



**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ - FIOCRUZ**  
**CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ – CPQGM**

**FIOCRUZ**

**Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**GLOMERULOPATIA ESQUISTOSSOMÓTICA: COMPORTAMENTO DAS  
ALTERAÇÕES EM CAMUNDONGOS INFECTADOS PELO *SCHISTOSOMA*  
*MANSONI*, ANTES E DEPOIS DO TRATAMENTO COM PRAZIQUANTEL**

**ANA FLÁVIA GOTTSCHALL DE ALMEIDA**

**Salvador, Bahia – Brasil**

**2013**

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ**

**Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**GLOMERULOPATIA ESQUISTOSSOMÓTICA: COMPORTAMENTO DAS  
ALTERAÇÕES EM CAMUNDONGOS INFECTADOS PELO *SCHISTOSOMA*  
*MANSONI*, ANTES E DEPOIS DO TRATAMENTO COM PRAZIQUANTEL**

**ANA FLÁVIA GOTTSCHALL DE ALMEIDA**

Orientador: Dr. Zilton de Araújo Andrade

Dissertação apresentada ao  
Curso de Pós-Graduação em  
Biotecnologia em Saúde e  
Medicina Investigativa para a  
obtenção do grau de Mestre.

**Salvador, Bahia – Brasil**

**2013**

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

A447g Almeida, Ana Flávia Gottschall de  
Glomerulopatia esquistossomótica: comportamento das alterações em camundongos infectados pelo *Schistosoma mansoni*, antes e depois do tratamento com praziquantel [manuscrito] / Ana Flávia Gottschall de Almeida. - 2013. 121f.; 30 cm

Datilografado (fotocópia).

1.1.1 Dissertação (Mestrado) Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz. Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa, 2013.

Orientador: Drº.: Zilton de Araújo Andrade

1. Esquistossomose 2. Glomerulopatia. 3. Antígeno 4. Praziquantel I. Título.

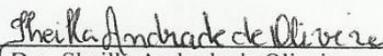
CDU 616.995.122

“GLOMERULOPATIA ESQUISTOSSOMÓTICA: COMPORTAMENTO DAS ALTERAÇÕES EM  
CAMUNDONGOS INFECTADOS PELO SCHISTOSOMA MANSONI, ANTES E DEPOIS DO  
TRATAMENTO COM PRAZIQUANTEL”

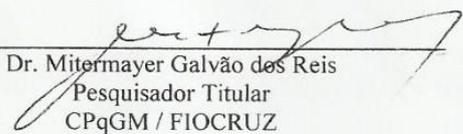
ANA FLÁVIA GOTTSCHAL DE ALMEIDA

FOLHA DE APROVAÇÃO

COMISSÃO EXAMINADORA

  
Dra. Sheilla Andrade de Oliveira  
Pesquisadora Adjunta  
CPqAM/FIOCRUZ

  
Dr. Daniel Abensur Athanazio  
Professor Adjunto  
FAMED/UFBA

  
Dr. Mitermayer Galvão dos Reis  
Pesquisador Titular  
CPqGM / FIOCRUZ

Dedico este trabalho à minha família, amigos, companheiros de todas as horas, e a todos que de alguma forma me apoiaram e estiveram comigo durante o desenvolvimento e a conclusão do mesmo.

## **AGRADECIMENTOS**

Às pessoas que contribuíram efetivamente para a realização deste estudo:

Ao meu orientador o Dr. Zilton de Araújo Andrade que com maestria ensinou os caminhos da esquistossomose e da glomerulopatia e que mesmo frente às dificuldades apoiou incondicionalmente a realização deste trabalho.

Aos amigos do LAPEX e do LACEI, em especial a Dr. Márcia Tolentino que colaborou no processo e acatou a tantos pedidos de ajuda, aos amigos e técnicos Antônio e Ana Cristina que também deram grande suporte aos experimentos. Aos queridos amigos Delsilene Borges que acompanhou todo o processo auxiliando tanto no aspecto emocional quanto na prática experimental, assim como Elisângela Trindade, Manuela Caldas, Thiago Almeida, Florisvaldo, Samaly, muito obrigada pelo apoio. Aos amigos do lado B, Leonardo, Tom, Marcelo, Isabela, Juliana, Tiago Landim, pela amizade durante o percurso.

Aos amigos e técnicos da Microscopia Eletrônica, em especial Lúcia, Claudio e Adriana pelo grande apoio e ajuda nessa etapa importante do estudo. Ao curso de pós-graduação em Biotecnologia e ao Centro pela oportunidade de trabalhar neste estudo e desenvolver tantas habilidades durante esse período, em uma grande troca de conhecimentos.

E principalmente à minha grande base estrutural, minha força inesgotável, a minha família, em especial meus pais (Maria Conceição e José Cordeiro) pelo amor que sempre me conduziram, juntamente com minhas irmãs Isa e Joicy que sempre estiveram ao meu lado em todos os momentos. Aos meus cunhados, amigos que são tantos e posso pecar ao sequer, por um único lapso de memória, não comentá-los (Beatriz, Tâmires, Paty, Érica, Carol, Jader, Núbia, Roque, Ciro... amigos de ontem, hoje e de daqui a milhares de anos, vocês colaboraram para tudo isso e para o meu crescimento.

**Aos amigos... Eu posso voar muito mais alto que uma águia, porque vocês são o vento embaixo de minhas asas...**

**(adaptado da música “The Wind Beneath My Wings”/ Sonata Arctica)**

A todos e sem quaisquer distinções, meu muito obrigada!

A concretização de tantas coisas unidas, palavras, ciência, conhecimento, pesquisa. Um caminho de ajuda mútua, uma conquista. Um trabalho é tudo isso e muito mais, as transformações conduzidas por ele, àquelas que resultaram neles, e a grandiosidade da história do percurso, é uma das vitórias da vida.

*Flávia Gottschall*

“Antes de sentirmos que somos bons mestres, estejamos seguros de que somos bons estudantes...”

*Pitágoras*

“A beleza de ser um eterno aprendiz!!!”

*Gonzaguinha*

ALMEIDA, A. F. G. Glomerulopatia Esquistossomótica: Comportamento das alterações em camundongos infectados pelo *Schistosoma mansoni*, antes e depois do tratamento com Praziquantel. 121 f. il. Dissertação (Mestrado) – Fundação Oswaldo Cruz, Instituto de Pesquisas Gonçalo Moniz, Salvador, 2013.

## RESUMO

A esquistossomose é um grave problema de saúde pública causado pelo helminto *Schistosoma mansoni*, sendo uma das endemias parasitárias de maior prevalência no Brasil. Apresenta diversas formas clínicas passíveis de serem reproduzidas em modelos experimentais. A lesão renal da glomerulopatia esquistossomótica está associada ao antígeno parasitário que, em consequência da presença de hipertensão portal e formação da circulação colateral, permitem que complexos imunes sejam depositados em glomérulos renais, desencadeando um processo inflamatório progressivo. O objetivo do trabalho foi avaliar o comportamento das alterações renais em camundongos infectados pelo *S. mansoni*, antes e após o tratamento com praziquantel, a fim de observar a resposta à presença dos complexos imunes e ao processo inflamatório formado na glomerulopatia. Foram organizados 3 grupos de camundongos BALB/c de ambos os sexos: grupo controle intacto (10 animais), grupo de reinfectedos tratados (35 animais) e grupo de reinfectedos não tratados (35 animais). A avaliação da estrutura renal foi analisada através da microscopia óptica, observando a histologia glomerular com as colorações de HE, PAS e PIFG, através da imunofluorescência marcando IgG e antígeno de Nash, e da microscopia eletrônica de transmissão com emprego da morfometria para avaliar áreas de depósito de complexos imunes. Foram analisadas, também, a carga parasitária, o peso do fígado, a presença dos vermes nas veias mesentéricas e a estrutura física dos órgãos. Os resultados demonstraram significativa redução da carga parasitária, do peso do fígado, das alterações estruturais nas observações histológicas e dos depósitos de complexos imunes em área e marcação no tecido renal, após tratamento com praziquantel. O tratamento específico reverteu os processos iniciais de agressão renal na glomerulopatia do modelo experimental, embora em alguns poucos camundongos, após a quimioterapia, a doença se manteve. Os achados deste trabalho reforçam a possibilidade de que o estado normal de estrutura renal pode ser restabelecido com o tratamento antiparasitário, desde que ministrado logo que se instala a glomerulopatia esquistossomótica clínica.

**Palavras-chave:** esquistossomose, glomerulopatia, antígeno, praziquantel.

ALMEIDA, Ana Flávia Gottschall de. Schistosomal glomerulopathy: Changes observed in mice infected by *Schistosoma mansoni* before and after treatment with Praziquantel. 121 f. il. Dissertação (Mestrado) – Fundação Oswaldo Cruz, Instituto de Pesquisas Gonçalo Moniz, Salvador, 2013.

### ABSTRACT

Schistosomiasis is an important public health problem due to infection with the helminth *Schistosoma mansoni*, which is also one of the parasitic diseases listed as highly prevalent in Brazil. It presents several clinical forms, which are susceptible of experimental reproduction in mice. The lesion involving the kidney – Schistosomal glomerulopathy – is related to the presence of circulating parasite antigens, which can be attached to circulating antibodies to form antigen-antibody complexes with glomerular deposition. However, in the presence of portal hypertension and collateral circulation, these antigen complexes, can bypass macrophage clearance and reach the systemic circulation, thus coming to be deposited within the renal glomeruli, starting a progressive inflammatory process. The aim of this research was to evaluate renal changes in mice infected with *S. mansoni*, before and after treatment with praziquantel, through the presence of immune complexes in the glomeruli, and its correlation with the glomerular changes shown. BALB/c mice infected, infected and treated mice and non-infected groups were evaluated. Besides the evaluation of the renal changes by optical microscopy (HE, PAS, PIFG), immunofluorescence (IgG and Nash antigen) and transmission electron microscopy, a morphometric study of the areas containing immune complexes was also attempted. Besides parasite burden, liver weigh, number of worm pairs within mesenteric veins, and organs physical structure, were also evaluated. Results showed a considerable reduction of parasite burden, liver weigh, structural changes in histological observations, of immune complex deposits in area and marking in renal tissue, after treatment with praziquantel, in the majority of the treated animals. The findings of this study support the possibility that the normal condition of renal structure can be restored with antiparasitic treatment, if this treatment begins as soon as the schistosomal glomerulopathy manifests.

