Mechanisms of spontaneous resolution of rat liver fibrosis. Hepatic stellate cell apoptosis and reduced hepatic expression of metalloproteinase inhibitors.** J Clin Invest. 102:538–549. 1998.

IREDALE, J. P. **Hepatic stellate cell behaviour during resolution of liver injury.** Semin Liver Dis. 21:427–436. 2001.

IREDALE, J. P.; THOMPSON, A.; HENDERSON, N. C. **Extracellular matrix degradation in liver fibrosis: Biochemistry and regulation.** Biochim Biophys Acta. 1832 (7):876-83.. 2012.

ISSA, R.; ZHOU, X.; CONSTANDINOU, C. M.; FALLOWFIELD, J.; MILLWARD-SADLER, H.; GACA, M. D.; SANDS, E.; SULIMAN, I.; TRIM, N.; KNORR, A.; ARTHUR, M. J.; BENYON, R. C.; IREDALE, J. P. **Spontaneous recovery from micronodular cirrhosis: evidence for incomplete resolution associated with matrix cross-linking.** Gastroenterology. 126(7):1795-808. 2004.

IWAISAKO, K.; BRENNER, D. A.; KISSELEVA, T. **What's new in liver fibrosis? The origin of myofibroblasts in liver fibrosis.** J Gastroenterol Hepatol. 27 Suppl 2:65-8. 2012.

KABATEREINE, N.B., VENNERVALD, B.J., OUMA, J.H., KEMIJUMBI, J., BUTTERWORTH, A.E., DUNNE, D.W. e FULFORD, A.J. **Adult resistance to schistosomiasis mansoni: age-dependence of reinfection remains constant in communities with diverse exposure patterns.** Parasitology. 118(1):01-105. 1999.

KISSELEVA, T.; UCHINAMI, H.; FEIRT, N.; QUINTANA-BUSTAMANTE, O.; SEGOVIA J. C.; SCHWABE R. F.; BRENNER D. A. **Bone marrow-derived fibrocytes participate in pathogenesis of liver fibrosis.** J Hepatol. 45(3):429-38.2006.

LAI, W.K.; ADAMS, D. H. **Angiogenesis and chronic inflammation: the potential for novel therapeutic approaches in chronic liver disease.** Editorial J Hepatol. 42: 7-11. 2005.

LAMBERTUCCI, J. R.; GERSPACHER-LARA, R.; PINTO-SILVA, R. A.; BARBOSA, M. M.; TEIXEIRA, R.; BARBOSA, H. F.; SERUFO, J. C.; REZENDE, D. F.; DRUMMOND, S. C.; RAYES, A.A.M. **O Projeto Queixadinha: a morbidade e o controle da esquistossomose em área endêmica no nordeste de Minas Gerais, Brasil.** Rev Soc Bras Med Trop. 29(2):127-135. 1996.

LAMBERTUCCI, J. R. **Acute schistosomiasis mansoni: revisited and reconsidered.** Mem Inst Oswaldo Cruz. 105(4):422-435. 2010.

LEE, J. S.; SEMELA, D.; IREDALE, J.; SHAH, V. H. **Sinusoidal remodeling and angiogenesis: a new function for the liver -specific pericyte?** J Hepatol. 45: 817-823. 2007.

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

LEMO, Q. T.; ANDRADE, Z. A. **Angiogenesis and experimental hepatic fibrosis.** Mem Inst Oswaldo Cruz.105(5):611-4. 2010.

LENZI, H. L.; KIMMEL, E.; SCHECHTMAN, H.; PELAJO-MACHADO, M.; ROMANHA, W. S.; PACHECO, R. G.; MARIANO, M.; LENZI, J. A. **Histoarchitecture of schistosomal granuloma development and involution: morphogenetic and biomechanical approaches.** Mem Inst Oswaldo Cruz. 93 Suppl 1:141-51. 1998.

LIANG, Y. S.; COLES, G. C.; DAÍ, J. R.; ZHU, Y. C.; DOENHOFF, M. J. **Adult worm tegumental damage and egg-granulomas in praziquantel-resistant and -susceptible *Schistosoma mansoni* treated in vivo .** J Helminthol. 76:327 – 333. 2002.

LIANG Y.J.; LUO, J.; YUAN, Q.; ZHENG, D.; LIU, Y. P.; SHI, L; ZHOU, Y.; CHEN, A. L.; REN, Y. Y.; SUN, K. Y.; WANG, Y.; ZHANG, Z. S. **New Insight into the Antifibrotic Effects of Praziquantel on Mice in Infection with *Schistosoma japonicum*.** Plos One. 6 (5):20247. 2011.

LOEFFLER, D. A.; LUNDY, S. K.; SINGH K. P.; GERARD, H. C.; HUNSON, A. P.; BOROS, D. I. **Soluble egg antigens from *Schistosoma mansoni* induce angiogenesis-related processes by upregulating vascular endothelial growth factor in human endothelial cells.** J Infect Dis. 185: 1650-6. 2002.