**Key-words:** schistosomiasis, glomerulopathy, antigen, praziquantel.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1</b>	Distribuição global das esquistossomoses.....	17
<b>Figura 2</b>	Áreas endêmicas e focais da esquistossomose mansoni - Brasil.....	19
<b>Figura 3</b>	Sobrevivência e mortalidade espontânea dos camundongos durante os 8 meses de experimento (valores absolutos) .....	52
<b>Figura 4</b>	Mortalidade espontânea segundo o sexo dos camundongos durante os 8 meses de experimento (valores absolutos) .....	53
<b>Figura 5</b>	Peso líquido (em gramas) dos fígados dos grupos tratados, não tratados e controle, durante 8 meses de experimento .....	56
<b>Figura 6</b>	Relação das medianas de carga parasitária dos grupos tratados e infectados com 6 meses de infecção e 2 meses de tratamento.....	58
<b>Figura 7</b>	Relação das medianas de carga parasitária dos grupos tratados e infectados com 8 meses de infecção e 4 meses de tratamento.....	79
<b>Figura 8</b>	Aspectos histológicos dos glomérulos renais de camundongos reinfectados com <i>S. mansoni</i> , submetidos ou não ao tratamento com Praziquantel durante o curso de 8 meses de experimento.....	63
<b>Figura 9</b>	Histopatologia do córtex renal de camundongos infectados com <i>S. mansoni</i> e tratados ao longo do curso de 8 meses de experimento.....	66
<b>Figura 10</b>	Ilustrações dos depósitos de fibras colágenas no parênquima do córtex renal de camundongos Balb/C, infectados e tratados, durante o período experimental de 8 meses.....	71
<b>Figura 11</b>	Imunofluorescência direta marcando depósitos de imunoglobulinas IgG em glomérulos renais de camundongos infectados e tratados ao longo do período de 8 meses.....	72
<b>Figura 12</b>	Imunofluorescência direta com sobreposição de filtros marcando depósitos de imunoglobulinas IgG em glomérulos renais de camundongos infectados e tratados ao longo do período de 8 meses.....	74

<b>Figura 13</b>	Imunofluorescência indireta marcando depósitos de antígenos de Nash em glomérulos renais de camundongos infectados e tratados durante 8 meses de experimento.....	76
<b>Figura 14</b>	Microscopia Eletrônica de Transmissão demonstrando o aspecto ultraestrutural dos glomérulos renais e suas alterações na área mesangial, em camundongos Balb/C reinfetados e tratados durante o período de 8 meses.....	79
<b>Figura 15</b>	Microscopia Eletrônica de Transmissão demonstrando o aspecto ultraestrutural dos glomérulos renais e suas alterações na membrana basal, em camundongos Balb/C reinfetados e tratados durante o período de 8 meses.....	81
<b>Figura 16</b>	Análise morfométrica da área de deposição de complexos imunes segundo a região glomerular de deposição em camundongos com 4 e 6 meses de infecção.....	85
<b>Figura 17</b>	Avaliação morfométrica da área de deposição de complexos imunes segundo a região glomerular de deposição em camundongos com 8 meses de infecção e tratamento e acompanhamento do quantitativo da área de deposição segundo tempo de infecção.....	87

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	Presença de vermes nas veias mesentéricas de camundongos reinfetados, segundo tempo de infecção e tratamento (positivos e negativos) .....	54
<b>Tabela 2</b>	Avaliação do tratamento ao longo do curso de tempo da infecção segundo percentual de cura, baseada em parasitemia positiva ou negativa para vermes nas veias mesentéricas.....	55
<b>Tabela 3</b>	Estatística descritiva da variável carga parasitária segundo tempo de infecção e grupo experimental dos camundongos, analisando média, desvio e coeficiente de variação.....	57
<b>Tabela 4</b>	Estatística descritiva da variável área de depósito de complexo imune no córtex renal, obtida por avaliação morfométrica, segundo tempo de infecção e grupo experimental dos camundongos, analisando média e coeficiente de variação.....	84

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>A</b>	Animal
<b>ADCC</b>	Citotoxicidade Celular Dependente de Anticorpos
<b>BALB/c</b>	Linhagem isogênica de camundongo
<b><i>B. glabrata</i></b>	<i>Biomphalaria glabrata</i>
<b>CAA</b>	Antígeno Anódico Circulante
<b>CCA</b>	Antígeno Catódico Circulante
<b>CEUA</b>	Comissão de Ética no Uso de Animais
<b>CPqGM</b>	Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz
<b>CSA</b>	<i>Circulating Schistosomal Antigen</i>
<b>CV</b>	Coefficiente de Variação
<b>EO</b>	Eosinófilos
<b>FIOCRUZ</b>	Fundação Oswaldo Cruz
<b>FITC</b>	Isotiocianato de Fluoresceína
<b>g</b>	Gramas
<b>h</b>	Hora
<b>HE</b>	Hematoxilina-Eosina
<b>H<sub>0</sub></b>	Hipótese nula
<b>IF</b>	Imunofluorescência
<b>IgE</b>	Imunoglobulina E
<b>IgG</b>	Imunoglobulina G
<b>IgG4</b>	Imunoglobulina G4
<b>IgM</b>	Imunoglobulina M
<b>IL-5</b>	Interleucina 5
<b>KOH</b>	Hidróxido de Potássio
<b>M</b>	Molar
<b>MA</b>	Membrana
<b>MET</b>	Microscopia Eletrônica de Transmissão
<b>mg/kg</b>	Miligramas/Kilogramas
<b>mL</b>	Mililitro

<b>MO</b>	Mesângio
<b>MS</b>	Ministério da Saúde
<b>n</b>	Número de animais por grupo
<b>nm<sup>2</sup></b>	Nanômetros quadrados (unidade de área)
<b>PAS</b>	Ácido Periódico-Schiff
<b>Ph</b>	Potencial hidrogeniônico
<b>PIFG</b>	<i>Picrosírius Red Fast Green</i>
<b>SINAN</b>	Sistema de Informação de Agravos de Notificação
<b>SM (<i>S. mansoni</i>)</b>	<i>Schistosoma mansoni</i>
<b>SVS</b>	Sistema de Vigilância Sanitária
<b>Th1</b>	Linfócito T auxiliar tipo 1
<b>Th2</b>	Linfócito T auxiliar tipo 2
<b>°C</b>	Grau Celsius
<b>µL</b>	Microlitros

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>15</b>
1.1	A ESQUISTOSSOMOSE: HISTÓRIA E EPIDEMIOLOGIA.....	16
1.2	ASPECTOS GERAIS.....	19
1.3	HISTOFISIOLOGIA RENAL E PATOGÊNESE DA GLOMERULOPATIA ESQUISTOSSOMÓTICA.....	23
1.4	MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS E TRATAMENTO.....	25
1.5	CAMUNDONGOS COMO MODELO EXPERIMENTAL.....	30
1.6	RESPOSTA IMUNE E GLOMERULOPATIA.....	34
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>37</b>
2.1	OBJETIVO GERAL.....	37
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	37
<b>3</b>	<b>JUSTIFICATIVA/RELEVÂNCIA.....</b>	<b>38</b>
<b>4</b>	<b>DESENHO EXPERIMENTAL.....</b>	<b>39</b>
<b>5</b>	<b>METODOLOGIA.....</b>	<b>40</b>
5.1	ANIMAIS.....	40
5.2	CONSIDERAÇÕES ÉTICAS.....	40
5.3	ORGANIZAÇÃO DOS GRUPOS E IDENTIFICAÇÃO.....	40
5.4	EPIDEMIOLOGIA E MORTALIDADE.....	41
5.5	ANESTESIA E EUTANÁSIA.....	42
5.6	INFECÇÃO DOS CAMUNDONGOS.....	42
5.7	NECRÓPSIAS.....	43
5.8	TRATAMENTO.....	44
5.9	PRESENÇA DE VERMES ADULTOS E AVALIAÇÃO DA CARGA PARASITÁRIA.....	45
5.10	ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA.....	46
5.11	IMUNOFLUORESCÊNCIA.....	47

5.12	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (MET).....	48
5.13	MORFOMETRIA.....	49
5.14	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	50
<b>6</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>51</b>
6.1	MORTALIDADE ESPONTÂNEA.....	51
6.2	ESTUDO PARASITOLÓGICO.....	53
6.3	ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA.....	60
6.3.1	Coloração HE.....	60
6.3.2	Coloração PAS.....	64
6.3.3	Coloração PIFG.....	67
6.4	IMUNOFLUORESCÊNCIA.....	70
6.4.1	Direta para IgG.....	70
6.4.2	Indireta para Antígeno de Nash.....	75
6.5	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (MET).....	77
6.6	MORFOMETRIA.....	82
<b>7</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>88</b>
<b>8</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>103</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>104</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Dentre as doenças endêmicas no Brasil, a esquistossomose mansônica possui grande importância sócio econômica, com grande distribuição geográfica, tendo papel de destaque entre as parasitoses, alta prevalência entre as populações que podem apresentar diferentes formas clínicas e índices significantes de morbidade e mortalidade.

A esquistossomose é uma doença antiga. Existem indícios da presença de ovos do parasita em múmias egípcias de milhares de anos atrás. Após mais de 150 anos de sua descoberta, o *Schistosoma*, ainda vem sendo objeto de muitos estudos. Ainda muito se tem a descobrir e estudar sobre o assunto, uma vez que a descoberta de fármacos eficientes, ações de informações e saneamento básico têm resultado em efetiva diminuição dos casos, principalmente dos casos graves da doença, a esquistossomose está longe de ter sido erradicada. Talvez maiores empenhos políticos em promover o saneamento e a educação, sejam necessários em áreas de alta prevalência.

No Brasil, a esquistossomose está presente em quase todos os Estados da Federação, e apresenta uma única espécie responsável pela doença, o *S. mansoni*, que encontrou aqui um ambiente bastante favorável para se estabelecer. Este parasita apresenta um ciclo biológico complexo e possui uma notável interação adaptativa com seus hospedeiros intermediários e definitivos, bem como com o ambiente variável no qual ocorre o ciclo de vida. Esta parasitose é uma doença de grande interesse médico, por apresentar fases progressivas e agressivas ao seu hospedeiro definitivo.

As interações biológicas do parasita com o hospedeiro, os respectivos processos inflamatórios e o acometimento dos órgãos, o recrutamento dos componentes imunológicos que contribuem no aparecimento das lesões na doença, juntamente à repercussão do tratamento específico, envolvem o estudo do processo de desenvolvimento da esquistossomose mansônica. A doença provoca lesões, cujas alterações morfológicas são bem descritas na literatura, nos quais complexos imunes estão relacionados ao desencadeamento de processo inflamatório renal e glomerulopatia na parasitose. A redução de complexos imunes decorrente de tratamento específico antiparasitário, pode ser indício de redução de atividade inflamatória renal, o que demonstram diminuição da atividade da doença. Algumas descrições e autores são citados a seguir para referenciar o conteúdo introdutório ao estudo da esquistossomose, assim como ao assunto específico de que trata o presente trabalho experimental.

A grande importância deste trabalho está na busca de ampliar o conhecimento sobre a fase crônica da doença, o que envolve a glomerulopatia. As alterações provocadas pela esquistossomose e a intervenção com quimioterapia específica em modelo murino podem direcionar à uma extrapolação para medidas de controle eficazes em casos clínicos graves.

## 1.1 A ESQUISTOSSOMOSE: HISTÓRIA E EPIDEMIOLOGIA

A esquistossomose é uma doença infecto parasitária causada por platelmintos da classe Trematoda, família Schistomatidae, dividida em duas subfamílias: Brilharziellinae e Schistosomatinae. A família Brilharziellinae apresenta sexos separados, sendo a primeira subfamília sem dimorfismo sexual, parasitando os vasos sanguíneos de aves e alguns mamíferos, então, sem interesse médico. A segunda subfamília, por sua vez, inclui os vermes com nítido dimorfismo sexual, com espécies que parasitam o homem e animais (NEVES *et. al.*, 2010).

Bilharz em 1852 descreveu pela primeira vez um parasita intravascular, cujo gênero foi posteriormente designado por Weinland, como *Schistosoma*, que significa corpo fendido. Apesar de o nome “fenda” ser incorreto, já que o sulco presente no corpo do helminto macho é formado por extremidades laterais que se dobram no sentido ventral, a denominação é aceita até hoje. Já em 1907, a denominação da espécie *S. mansoni* coube a Sambon (da equipe de Patrick Manson, SOUSA, 2009), que se adiantou descrevendo uma nova espécie ao examinar poucas amostras de fezes. Nessa mesma época na Bahia, Pirajá da Silva, com observações similares e independentes, examinou numerosas amostras de fezes e necropsias, e pôde confirmar que o *Schistosoma* que produzia ovos com esporão lateral e vivia nas veias mesentéricas era realmente uma nova espécie (KATZ, 2008; NEVES *et. al.*, 2010).

Iniciam-se as pesquisas sobre a esquistossomose mansoni na Bahia em 1908, quando Pirajá da Silva publica seu primeiro trabalho sobre a descoberta do parasita no estado (ANDRADE, 2002). Depois, vários outros trabalhos, inclusive do próprio Pirajá da Silva, foram publicados contribuindo para o conhecimento sobre manifestações clínicas, diagnósticos, características e consolidação da espécie, repercussão internacional, distribuição, dados parasitológicos e vários outros aspectos da doença.

Todos esses trabalhos vieram demonstrar que a esquistossomose, pela magnitude de sua prevalência associada à gravidade das formas clínicas e evolução, constitui-se um relevante problema de saúde pública (ANDRADE, 2002; SOUZA, *et. al.* 2011; COUTO,

2005). A esquistossomose é caracterizada pela epidemiologia focal, com maiores taxas de infecção em jovens do que em adultos (GRYSEELS *et. al.* 2006).

Estima-se que cerca de 200 milhões de indivíduos no mundo estejam infectados por uma das três espécies principais do gênero *Schistosoma* que parasitam seres humanos: o *S. mansoni*, o *S. haematobium* e o *S. Japonicum* (BINA & PRATA, 2003; CHIEFFI & WALDMAN, 1988; MCMANUS & LOUKAS, 2008; SOBH *et. al.*, 1998). Outros 779 milhões, aproximadamente, estão sob o risco de contrair a doença (STEINMANN *et. al.*, 2006; MALAFAIA, 2009). Entre os vários tipos de esquistossomoses conhecidas, aquela que mais se disseminou, atingindo inclusive o continente americano, foi a esquistossomose mansônica (ARIADNA *et. al.*, 2001), figura 1. Apesar das transformações, sobre o conhecimento, prevenção e o tratamento da esquistossomose, ocorridas ao longo dos anos terem resultado em uma nítida diminuição na morbidade e mortalidade desta doença parasitária, decorrência dos progressos terapêuticos e de melhorias ambientais, descritas por Andrade no livro “*S. mansoni* e esquistossomose: uma visão multidisciplinar” (2008), a doença é ainda um grave problema, sendo considerada uma das endemias mais difundidas no mundo.

A esquistossomose apresenta distribuição em 74 países, sendo que 120 milhões de pessoas infectadas são sintomáticas e 20 milhões estão com a forma grave da doença. Em termos de morbidade e mortalidade é considerada a mais importante infecção helmíntica (MCMANUS & LOUKAS, 2008).

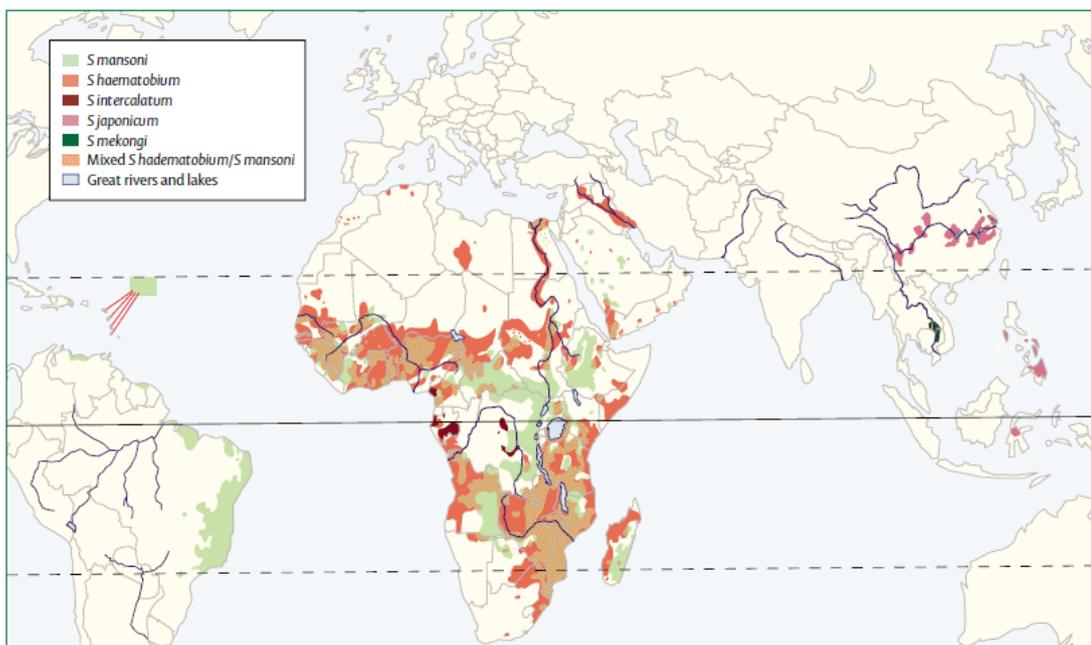


Figura 1 – Distribuição Global das esquistossomoses. Principais focos: *S. mansoni*, área sub-saariana, nordeste do Brasil, Suriname, Venezuela, Caribe, médio e baixo Egito, Península

Arábica; *S. haematobium*, área sub-saariana, vale do Nilo no Egito e Sudão, o Magrebe da Península Arábica; *S. japonicum* ao longo da região central e lagos do rio Yangtze na China; Mindanao, Leyte, e algumas outras ilhas nas Filipinas; Indonésia; *S. mekongi* – região central da bacia do Mekong no Laos e Camboja; *S. intercalatum* na África ocidental e central.

Fonte: Dados atualizados e corrigidos por Gryseels *et. al.* 2006, p. 1108, a partir de Doumenge e Mott (tradução livre).

O *S. mansoni* é o agente da esquistossomose intestinal. Conhecida popularmente como “xistose”, “barriga-d’água” ou “mal-do-caramujo”, a esquistossomose mansônica é uma doença tropical que acomete mais de 70 milhões de pessoas no mundo, afetando principalmente dois continentes, as Américas (Brasil, Suriname, Venezuela, Porto Rico e algumas ilhas do Caribe) e a África (em quase toda sua extensão, abrangendo 53 países), além de alguns países mediterrâneos (KATZ, 1999; MCMANUS & LOUKAS, 2008).

Originando-se provavelmente no Egito, a esquistossomose mansônica espalhou-se pelo território africano, seguindo o curso dos grandes rios. Os autores acreditam que a esquistossomose tenha chegado ao Brasil trazida pelos escravos provenientes da Guiné, Angola e do Congo, os quais se estabeleceram nas áreas de produção canavieira do Nordeste brasileiro, onde existiam condições bioecológicas para completar o ciclo evolutivo do parasita (CHIEFFI & WALDMAN, 1988). Segundo Neves e colaboradores (2010) o ciclo biológico foi descrito, inicialmente no Brasil, por Lutz, e no Egito, por Leiper, independentemente.

No Brasil, segundo dados do Ministério da Saúde em 2008, a doença já era detectada em todas as regiões do país. As áreas endêmicas e focais abrangem 19 unidades federadas, como demonstradas na figura 2, atingindo os estados de: Alagoas, Bahia, Pernambuco, Rio Grande do Norte, Paraíba, Sergipe, Espírito Santo e Minas Gerais. No Pará, Maranhão, Piauí, Ceará, Rio de Janeiro, São Paulo, Santa Catarina, Paraná, Rio Grande do Sul, Goiás e no Distrito Federal, a transmissão é focal, não atingindo grandes áreas. A ocorrência e distribuição da esquistossomose nas diferentes regiões do país estão diretamente ligadas à presença dos moluscos transmissores.



Figura 2. Áreas endêmicas e focais da esquistossomose mansoni - Brasil.

Fonte: MS/SVS, GT-Esquistossomose/CDTV/CGDT, 2008.

Segundo dados do SINAN, atualizados em 2011, a grande maioria dos casos notificados no Brasil encontram-se na região Nordeste, com cerca de 78% do total, sendo que a maior parte dos indivíduos infectados desenvolvem apenas a forma leve da doença. Estima-se que 25 milhões de pessoas no Brasil vivem em áreas sob o risco de contrair a doença, tornando o país uma das maiores regiões endêmicas da esquistossomose mansônica em todo o globo.

## 1.2 ASPECTOS GERAIS

A esquistossomose mansônica é adquirida no ambiente, quando o indivíduo entra em contato direto com algum sistema de água doce contaminada, o qual abriga as formas larvares infectantes do *S. mansoni*, conhecidas como cercárias. Ao alcançarem a pele do homem, as cercárias fixam-se preferencialmente entre os folículos pilosos, com as duas ventosas e uma substância muco proteica secretada por suas glândulas (NEVES *et. al.*, 2010; SOUZA *et. al.*, 2011; REY, 2002). Em um processo ativo de penetração dérmica, tomam a posição vertical apoiadas por sua ventosa oral e, com movimentos vibratórios intensos, utilizando a enzima proteolítica elastase secretada pelas glândulas de penetração, as cercárias vencem as barreiras

dérmicas. Ao penetrarem, através da pele ou por mucosas, perdem suas caudas bifurcadas e como esquistossômulos migram para o tecido subcutâneo, entram nos capilares e vasos sanguíneos ou linfáticos e seguem para os pulmões (MCMANUS & LOUKAS, 2008).

O esquistossômulo é mais vulnerável ao sistema imune do hospedeiro (FLANNERY, 2003; TERRY, 1994; RIDI *et. al.*, 2001). Eles permanecem nos pulmões até se transformarem em vermes jovens. Decorridos 17 dias de infecção, esses vermes migram para o sistema venoso portal, por via sanguínea ou transtissular, no qual adquirem biomassa, amadurecem sexualmente e se acasalam. Os pares de vermes, então, migram para as veias mesentéricas (MCMANUS & LOUKAS, 2008; NEVES *et. al.*, 2010, ARIADNA *et. al.* 2001).

Uma vez no interior do hospedeiro definitivo, os vermes adultos se localizam nas veias mesentéricas e liberam, na luz de capilares e vênulas, muitos ovos por dia (ALLEN *et. al.*, 2002). Uma parte desses ovos atravessa a parede dos vasos mesentéricos e acaba atingindo a luz intestinal, num processo que demora um mínimo de seis dias, tempo de maturação do ovo com a formação do miracídio, até que são eliminados pelo hospedeiro através das fezes. Outra parte é levada pela corrente sanguínea, atingindo outros órgãos do hospedeiro, onde o miracídio não sobrevive, há não ser que seja eliminado com as fezes dando continuidade ao ciclo. Entretanto, muitos desses ovos são carreados para o interior do fígado, dando origem aos granulomas periovulares (SOUZA *et. al.*, 2011; NEVES *et. al.*, 2010).