MARIA DE SOUZA, M.; TOLENTINO, M. JR.; ASSIS B. C.; CRISTINA DE OLIVEIRA GONZALEZ, A.; MARIA CORREIA SILVA, T.; ANDRADE, Z. A. **Pathogenesis of septal fibrosis of the liver. (An experimental study with a new model).** Pathol Res Pract. 202(12):883-9. 2006.

MELO, A. L.; COELHO, P. M. Z. *Schistosoma mansoni* e a Doença. In: NEVES, D. P.; MELO, A. L.; LINARDI, P. M.; VITOR, R. W. A. **Parasitologia Humana.** 11 ed. São Paulo: Atheneu. 2010.

MCDONALD, D. M. **Angiogenesis and remodeling of airway vasculature in chronic inflammation.** Am J Respir Crit Care Med. 164:39-45. 2001.

MCCRUIDEN, R.; IREDALE, J.P. **Liver fibrosis, the hepatic stellate cell and tissue inhibitors of metalloproteinases.** Histol Histopathol. 15:1159–68. 2000.

MORCOS, S.H.; KHAYYAL, M.T.; MANSOUR, M.M.; SALEH, S., ISHAK, E. A.; GIRGIS, N.I.; DUNN, M.A. **Reversal of hepatic fibrosis after praziquantel therapy of murine schistosomiasis.** Am J Trop Med Hyg. 34:314-321. 1985.

NOVAES, M. R. C. G.; SOUZA, J. P.; ARAÚJO, H. C. **Síntese do anti-helmíntico praziquantel, a partir da glicina.** Quím Nova. 22(1):5-10. 1999.

PARRA, J. C.; GAZZINELLI, G.; GOES, A. M.; MOYES, R. B.; ROCHA, R.; COLLEY, D. G.; DOUGHTY, B. L. **Granulomatous hypersensitivity to *Schistosoma mansoni* egg antigens in human schistosomiasis. II. In vitro granuloma modulation induced by polyclonal idiotypic antibodies.** J Immunol. 147 (11):3949-3954. 1991.

PAX, R.; BENNETT, J. L.; FETTERER, R. A. **Benzodiazepine derivative and praziquantel: effects on musculature of *Schistosoma mansoni* and *Schistosoma japonicum*.** Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol. 304(3):309-15. 1978.

PEARCE, E. J.; MACDONALD, A. S. **The immunobiology of schistosomiasis.** Nat Rev Immunol. 2(7):499-511. 2002.

PEDRAS VASCONCELOS, J. A.; PEARCE, E. J. **Type 1 CD8⁺ T cell responses during infection with the helminth *Schistosoma mansoni*.** J Immunol. 157(7):3046-3053. 1996.

PEREIRA, T. A.; XIE, G.; CHOI, S. S.; SYN, W. K.; VOIETA, I.; LU, J.; CHAN, I. S.; SWIDERSKA, M.; AMARAL, K. B.; ANTUNES, C. M.; SECOR, W. E.; WITEK, R. P.; LAMBERTUCCI, JR; PEREIRA, F. L.; DIEHL, A. M. **Macrophage-derived Hedgehog ligands promotes fibrogenic and angiogenic responses in human schistosomiasis mansoni.** Liver Int. 33(1):149-61. 2013.

PITTA, M. G. R.; PITTA, M. G. R.; RÊGO, M. J. B. M.; GALDINO, S. L. **The evolution of drugs on schistosoma treatment: looking to the past to improve the future.** Mini Rev Med Chem. 13(4):493-508. 2013.

PRATA, A; ANDRADE, Z. A. **Fibrose hepática de Symmers sem esplenomegalia.** O Hospital. 63:177-183. 1963.

RAMACHANDRAN, P.; IREDALE, J. P. **Liver fibrosis: a bidirectional model of fibrogenesis and resolution.** QJM. 105(9):813-7. 2012.

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

REIS, L.F.; VENTURA, T.G.; SOUZA, S.O.; ARANAPINO, A.; PELAJO-MACHADO, M.; PEREIRA, M.J.S.; LENZI, H.L.; CONCEIÇÃO, M.J.; TAKIYAL, C.M. **Quantitative and qualitative interferences of pentoxifililne on hepatic *Schistosoma mansoni* granulomas: effects on extracelular matrix and eosinophil population.** Mem Inst Oswaldo Cruz. 96: 107-112. 2001.

RODERO, M. P.; KHOSROTEHRANI, K. **Skin wound healing modulation by macrophages.** Int j clin exp pathol. 3(7):643-653. 2010.

RUIZ-GUEVARA, R.; DE NOYA, B. A.; VALERO, S. K.; LECUNA, P.; GARASSINI, M.; NOYA,O. **Clinical and ultrasound findings before and after praziquantel treatment among Venezuelan schistosomiasis patients.** Rev Soc Bras Med Trop. 40(5):505-11. 2007.

RUSSO, F. P.; ALISON, M. R.; BIGGER, B. W.; AMOFAH, E. ; FLOROU, A.; AMIN, F.; BOU-GHARIOS, G. ; JEFFERY, R.; IREDALE, J. P.; FORBES, S. J. **The bone marrow functionally contributes to liver fibrosis.** Gastroenterology. 130(6):1807-21. 2006.