Os ovos que são excretados com as fezes, quando em contato com a água liberam o miracídio dando origem a um novo ciclo (GRYSEELS *et. al.*, 2006; ROFATTO *et. al.*, 2011). Esses miracídios penetram indistintamente em moluscos vetores, não vetores e até em girinos. Mas, só aqueles que penetram em moluscos das espécies suscetíveis de *Biomphalaria*, o hospedeiro intermediário, se desenvolvem. Os hospedeiros intermediários são invertebrados do filo *Mollusca*, classe *Gastropoda*, ordem *Pulmonata*, família *Planorbidae*, subfamília *Planorbinae*, gênero *Biomphalaria*, cuja espécie mais importante é a *Biomphalaria glabata* (VITORINO *et. al.*, 2012).

No molusco, o miracídio perde seus cílios, transforma-se em esporocisto e pode originar até 300.000 cercárias por reprodução assexuada, já levando definido o sexo das cercárias que serão produzidas. Então, as cercárias saem através da formação de vesículas no tegumento do molusco, as quais se rompem posteriormente e liberam as larvas, atingindo as águas nos períodos mais quentes e luminosos do dia, onde nadam ativamente em busca de um hospedeiro definitivo (SOUZA *et. al.*, 2011).

No hospedeiro, os ovos carregados pela corrente sanguínea podem ser encontrados em locais imprevisíveis formando granulomas em diferentes órgãos e provocando as lesões

ectópicas causadas por embolização de ovos que entraram na circulação sistêmica arterial. Mas, na esquistossomose mansoni os ovos que são liberados e não vão para a luz intestinal normalmente seguem para o fígado. Os casais de vermes adultos podem permanecer no sistema porta, migrar para sítios ectópicos, depositando uma grande quantidade de ovos em locais restritos e causando lesões focais, ou se dirigir para as veias mesentéricas, o que ocorre com maior frequência (CARVALHO *et. al.*, 2008).

A esquistossomose mansônica é causada pela resposta inflamatória granulomatosa do hospedeiro, em virtude dos ovos do *S. mansoni* que ficam retidos no fígado e intestinos, podendo resultar em fibrose e calcificação desses tecidos (ROFATTO *et. al.*, 2011). Como toda inflamação, determina complicações que podem causar além da fibrose, desenvolvida a partir de fibroblastos ativados, a necrose, resultando em remodelamento tecidual, em que a fibrose portal e a lesão vascular são os promotores da hipertensão portal pré-sinusoidal (FRANCO *et. al.*, 2010).

Nas infecções leves, que envolvem carga parasitária baixa e pequenas alterações morfológicas decorrentes da fase aguda, os granulomas se distribuem esparsamente pelo parênquima hepático (granulomas isolados), o que ocorre na maioria absoluta dos indivíduos infectados nas áreas endêmicas. Os granulomas podem se acumular ao redor dos ramos intra-hepáticos da veia porta conduzindo ao desenvolvimento de um tipo de manguito fibroso, originando a fibrose periportal ou “fibrose em haste de cachimbo de barro” (*Clay pipestem fibrosis*), descrita pela primeira vez por Symmers; (1904). Nas infecções intensas, graves, caracterizadas pela carga parasitária alta e alterações morfológicas maiores, normalmente associadas a fase crônica da doença, os granulomas hepáticos acabam se concentrando nas regiões periportais, estabelecendo fibrose periportal e lesões vasculares obstrutivas que desencadeiam a síndrome da hipertensão portal (ANDRADE *et. al.*, 2006; SANTOS *et. al.*, 2000; SILVA *et. al.*, 2006; ANDRADE & MARCK, 1984; BOROS, 1989).

A hipertensão portal é um fator que induz mudanças vasculares importantes com efeitos sistêmicos. Ela provoca diversos processos de neovascularização, com brotamento de vasos colaterais, como a formação de circulação colateral porto-cava, desviando parte do sangue porta diretamente para a circulação sistêmica, ultrapassando a barreira de filtragem hepática. O acúmulo dos granulomas hepáticos e sua fibrose contínua, associados à pressão portal elevada e à intensa resposta imunológica, acarretam a hepatoesplenomegalia. O quadro ainda pode evoluir com acúmulo de líquido na cavidade peritoneal (ascite), com o desenvolvimento de varizes esofágicas que podem romper causando hemorragias (ROFATTO *et. al.*, 2011).

Nas veias mesentéricas, o helminto adulto se alimenta do sangue do hospedeiro, consumindo cerca de 300 mil hemácias por hora. Como o tubo digestivo do verme é cego, ou seja, comunica-se com o exterior através de apenas um orifício, regurgita os produtos não aproveitáveis após a digestão (SOUZA *et. al.*, 2011). Desta maneira, no material eliminado para a corrente sanguínea do hospedeiro se encontram os antígenos polissacarídeos de alto peso molecular, derivados do epitélio de revestimento do tubo digestivo do helminto, os chamados antígenos anódicos e catódicos circulantes (ANDRADE & MARCK, 1984).

Supõe-se que, quando existem poucos vermes, todo o antígeno liberado pela regurgitação desses vermes fica retido nas células de Kupffer do hospedeiro, não aparecendo na circulação sistêmica nem na urina. Essas células de Kupffer são os macrófagos residentes no fígado que fagocitam substâncias estranhas presentes no sangue e juntamente com as células estreladas formam o eixo da resposta fibrogênica. Nas infecções graves, com hipertensão portal e formação da circulação colateral, os antígenos dos vermes podem saturar as células de Kupffer e ultrapassar essa barreira hepática, e serem detectados no sangue e na urina. Podem vir a serem acoplados a anticorpos com fixação do complemento, esses antígenos formam os complexos imunes, que são depositados nos rins (região mesangial) e podem causar lesão desencadeando a glomerulonefrite (VAN MARCK, 1975; VAN MARCK *et. al.*, 1980; BJORNEBOE & PRYTZ, 1976; KIBUKAMUSOKE, 1984).

As células de Kupffer são encontradas nos capilares dos sinusóides hepáticos e atuam metabolizando hemácias velhas, secretando imuno substâncias e destruindo substâncias ou corpos estranhos que tenham penetrado pelo sistema porta. Essa função é fagocitária, executada pelas células de Kupffer, pertencentes ao sistema retículo endotelial (KUMAR *et. al.*, 2005).

Em 1961, Okabe e Tanaka documentaram a presença de um antígeno termoestável e dialisável na urina de coelhos e seres humanos. Posteriormente, um antígeno do *Schistosoma* foi encontrado no soro e na urina de ratos e hamsters infectados com *S. mansoni* (BERGGREN & WELLER, 1967; GOLD *et. al.*, 1969), que depois foi caracterizado como um polissacarídeo de alto peso molecular, localizado no revestimento do intestino do verme adulto (NASH *et. al.*, 1974, NASH, 1974). Isso é importante quando ocorre a ingestão de sangue pelo verme, porque depois, com a regurgitação, esse antígeno pode cair na circulação sanguínea do hospedeiro.

O antígeno já foi demonstrado no esôfago primordial de cercárias e no desenvolvimento do tubo intestinal de esquistossômulos (ANDRADE & SADIGURSK, 1978), o que pode explicar a detecção precoce deste material no soro de animais infectados.

Como sugerido (CAVALLO *et. al.*, 1974; VAN MARK *et. al.*, 1977; VAN MARK, 1975), o antígeno polissacarídeo é removido da circulação por células retículo endoteliais, e apenas quando essas células estão saturadas, os antígenos aparecem na circulação sistêmica. Para isso é importante que os pacientes hepatoesplênicos tenham uma maior carga parasitária.

Outras pesquisas demonstraram que a indução da circulação colateral por ligação parcial da veia porta resulta em maior deposição de imunoglobulinas e complemento em glomérulos de ratos infectados com *S. mansoni* (VAN MARCK *et. al.*, 1977). Isso indica que existe desvio de complexos imunes, o que aumenta a possibilidade desses antígenos de alcançarem os rins e outros órgão ligados à circulação sistêmica. É importante que, em esquistossomose hepatoesplênica, haja circulação colateral por causa da obstrução parcial pré-sinusoidal do sistema porta, o que ocorre em praticamente todos os casos (ANDRADE & ROCHA, 1979).

### 1.3 HISTOFISIOLOGIA RENAL E PATOGÊNESE DA GLOMERULOPATIA ESQUISTOSSOMÓTICA

O estudo da estrutura renal, em seus níveis macro e micro, é essencial para aprimorar as análises histológicas das diversas patologias e compreender o complexo e emaranhado processo que se desenvolve, as alterações, a repercussão funcional e a reversão nos casos passíveis de tratamento. Assim, convém realizar uma breve identificação da estrutura renal, antes de descrever as alterações e os processos que fazem parte da patogênese da glomerulopatia esquistossomótica.

A macroestrutura renal é formada por uma cápsula de tecido conjuntivo denso rico em colágeno, uma zona cortical periférica, e a zona medular mais extensa e interna. Os rins são constituídos pela associação de néfrons. São formados pelo corpúsculo renal, pelo túbulo contorcido proximal, pelas partes delgadas e espessas da alça de Henle e pelo túbulo contorcido distal (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 1999; GLEREAN, 2003). O corpúsculo renal é formado, por um novelo de capilares sanguíneos envolvidos pela cápsula de Bowman, com folheto externo e interno (glomérulo), pelos túbulos contorcidos que são corticais, e pela alça de Henle que se localiza na zona medular (GLEREAN, 2003).

As células presentes nos néfrons são suscetíveis a sofrerem alteração, hiperplasia e poliploidia, resultante do processo de inflamação causado pelos depósitos de complexos imunes nos glomérulos renais, formados no estado grave da esquistossomose. Essas células

correspondem às endoteliais, aos podócitos do folheto interno da cápsula de Bowman e principalmente às células mesangiais (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 1999).

As células mesangiais estão presentes nas paredes dos capilares glomerulares, entre as células endoteliais e a lâmina basal, e em pontos da parede capilar onde a lâmina basal envolve duas ou mais alças capilares (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 1999). Algumas alterações envolvem aumento do número de células mesangiais resultantes da inflamação desencadeada no glomérulo. Essas células parecem ser elementos de sustentação dos capilares e removem os resíduos resultantes da filtração, retidos na parede do capilar. Para manter a eficiência do sistema de filtração, as células mesangiais intraglomerulares fagocitam a lâmina densa, que é parte da lâmina basal, renovada pelas ações combinadas dos podócitos e das células endoteliais. Já as células mesangiais extraglomerulares são pertencentes ao aparelho justaglomerular, formado pela mácula densa, pelo túbulo contorcido distal, e pelas células musculares justaglomerulares (GARTNER & HIATT, 2007).

As alterações que ocorrem no processo de inflamação renal (glomerulonefrite), em casos de esquistossomose crônica, afetam os constituintes corticais. Essas alterações são bem variadas e podem ser observadas na estrutura de secções da cortical de um rim na fase crônica da doença<sup>1</sup>. Para uma melhor compreensão sobre os efeitos dos depósitos de complexos imunes no rim, desencadeando a glomerulopatia esquistossomótica, é importante considerar as vias vasculares deste órgão.

Cada rim é suprido pela artéria renal, ramo direto da aorta abdominal (GARTNER & HIATT, 2007) que origina as artérias interlobares, as quais penetram pelas pirâmides medulares e originam as artérias arciformes. As artérias interlobulares, derivadas das arciformes, se prolongam pela cortical até a cápsula renal e, durante sua extensão, dão origem a pequenos vasos, as arteríolas glomerulares aferentes, que formam o plexo capilar dos glomérulos corticais. O sangue chega aos capilares glomerulares com pressão arterial que permite a filtração através das paredes capilares e principalmente através da lâmina basal glomerular, que retém diversas substâncias, inclusive os complexos imunes (GARTNER & HIATT, 2007).

Embora ainda não esteja completamente explicada, a patogênese da glomerulonefrite esquistossomótica está associada à agressão do sistema portal pela parasitose, e o envolvimento renal se faz através de mecanismo imunológico, em que antígenos específicos

---

<sup>1</sup> Algumas das alterações serão demonstradas neste trabalho, resultantes da indução de glomerulopatia esquistossomótica em modelo murino.

dos vermes são detectados nos glomérulos (MARTINELLI & ROCHA, 1996). A glomerulonefrite aguda é resultado de uma infecção na qual a presença de antígenos estimula o corpo a secretar anticorpos que formam complexos imunes com os antígenos. Na esquistossomose, a glomerulonefrite tem início quando os antígenos polissacarídeos regurgitados pelo helminto adulto conseguem atingir a corrente sistêmica. Os anticorpos detectados nos glomérulos são específicos para os antígenos do tubo digestivo do parasita (SOBH *et. al.*, 1988). Assim, a glomerulopatia esquistossomótica é consequência da presença dos antígenos catódicos (CCA) e anódicos (CAA) do verme nos rins, já isolados em depósitos glomerulares de humanos e animais experimentais, acoplados aos anticorpos e complementos.

Os complexos imunes formados são filtrados pela lâmina basal, entre os podócitos e as células endoteliais do glomérulo. Então, à medida que os complexos imunes ficam retidos na lâmina basal e promovem o bloqueio da área de filtração sanguínea nos glomérulos, as células epiteliais e mesangiais proliferam. Normalmente, em inflamação aguda de rins por infecções variadas, os glomérulos se recuperam sozinhos, e a função renal volta ao normal. Mas, se a lesão for extensa, essa função é permanentemente impedida (GARTNER & HIATT, 2007). A lesão renal na esquistossomose se mostra progressiva e a doença evolui independentemente de tratamento para a insuficiência renal (LAMBERTUCCI *et. al.*, 2005; SOUZA *et. al.*, 2011).

#### 1.4 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS E TRATAMENTO

Estudos experimentais têm sugerido outros fatores importantes, além dos antígenos do verme, envolvidos na gênese da doença glomerular esquistossomótica, tais como: a circulação colateral do sistema porta em decorrência do grau de envolvimento hepático; a capacidade macrofágica do fígado; a gravidade e duração da infestação esquistossomótica e, ainda, os fatores raciais e genéticos do hospedeiro (MARTINELLI & ROCHA, 1996).

A infecção pelo *S. mansoni* desencadeia, inicialmente, a ocorrência de sinais e sintomas agudos da infecção, mormente dermatite cercariana e febre de Katayama (VITORINO *et. al.*, 2012). As alterações hepáticas típicas surgem a partir do início da oviposição e formação de granulomas, quando se tem um quadro evolutivo dependente do número de ovos que chega ao órgão, bem como do grau de reação granulomatosa que os mesmos induzem (ARIADNA, 2001). Os granulomas apresentam três fases de desenvolvimento: a fase necrótica exsudativa, com uma zona de necrose em volta do ovo, circundada por exsudação; a fase produtiva, com início de reparação da área necrosada; e a

fase de cura ou fibrose, quando o granuloma é endurecido e denominado nódulo (NEVES *et. al.*, 2010).

A esquistossomose pode se apresentar como aguda ou crônica. Na fase aguda a sintomatologia é variada e as reações do corpo ocorrem de forma mais intensa, já que a hipersensibilidade é maior no início da infecção. Na fase crônica da doença essas reações diminuem, assim como ocorre redução do tamanho dos granulomas por modulação de resposta imune, reduzindo a sintomatologia, de modo benéfico ao paciente. Em exame físico, podem apresentar hepatomegalia com proeminência do lobo esquerdo e esplenomegalia (ANDRADE & ROCHA, 1979). A glomerulopatia, inicialmente, pode ser assintomática ou se manifestar, mas a grande maioria dos pacientes se apresenta nos postos de atendimento médico com a síndrome nefrótica, e uma pequena parcela se apresenta com insuficiência renal avançada (MARTINELLI & ROCHA, 1996). Na infecção esquistossomótica aguda existem também manifestações da doença mediada por imunocomplexos, como ocorre com a fase crônica no desenvolvimento da glomerulopatia.

Vários trabalhos epidemiológicos mostram que pessoas com faixas etárias mais jovens, entre 5 e 20 anos são as mais afetadas pela esquistossomose, apresentando maior prevalência e cargas parasitárias mais altas, por fatores relacionados ao sistema imunológico. Já no que se refere ao gênero, as diferenças são mais por problemas comportamentais do que imunológicos, afetando mais indivíduos do sexo masculino. Quanto à etnia, existe menor incidência de formas graves entre os negros (NEVES *et. al.*, 2010; MARTINELLI & ROCHA, 1996). Barbosa e Barbosa (1998) constataram que a intensidade de infecção pelo *S. mansoni* é variável conforme o número de contatos dos indivíduos com águas infectadas, ou seja, quanto maior o número de contatos (prováveis reinfecções) maior a intensidade da infecção.

A esquistossomose mansônica é uma doença resultante da reação inflamatória desencadeada pela presença de ovos nos tecidos, sendo que um casal de *S. mansoni* (SM) pode provocar até 200 granulomas por dia. O efeito acumulativo das lesões pode resultar no aparecimento de formas graves da doença, mesmo com cargas parasitárias baixas, causando complicações como os depósitos de complexos imunes no glomérulo, cujas reações inflamatórias levam a graves consequências renais (NEVES *et. al.*, 2010).

A glomerulopatia esquistossomótica é uma doença renal que pode apresentar vários tipos histológicos, podendo evoluir para a fase final de insuficiência renal (RAMOS & ANDRADE, 1987, ANDRADE & MARCK, 1984). Na maioria dos pacientes com o quadro de síndrome nefrótica, o achado anátomo-patológico é de glomerulonefrite mesângio-

proliferativa, com depósito glomerular de IgG e IgM, detectado por imunofluorescência. Este é provavelmente o tipo mais frequente da glomerulopatia esquistossomótica, tanto em humanos como em modelos experimentais, sugerindo que a área mesangial é o primeiro e principal sítio de depósito do antígeno parasitário. O tipo histológico de glomerulosclerose segmentar focal apresenta a segunda maior frequência entre pacientes, sendo seguida por outras glomerulonefrites proliferativas (NUSSENZVEIG *et. al.*, 2002).

Pode-se classificar clinicamente (HUGGINS *et. al.*, 1998; MALTA, 1994, SOUZA, 2011) a nefropatia esquistossomótica em:

- Incipiente – fase I – na qual as alterações apresentam-se apenas à luz da microscopia eletrônica;
- Proliferação mesangial – fase II – sem evidência clínica e laboratorial, porém já visualizável através da microscopia ótica;
- Síndrome edemigênica – fase III – com alterações laboratoriais como proteinúria, cilindrúria e hematúria, porém raramente com piúria;
- Síndrome nefrótica – fase IV – frequentemente acompanhada por graus variáveis de insuficiência renal.

Experimentalmente em camundongos, a lesão renal tem sido vista apenas numa fase inicial, com pequena proliferação de células mesangiais, “glomerulite”, em que os antígenos esquistossomóticos, anticorpos e frações do complemento já são passíveis de serem demonstrados nas estruturas renais (ANDRADE & ROCHA, 1979).

No trabalho de Sobh e colaboradores (1998), um estudo clínico com pacientes portadores de nefropatia esquistossomótica que foram tratados, observou-se que nenhum deles apresentou regressão das lesões renais, ou seja, em determinado estágio da doença, o tratamento antiparasitário não produz remissão das lesões. De 1968 a 1977 três excelentes medicamentos curativos contra a esquistossomose se tornaram disponíveis: hycanthone (1968), oxamniquine (1973) e praziquantel (1977) (ANDRADE, 1998).

O tratamento quimioterápico com os medicamentos mais utilizados (oxamniquine e praziquantel) demonstraram, em vários estudos epidemiológicos, prevenir o desenvolvimento de formas graves da doença, apesar de na fase crônica, como em casos de insuficiência renal, não apresentarem remissão do quadro. No tratamento da esquistossomose utiliza-se normalmente o anti-helmíntico praziquantel, droga que demonstra grande eficácia e poucas reações adversas. Existem evidências de que o praziquantel induz a mudanças, não permanentes, na resposta imune do hospedeiro, que ocorrem logo após a sua administração

(primeiras 12 horas), aumentando a resposta a antígenos específicos do *Schistosoma*, que passam a ter maior exposição, e com isso ocorre alteração na produção de algumas citocinas. (REIMERT *et. al.*, 2006, RIBEIRO *et. al.*, 2004).

O praziquantel tem forte ação esquistossomicida, ocorrendo nos primeiros 15 minutos após sua administração e age sobre todas as espécies do gênero *Schistosoma* que infectam o homem, mas demonstra baixa efetividade sobre as formas imaturas do *S. mansoni* (TAVARES, 2009; HINES-KAY *et. al.*, 2012; DONG *et. al.*, 2010). Pertencente ao grupo químico isoquinoleínico pirazínico de amplo espectro anti-helmíntico, cuja estrutura química dificulta a resistência cruzada com oxamniquine, obtém cura em cerca de 90% dos pacientes tratados e avaliados por exame de fezes e biópsia. Apresentando efeitos colaterais passageiros e pouco intensos, a droga depende da resposta imune específica no processo de eliminação dos vermes (NEVES *et. al.*, 2010; VICTORINO *et. al.*, 2012)

O praziquantel atua na permeabilidade ao  $\text{Ca}^{++}$  nas células do helminto, aumentando a concentração desse íon, provocando vacuolização e destruição tegumentar, expondo no verme os antígenos alvo da resposta imune do hospedeiro (SILVA, 1993; LAMBERTUCCI *et. al.*, 1982). Atualmente, o medicamento está sendo produzido e utilizado pelo Ministério da Saúde para o tratamento da esquistossomose mansônica (NEVES *et. al.*, 2010; SILVA *et. al.*, 2012).

No que concerne ao transplante renal como forma de reverter o quadro de glomerulopatia e insuficiência renal, Azevedo e colaboradores (1987) encontraram recorrência da doença em 2 dos 11 pacientes diagnosticados previamente com glomerulopatia esquistossomótica e transplantados. Mahmoud e colaboradores (2001), considerando a grande incidência de complicações relacionadas com o *Schistosoma* após o transplante renal, afirmam que os pacientes infectados podem ser receptores adequados para esse transplante desde que sejam tratados previamente.

Vários trabalhos demonstram a importância da reinfecção para o desenvolvimento da forma grave na esquistossomose. Katz e Brener (1966) demonstraram evidências da importância da reinfecção para estabelecer a forma hepatoesplênica, em que a ausência do foco parasitário é seguida pela reversão desta forma. Conceição e colaboradores (1991) apresentaram observações similares, em pacientes sem possibilidade de reinfecção e tratados. Poucos anos depois, Bina (1995) também observou a redução das formas graves de hepatomegalia e esplenomegalia, com o combate do hospedeiro intermediário, o caramujo *B. glabrata*, em que ocorreu ruptura da transmissão da esquistossomose. Já em modelo experimental, segundo Santos e colaboradores (2000), poucos animais conseguem desenvolver a forma hepatoesplênica da esquistossomose com lesões hepáticas e obstruções

parciais que levem ao envolvimento renal, sofrendo uma única infecção. Isso mostra o quanto é essencial a realização de infecções repetidas neste trabalho.