SILVA, L. M.; RIBEIRO-DOS-SANTOS, R.; SOARES, M. B.; ANDRADE, Z. A. **Characterization of the vascular changes in schistosomal portal (pipestem) fibrosis of mice.** Acta Trop 98:34-42. 2006.

SINGH, K.P.; GERARD, H. C.; HUDSON, A. P.; BOROS, D. L. **Expression of matrix metalloproteinases and their inhibitors during the resorption of schistosome egg-induced fibrosis in praziquantel-treated mice.** Immunology. 111(3):343–352. 2004.

SMITH, P.; WALSH, C. M.; MANGAN, N. E.; FALLON, R. E.; SAYERS, J. R.; MCKENZIE, A. N; FALLON, P. G. **Schistosoma mansoni worms induce anergy of T**

cells via selective up-regulation of programmed death ligand 1 on macrophages. *J Immunol.* 173:1240–1248. 2004.

SOUZA, F. P. C.; VITORINO, R. R.; COSTA, A. P.; FARIA JÚNIOR, F. C.; SANTANA, L. A.; GOMES, A. P. **Esquistossomose mansônica: aspectos gerais, imunologia, patogênese e história natural.** *Rev Bras Clin Med.* 9(4):300-7. 2011.

STADECKER, M.J. **The shrinking schistosomal egg granuloma: how accessory cells control T cell-mediated pathology.** *Exp Parasitol.* 79(2):198-201. 1994.

STEMPIN, C. C.; CERBAN, F. M. **Macrofagos e induccion de arginasa como mecanismo de evasion de parasitos.** *Medicina (B. Aires).* 67:737-746. 2007.

SOYER, M. T.; CEBALLOS, R.; ALDRETE, J. S. **Reversibility of severe hepatic damage caused by jejunoileal bypass after re-establishment of normal intestinal continuity.** *Surgery.* 79:601–604. 1976.

SYMMERS, W. S. C. **Note on a new form of liver cirrhosis due to the presence of the ova of *Bilharzia haematobia*.** *J athol Bact.* 9: 237–9. 1904.

TANABE, M. **Haemostatic abnormalities in hepatosplenic schistosomiasis mansoni.** *Parasitol Int.* 52(4):351-359. 2003.

UENO, T.; NAKAMURA, T.; TORIMURA, T.; SATA, M. **Angiogenic cell therapy for hepatic fibrosis.** *Med Mol Morphol.* 39:16-21. 2006.

VEIKKOLA, T.; ALITALO, K. U. **VEGFs, receptors and angiogenesis.** *Semin Cancer Biol.* 9: 211-220. 1999.

VITORINO, R R;. SOUZA, F P C DE ; COSTA, A P ; FARIA JÚNIOR, F C ; SANTANA, L A ; GOMES, A P. **Esquistossomose mansônica: diagnóstico, tratamento, epidemiologia, profilaxia e controle.** *Rev Bras Clin Med.* 10(1):39-45. 2012.

VOIETA, I.; L. C. DE QUEIROZ; ANDRADE, L. M.; SILVA, L. C.; FONTES, V. F.; BARBOSA, JR. A.; RESENDE, V.; PETROIANU, A.; ANDRADE, Z. A.; ANTUNES, C. M.; LAMBERTUCCI, J. R. **Imaging techniques and histology in the evaluation of liver fibrosis in hepatosplenic schistosomiasis mansoni in Brazil: a comparative study.** Mem Inst Oswaldo Cruz. 105(4):414-421. 2010.

WALLACE, K.; BURT, A. D.; WRIGHT, M. C. **Liver fibrosis.** Biochem J. 411:1-18. 2008.
WALSH, D. A.; PEARSON, C. I. **Angiogenesis in the pathogenesis of inflammatory joint and lung diseases.** Arthritis Res. 3:147-53. 2001.

WILSON, M. S.; MENTINK-KANE, M. M.; PESCE, J. T.; RAMALINGAM, T. R.; THOMPSON, R.; WYNN, T. A. **Immunopathology of schistosomiasis.** Immunol cell biol. 85(2):148-54. 2007.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Prevention and control of schistosomiasis and soil-transmitted helminthiasis: report of a WHO expert committee.** In: World Health Organ Tech Rep Ser. World Health Organization. Vol. 912. 2002.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. "Schistosomiasis". Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs115/en/index.html>. Acesso em: 24/09/2012 12:44. 2012.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. "Schistosomiasis". Disponível em: <http://www.who.int/schistosomiasis/en/index.html>. Acesso em: 24/09/2012 12:48. 2012.

WYNN, A. T. **Common and unique mechanisms regulate fibrosis in various proliferative diseases.** J Clin Invest. 117 (3):524-9. 2007.

YOKOI, Y.; NAMIHISA, T.; KURODA, H.; KOMATSU, I.; MIYAZAKI, A.; WATANABE, S.; USUI, K. **Immunocytochemical detection of desmin in fat-storing cells (Ito cells).** Hepatology. 4:709-714. 1984.