Em um estudo realizado no Hospital Universitário Prof. Edgard Santos, verificou-se uma redução no número de casos com glomerulopatia esquistossomótica, a qual se correlacionou com a diminuição dos casos da forma hepatoesplênica da doença na Bahia, tal redução já havia sido documentada por Martinelli & Rocha, em 1989. Trabalhos mais recentes apontam que a proporção continua a mesma: dentre os portadores da forma hepatoesplênica, 10 a 15% desenvolvem glomerulopatia (CORREIA *et. al.*, 1997, ANDRADE & MARCK, 1984, ANDRADE, 1998, RODRIGUES *et. al.*, 2010).

Analisando a prevalência de casos com envolvimento renal na esquistossomose, observam-se diferentes perspectivas. No material de autópsia, em um estudo realizado por Andrade e colaboradores em dois trabalhos publicados em 1968 e 1971, os autores encontraram prevalência de glomerulonefrite histologicamente diagnosticada em 10% a 12% dos pacientes com a forma hepatoesplênica. Em outro estudo no ambiente hospitalar, Rocha e colaboradores (1976), encontraram manifestações clínicas de envolvimento renal em 15% dos pacientes com a forma hepatoesplênica. Brito (1973), por sua vez, encontrou glomerulonefrite em 21% dos pacientes submetidos à biópsia renal no centro de referência para doença renal.

Os dados apresentados nesses estudos não refletem a prevalência real do envolvimento renal na esquistossomose, porque são dados de pacientes hospitalizados, portanto existe seleção. Em um estudo de campo em área endêmica, Bina e colaboradores (1985) encontraram proteinúria em 14,8% dos pacientes, sendo que entre eles 24,7% apresentavam a forma hepatoesplênica e 4,6% possuíam a forma hepatointestinal. Assim, apesar da maioria dos pacientes com envolvimento renal apresentarem a forma hepatoesplênica, observou-se nesses pacientes também a forma hepatointestinal. Este estudo indica uma prevalência mais próxima da real.

Várias técnicas são utilizadas no diagnóstico, estudo, análise clínica e experimental da glomerulopatia esquistossomótica. Algumas delas se tornam mais importantes pela especificidade do diagnóstico, por demonstrarem a causa e as alterações no tecido renal, devido ao processo inflamatório que se desenvolve. Dentre elas, se destacam: a imunofluorescência, através da qual depósitos de IgG e IgM são marcados e descritos no mesângio e ao longo da membrana basal glomerular; e a microscopia eletrônica, que revela a presença de depósitos eletrodensos também em localizações variáveis (geralmente subendoteliais e mesangiais), além da fusão dos processos podais e das alterações da membrana basal (MARTINELLI & ROCHA, 1996).

Outras metodologias, como a quantificação da carga parasitária, presença de vermes adultos nas veias mesentéricas, exame de fezes e dos aspectos histopatológicos em microscópio óptico, auxiliam a detectar, acompanhar e entender as alterações e os efeitos positivos do tratamento da parasitose, mas não são determinantes no estudo da glomerulopatia. A glomerulonefrite pode apresentar diferentes aspectos e diferentes níveis de evolução do envolvimento renal. Nos casos assintomáticos, que ocorrem no início da glomerulopatia, as alterações histológicas são mínimas, apresentando normalmente uma glomerulonefrite proliferativa mesangial, e não há achados histológicos específicos que permitam distinguir a glomerulopatia esquistossomótica das formas idiopáticas (SOUZA, 2011; MARTINELLI & ROCHA, 1996; HUGGINS *et. al.*, 1998; MALTA, 1994).

### 1.5 CAMUNDONGOS COMO MODELO EXPERIMENTAL

Os modelos experimentais são utilizados em grande escala nas pesquisas para melhor compreensão da fisiopatologia, imunologia e anatomopatologia das parasitoses, bem como das intervenções com os tratamentos específicos em teste. O emprego desses modelos tem contribuído para o entendimento de vários fatores que envolvem a patogênese e o desenvolvimento das doenças, sendo que cada um deles podem apresentar vantagens e desvantagens, e se destacam ao possuir um curso da doença mais parecido ao que ocorre na forma humana.

Por vários anos, diferentes modelos foram testados com o objetivo de acompanhar, detalhadamente, o desenvolvimento da esquistossomose mansônica. Camundongos, hamsters, ratos, coelhos e macacos estão entre os animais mais utilizados em laboratórios (STIREWALT *et. al.*, 1951; WARREN & PETERS, 1967; SOUZA *et. al.*, 1992). Entretanto, o uso destes animais como modelos experimentais nas esquistossomoses nem sempre é satisfatório, já que podem não refletir certas situações que ocorrem naturalmente na infecção humana (SILVA, 1984; SOUZA *et. al.*, 1992).

Warren e Peters (1967), ao fazerem comparações do desenvolvimento da doença em vários modelos, cita o coelho como um “mau hospedeiro” para as infecções com *S. mansoni*, já que, com o passar do tempo, a carga parasitária se reduz consideravelmente nesse animal. Além disso, os ovos não aparecem nas fezes, não amadurecem nos tecidos e por isso não têm ação patogênica, não sendo possível acompanhar o desenvolvimento da infecção. Apesar dessas limitações, o coelho é muito utilizado por ser de fácil acesso, médio porte e apresentar,

costumeiramente, excelente resposta humoral face às diversas infecções (ANDRADE *et. al.*, 1988).

Outros modelos apresentam características peculiares, como resistência parcial à reinfeção pelo *S. mansoni*, como tem sido demonstrado em várias espécies de roedores e primatas. Um macaco rhesus imunizado e repetidamente infectado com cercárias normalmente apresenta destruição dos esquistossômulos, associada a grande número de eosinófilos na pele. Ratos parcialmente imunes manifestam redução acentuada de vermes adultos e esquistossômulos. Tais experiências demonstram que o eosinófilo é um fator essencial na imunidade *in vivo*, relacionada a resistência à reinfeção pelo helminto parasita (MAHMOUD *et. al.*, 1975).

A esquistossomose mansônica, que pode apresentar a forma de fibrose portal, encontrada em pacientes com a forma clínica grave de hepatoesplenomegalia, na esquistossomose crônica, é caracterizada por alguns aspectos principais, como a hipertensão portal e lesões vasculares com obstruções parciais. A reprodução experimental da doença em chimpanzés, com infecções densas por *S. mansoni*, não tem se adequado ao uso frequente, uma vez que diferencia da esquistossomose humana por não manifestar hipertensão portal (SADUN *et. al.*, 1970).

A utilização de babuínos como modelo experimental para esquistossomose humana tem vários pontos positivos, já que são representantes próximos dos humanos, com semelhanças anatômicas, genéticas e imunológicas. Além disso, possuem tamanho moderado para o bom acompanhamento da doença, adquirem a infecção e desenvolvem as formas hepáticas, intestinais e a glomerulopatia na esquistossomose. Mas, ainda são pouco utilizados como modelos experimentais pelo seu elevado custo, tanto na aquisição como para a manutenção desses animais (FLANNERY, 2003).

Os ratos apresentam infecção natural pelo *S. mansoni*, desenvolvem lesões teciduais, eliminam ovos viáveis à continuidade do ciclo do helminto, se reproduzem facilmente e não necessitam de muito espaço (SOUZA *et. al.*, 1992). Porém, os ratos tendem a destruir as formas larvares do *S. mansoni* na pele e pulmões de forma mais intensa do que o fazem os camundongos evitando uma infecção grave (SOUZA *et. al.*, 1992).

Nos ratos, a intensidade de infecções experimentais com esquistossomas é geralmente muito alta. Um único par de vermes de *S. mansoni* em um rato pode ser equivalente a mais de 1.000 pares em uma pessoa infectada. Por isso, a cronicidade das infecções nos seres humanos é, obviamente, não semelhantemente reproduzível na maioria dos modelos animais (CHEEVER, 1969; GRYSEELS & DE VLAS, 1996, *apud* CHEEVER *et. al.*, 2002).

As lesões renais foram demonstradas em várias espécies de macacos (VON LICHTENBERG *et. al.*, 1971), coelhos (VON LICHTENBERG *et. al.*, 1972), hamsters (HILLYE, 1973) e camundongos (ANDRADE & SUSIN, 1974; VAN MARCK *et. al.*, 1977) fortemente infectados seja com o *S. mansoni* ou *S. japonicum*. A aparência destas lesões era semelhante às encontradas em humanos.

Estudos com esquistossomose mansoni têm envolvido vários modelos experimentais já citados, mas a glomerulopatia relacionada a esta parasitose é encontrada em apenas alguns animais e com diversas diferenças em relação à forma humana. Sadun e colaboradores (1966) estudaram a infecção em chimpanzés jovens, mas os submetem à eutanásia somente após o sétimo mês de infecção, em que lesões renais significativas já haviam ocorrido, sem um acompanhamento prévio. Eles, no entanto, afirmaram que os sintomas clínicos, achados parasitológicos e sorológicos, bem como lesões patológicas lembravam o curso da infecção descrita no homem.

Em babuínos, os estudos mais significantes encontraram depósitos de imunoglobulinas, em que os anticorpos seguiram o padrão usual no qual o IgM aparece primeiro, seguido por anticorpos IgG. As observações nos animais submetidos à eutanásia com pouco tempo de infecção demonstraram, em imunofluorescência, depósitos focais e segmentares de imunoglobulinas, principalmente de IgM. Em microscopia óptica os rins se apresentaram normais, apenas com proliferação mesangial e pequeno espessamento das paredes capilares em alguns poucos glomérulos. As lesões graves ocorreram em 6% dos animais, com imunofluorescência apresentando depósitos intensos presentes em todos os glomérulos, depósitos positivos para IgG e, em microscopia óptica, a maioria apresentou glomerulonefrite membrano-proliferativas (HOUBA *et. al.*, 1977).

Em macacos, os estudos descreveram, na microscopia óptica, leve aumento de glomérulos com pequena hiperplasia focal e ainda hipertrofia de células mesangiais. Em microscopia eletrônica foram encontrados pequenos depósitos eletrodensos distribuídos focalmente abaixo do epitélio e endotélio da membrana basal, em algumas partes os depósitos foram também localizados no interior da membrana basal (BRITO *et. al.*, 1971). Na imunofluorescência encontraram depósitos de IgM, IgG e complemento no interior do mesângio, em um padrão de distribuição difusa, sendo que em microscopia óptica observaram distorção e espessamento da membrana basal (NATALI & CIOLLI, 1974 e 1976).

Em hamster ocorrem alterações histológicas desenvolvidas nos rins, consistindo em pequenos focos de hiperplasia mesangial e endotelial, glomerulosclerose, em que menores cargas parasitárias produzem menos lesões. Em imunofluorescência apresentaram

marcação positiva para imunoglobulinas distribuídas em uns poucos glomérulos (HILLYER & LEWERT, 1974). Em camundongos, a microscopia óptica apresenta apenas pequenas alterações, sendo que em imunofluorescência são encontrados depósitos de IgG no mesângio e ao longo das paredes capilares. Na microscopia eletrônica já foram demonstrados depósitos irregulares localizados principalmente nas áreas mesangiais e na membrana basal glomerular (ANDRADE & SUSIN, 1974).

As maiores diferenças entre a infecção esquistossomótica experimental e a infecção natural em humanos é que as infecções experimentais são controladas, passíveis de serem produzidas com intensidade elevada, por serem infecções com isolados definidos. A duração da infecção e a carga de parasitas que cada animal recebe em estudo são definidas e semelhantes, além de algumas características patológicas de infecção crônica serem difíceis de reproduzir em camundongos, nos quais a coinfeção com outros parasitas pode ser evitada (BURKE *et. al.*, 2009).

Os camundongos são mais sensíveis às infecções naturais e experimentais, desenvolvendo infecções mais intensas, comparado aos outros modelos de roedores muito utilizados, como o rato e o hamster. Por isso, o modelo murino é considerado mais adequado a este trabalho, além de apresentar os mecanismos mecânicos e imunológicos de fibrose Pipestem, e as lesões porto-venosas obstrutivas, muito semelhantes às lesões humanas responsáveis pela hipertensão portal (SANTOS *et. al.*, 2000).

Na esquistossomose em humanos, as infecções são adquiridas de forma gradual, cuja intensidade varia, mas normalmente é baixa, ocorrendo com vários isolados do parasita, embora as formas crônicas também sejam observadas. É difícil definir o período de ocorrência da infecção, controlar possíveis reexposições, além de ser eticamente proibido investigar pacientes a longo prazo. A coinfeção com outros parasitas é comum, podendo influenciar o resultado da infecção (BURKE *et. al.*, 2009).

A hipertensão portal é um dos problemas iniciadores da doença renal pela esquistossomose, já que propicia o aparecimento da circulação colateral, permitindo que o antígeno atinja a circulação sistêmica e que os complexos imunes se formem e depositem no córtex renal. A glomerulonefrite vista em humanos infectados não tem sido descrita em animais parasitados pelo *S. mansoni* (CHEEVER *et. al.*, 2002). Os camundongos desenvolvem, normalmente, as alterações renais iniciais do processo inflamatório que ocorre na glomerulopatia esquistossomótica humana, envolvendo hipertrofia e hiperplasia de células mesangiais e alterações diversas da membrana basal glomerular, distorções, espessamento e duplicações (ANDRADE & SUSIN, 1974; ANDRADE & MARCK, 1984). Definida como

uma simples “glomerulite”, é exatamente a inflamação inicial e sua resposta ao tratamento específico que se procura avaliar, principalmente, se tal tratamento consegue influenciar a evolução da doença renal logo que se instala.

## 1.6 REPOSTA IMUNE E GLOMERULOPATIA

A esquistossomose é uma doença causada predominantemente pela resposta imune do hospedeiro a antígenos do parasita (BURKE *et. al.*, 2009). Inicialmente ocorrem as reações aos antígenos do ovo, formando granulomas e fibro-obstruções, até a repercussão da deposição dos complexos imunes, consequência dos antígenos liberados pelo verme adulto durante a regurgitação. Os complexos imunes levam a mecanismos de aquisição lenta de resistência imunológica, apesar de fatores da imunidade inata também desempenharem seu papel. O perfil imunitário antes, durante e depois da infecção talvez seja o fator mais importante na determinação e evolução das formas clínicas, e na transição das fases aguda e crônica da esquistossomose. Já no ciclo evolutivo do *S. mansoni*, o helminto passa por alterações morfológicas e bioquímicas significantes para escapar dos complexos mecanismos do sistema imunológico do hospedeiro (GRYSEELS *et. al.*, 2006).

A primeira “linha de defesa” do hospedeiro definitivo contra a infecção é a reação inflamatória dérmica e subdérmica, originando a dermatite cercariana, que ocorre nas primeiras 12 horas após a penetração das cercárias, capaz de destruir, ainda na pele, uma grande quantidade de cercárias e esquistossômulos. Na passagem pela epiderme e derme ocorre reação de hipersensibilidade imediata com ativação dos componentes da resposta imune inata. Em dois dias organiza-se um infiltrado inflamatório, que se mantém até a segunda semana, quando começa a ocorrer redução nesse cenário. Os esquistossômulos podem causar hepatite aguda e infiltração de neutrófilos, linfócitos e eosinófilos. A transformação de esquistossômulos em vermes adultos coincide com o início das manifestações clínicas da esquistossomose aguda, que é dividida nos períodos evolutivos de pré-patente (antes da oviposição) e pós-patente (após a oviposição) (PRATA, 2007; SOUZA *et. al.*, 2011).

Investigações em modelos murinos demonstraram que inicialmente predomina resposta imune do tipo Th1, responsável pelas lesões teciduais e manifestações clínicas da fase aguda, substituída por Th2 na fase pós-patente. Reações como a citotoxicidade celular dependente de anticorpos (ADCC) têm ação efetora sobre os esquistossômulos, mas é inócua ao helminto adulto. Com a oviposição, a maioria dos ovos alcança a luz do intestino e são

eliminados, o restante são carreados até o fígado. Esses ovos liberam antígenos que induzem à mobilização de macrófagos, eosinófilos, linfócitos e plasmócitos, havendo mediadores em que algumas das células transformam-se em fibroblastos, orientando a organização de camadas concêntricas em toda a espessura do granuloma, com grande produção de colágeno (CARVALHO *et. al.*, 2008; SOUZA *et. al.*, 2011).

Na resposta imunológica tipo Th2 ocorre aumento de IL-5, principalmente em resposta aos antígenos dos ovos. Esse aumento estimula os eosinófilos (EO) na medula óssea, resultando na eosinofilia sanguínea, recrutados especificamente para o sítio de deposição dos ovos, o infiltrado celular resulta no granuloma hepático, sendo os eosinófilos aproximadamente 50% das células do infiltrado (DEJANI *et. al.*, 2010). Assim, em torno dos ovos alojados nos diferentes tecidos ocorre resposta inflamatória glanulomatosa e fibrótica, enquanto os ovos secretam antígenos principalmente pela membrana interna da casca do ovo maduro, que atravessam os poros, disseminando-se. Na fase aguda da doença, a reação granulomatosa é exarcebada, atingindo volume de até 100 vezes o do ovo, enquanto que na fase crônica este granuloma atinge dimensões bem menores (NEVES *et. al.*, 2010).

O avanço da esquistossomose, fruto da hipertensão portal e conseqüentemente da neovascularização, que remodelam e proporcionam uma nova arquitetura vascular hepática, disponibilizam um novo caminho de circulação sanguínea que ultrapassa a filtragem do fígado. Isso permite que os antígenos liberados pelo verme se tornem disponíveis na circulação sistêmica, dando origem a outro mecanismo fisiopatogênico importante. Nesse mecanismo ocorre então, indução subsequente da produção das imunoglobulinas, com a reação antígeno-anticorpo, formação dos imunocomplexos circulantes e deposição glomerular destes, originando a nefropatia esquistossomótica. Alguns autores já questionavam, mas não chegaram a estudar, sobre a hipótese deste trabalho, em que concerne a idéia de que sendo uma doença glomerular associada a uma doença parasitária crônica, imunologicamente mediada, seria concebível que o tratamento específico dessa parasitose pudesse reverter ou prevenir a progressão da glomerulopatia esquistossomótica, logo que esta se instala (MARTINELLI & ROCHA, 1996).

A imunidade protetora envolve uma resistência adquirida contra reinfecções, apresentando um mecanismo de atenuação dos efeitos da doença, com resposta imunológica, principalmente do tipo Th2, contra as formas imaturas infectantes (cercárias), impedindo superinfecção e mecanismos imunomodulares da resposta granulomatosa. A eficácia dessa imunidade é parcial, já que parte dos parasitas das reinfecções consegue atingir a fase adulta e também não afeta os vermes adultos já estabelecidos no sistema porta. O verme adulto

consegue escapar da resposta protetora por meio de um mecanismo de síntese ou aquisição de antígenos semelhantes aos do hospedeiro, alterando a superfície externa do parasita. A presença de camadas tegumentares espessas e a rápida renovação do tegumento quando lesado são outros processos adaptativos do parasita ao seu hospedeiro (NEVES *et. al.*, 2010).

Existem ainda indivíduos em áreas endêmicas que ficam expostos a águas com cercárias e mesmo assim não apresentam ovos de *Schistosoma* nas fezes. Estes, além de possuir um balanço positivo ao IgE na relação IgE/IgG4, possuem altos níveis de interferon gama de resposta do tipo Th1, e forte resposta à paramiosina, antígeno do *S. mansoni*, combinando assim resposta protetora imunológica (Th1 e Th2), não se infectando ou desenvolvendo cargas parasitárias muito baixas (NEVES *et. al.*, 2010). Embora tenha se extraído material antigênico do ovo do *S. mansoni*, já foram demonstrados em pacientes e animais infectados que a glomerulopatia esquistossomótica está mais relacionada aos antígenos provenientes do verme adulto (MARTINELLI & ROCHA, 1996).

Os produtos de secreção dos vermes adultos do *S. mansoni* constituem antígenos que, quando depositados nos tecidos, juntamente com as imunoglobulinas e o sistema de complemento, resultam em reações inflamatórias que lesam os tecidos em volta. Os polissacarídeos provenientes do verme, conhecidos como antígenos anódicos e catódicos circulantes, são importantes por se depositarem na membrana basal glomerular, já na forma de complexo imune, podendo estar presentes também nas células mesangiais intraglomerulares que removem resíduos da membrana basal (KIBUKAMUSOKE, 1984).

Isso remete a questão principal do trabalho, que implica sobre se o tratamento quimioterápico utilizando o praziquantel irá conseguir, na fase inicial da glomerulopatia, influenciar na presença e deposição dos complexos imunes na membrana basal e na região mesangial (glomerular), que causam a inflamação nessa região, e se ocorre renovação da estrutura e do sistema circulatório renal.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o comportamento das alterações renais em camundongos infectados pelo *S. mansoni*, antes e após tratamento com Praziquantel a fim de observar a resposta a presença dos complexos imunes e ao processo inflamatório formado na glomerulopatia.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1 Induzir, através de reinfecções, a esquistossomose hepatoesplênica nos camundongos para estudar experimentalmente a glomerulopatia esquistossomótica.

2 Acompanhar e analisar a progressão das alterações renais, sobretudo os depósitos de complexos imunes, antes e após o tratamento da parasitose.

3 Estudar a morfologia renal na esquistossomose mansoni, caracterizando por análise ultraestrutural e imunofluorescência os depósitos eletrodensos causadores da glomerulopatia.

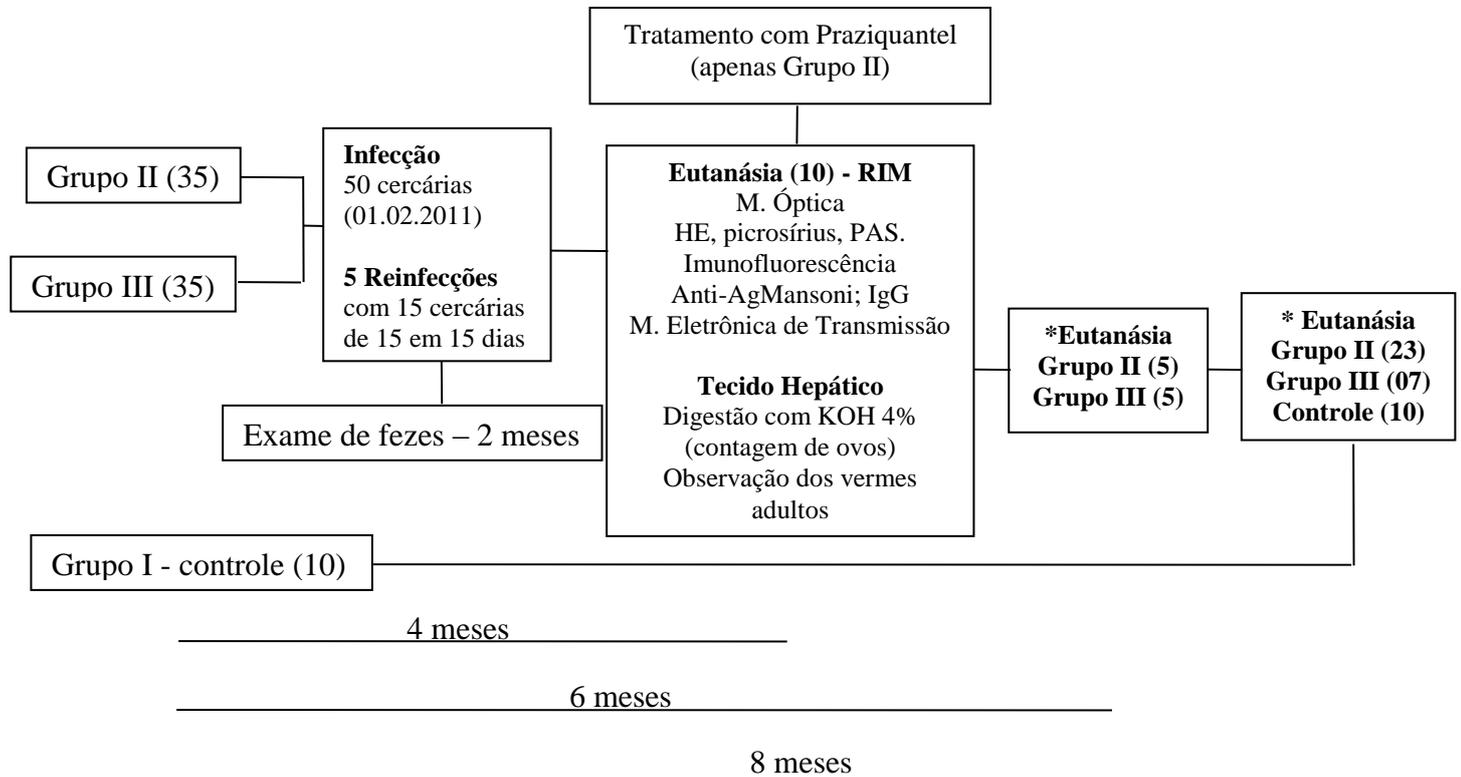
4 Quantificar, morfometricamente, os depósitos de complexo-imune nos glomérulos renais através da área em que são encontrados depositados.

### 3 JUSTIFICATIVA/RELEVÂNCIA

A glomerulopatia esquistossomótica crônica, ou avançada, provocada por infecção do *S. mansoni* em seres humanos, não regride frente ao tratamento com o medicamento praziquantel. Mas, ainda não se conhece a repercussão deste tratamento, tanto em humanos como em modelos experimentais, quando realizado no período inicial do desenvolvimento das alterações renais, sem ainda apresentar as manifestações clínicas da doença. Os trabalhos relacionados ao tratamento do envolvimento renal, principalmente utilizando modelos experimentais, ainda são bastante escassos, já que a maioria envolve apenas observações clínicas. Faz-se necessário, portanto, compreender as alterações que ocorrem na estrutura renal em animais experimentais, para um maior conhecimento das respostas ao tratamento da parasitose.

Como normalmente é observado em modelo experimental de camundongos, a infecção provoca apenas uma glomerulite, ou seja, uma pequena proliferação de células mesangiais e alterações na membrana basal, que correspondem à fase inicial do comprometimento renal na esquistossomose. Um estudo envolvendo o tratamento destes animais, que desenvolvem as alterações iniciais da glomerulopatia, é capaz de fornecer informações relacionadas à influência do medicamento sobre o desenvolvimento das lesões renais e sobre o acúmulo de complexos imunes na região glomerular, o que provoca o processo inflamatório e desencadeia a doença renal. O resultado deste projeto certamente estimulará a realização de novas pesquisas sobre a glomerulopatia esquistossomótica, tanto em humanos como em modelos experimentais.

#### 4 DESENHO EXPERIMENTAL



**Obs:**

(10) – Números que indicam quantidade de animais

\* Em cada ponto de eutanásia indicado foram realizadas todas as técnicas descritas no primeiro quadro de eutanásia. A perda de seguimento foi de 20 animais, correspondendo a mortalidade espontânea provocada pela infecção.

## 5 METODOLOGIA

Neste trabalho se propõe analisar as alterações renais em camundongos infectados e reinfectados pelo *S. mansoni*, e a repercussão com o tratamento específico utilizando Praziquantel. Para tanto, a metodologia adotada consiste em um conjunto de técnicas que buscam correlacionar dados de carga parasitária, mudanças estruturais e presença de depósitos de complexos imunes no rim destes animais. O objetivo principal da realização dos métodos, descritos a seguir, foi observar se ocorre regressão ou reestruturação renal e se os complexos imunes causadores da doença continuam presentes ou são removidos da região glomerular do córtex renal com o tratamento, na fase inicial da glomerulopatia em modelo experimental.

### 5.1 ANIMAIS

Foram utilizados 80 camundongos Balb/c (Mammalia, Rodentia, Muridae, *Mus musculus*), de ambos os sexos em igual quantidade, pesando 18 - 25g, de 7 a 9 semanas de idade, para o modelo de esquistossomose murina por infecção e reinfeções sequenciais pelo *S. mansoni*, induzindo hepatoesplenomegalia e consequentemente “glomerulite”.

Os animais foram obtidos e mantidos no Biotério de experimentação do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz (CPqGM-FIOCRUZ/BA), sob dieta padrão e água, e tratados de acordo com as normas estabelecidas pela Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA, L-016-09.

### 5.2 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Os procedimentos experimentais foram analisados e aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA, CPqGM-FIOCRUZ), mediante certificado protocolado, licença nº L-016-09, com validade até janeiro de 2013.

### 5.3 ORGANIZAÇÃO DOS GRUPOS E IDENTIFICAÇÃO

Os 80 camundongos obtidos foram separados em três grupos, sendo dois experimentais (grupos II e III) e um controle intacto (sem sofrer tratamento e infecção). Indicados segundo o esquema seguinte:

Grupo I – controle não infectado e não tratado (10 animais).

Grupo II – animais reinfectedados e tratados (35 animais).

Grupo III – animais reinfectedados e não tratados (35 animais).

Além disso, os animais foram marcados utilizando solução de BOUIN (corante marcador feito com ácido pícrico, ácido acético glacial, álcool e formol) e lhes foi atribuída numeração segundo o local do corpo marcado. Isso foi necessário para a identificação de todos os animais durante os exames de fezes, para o tratamento, assim como para a discriminação dos materiais de necrópsias e outras formas de separação dos grupos. Os Grupos foram separados em diferentes caixas (gaiolas), permanecendo assim até o final do experimento.

#### 5.4 EPIDEMIOLOGIA E MORTALIDADE

O delineamento amostral corresponde a um estudo experimental, principalmente qualitativo, descritivo e de intervenção com a utilização da quimioterapia específica (Praziquantel). O tamanho amostral foi calculado com base no número máximo em análise a mortalidade, grupos a serem avaliados e percentual de formas graves desenvolvidas em camundongos reinfectedados (SANTOS *et. al.*, 2000; WYNN *et. al.*, 1998; COUTO *et. al.*, 2007), estipulado no projeto enviado a CEUA e autorizado<sup>2</sup>, já que não se conhece a população, por se tratar de um estudo experimental utilizando camundongos como modelos experimentais.

A base de cálculo amostral foi estritamente estatístico, não levando em conta os percentuais de proporção de glomerulonefrite em percentuais de casos de ocorrência da forma hepatoesplênica em animais. Mas, o número amostral utilizado e obtido no cálculo foi equivalente ao encontrado em outros trabalhos com modelo murino estudando a ocorrência da fase crônica da esquistossomose mansoni (SANTOS *et. al.*, 2000).

O objetivo do cálculo amostral e do cálculo da correção do tamanho amostral foi delimitar quantidades mínima e máxima de animais que poderiam ser utilizados no experimento, evitando assim o pedido de uma quantidade exagerada sem necessidade, como também de uma quantidade insuficiente para obter os resultados propostos pelo trabalho.

---

<sup>2</sup> 100 camundongos/ano, segundo autorização do CEUA.

Com um intervalo de confiança estabelecido em 95% (significância de 5%) para os cálculos, foi obtido um tamanho amostral máximo, ideal para o experimento, com a utilização de 82 camundongos. No cálculo de correção do tamanho amostral foi obtido um número mínimo de 45 animais. Optou-se pela utilização de 80 animais em todo o experimento, distribuídos nos três grupos, quantidade essa que se encontra dentro do intervalo amostral calculado e mais próxima ao número máximo, tendo em vista a perda de seguimento que ocorre com a mortalidade de animais infectados com esquistossomose.

A mortalidade dos camundongos infectados foi acompanhada diariamente e notificada em quantidade, por sexo e data. A perda de seguimento foi analisada no experimento como um todo, durante os 8 meses de sua duração, e o percentual obtido foi comparado a dados de mortalidade espontânea estabelecidos em outros trabalhos, como o esperado para animais infectados<sup>3</sup>. Outros aspectos concernentes a essa questão são abordados quando da discussão dos resultados, na seção 7 deste trabalho.

## 5.5 ANESTESIA E EUTANÁSIA

As necrópsias foram realizadas após a eutanásia dos animais, em períodos determinados de tempo de infecção e tratamento, para acompanhar o desenvolvimento da doença e o efeito da quimioterapia.

Inicialmente, os camundongos foram anestesiados por injeção intraperitoneal, de uma solução anestésica contendo Cloridrato de Cetamina, Cloridrato de Xilazina e água destilada, em uma proporção de 1:3:6, respectivamente. A eutanásia foi realizada com a secção da aorta abdominal, nos animais previamente anestesiados, conforme os procedimentos indicados nas normas da CEUA, L-016-09.

## 5.6 INFECCÃO DOS CAMUNDONGOS

Os camundongos que fazem parte dos grupos experimentais II e III foram submetidos, cada um, à infecção inicial, por via transcutânea (SOUZA *et. al.*, 1992), com 50 cercárias recém eliminadas de caramujos da espécie *Biomphalaria glabrata*, cepa de Feira de Santana.

---

<sup>3</sup> Estudos sobre a esquistossomose experimental apontam uma perda de seguimento de até 30% (WYNN *et. al.*, 1998; COUTO *et. al.*, 2007).

Roedores parasitados serviram de fonte para fornecimento de miracídios no procedimento de infecção dos caramujos. O grupo I não sofreu nenhuma infecção (controle intacto).

Os grupos II e III foram submetidos, após o prazo de quinze dias, a reinfecções com 15 cercárias de *S. mansoni*, e o intervalo de uma reinfecção para outra foi também de 15 dias, perfazendo um total de 5 reinfecções (SANTOS *et al.*, 2000). Dois meses após a primeira infecção, todos os camundongos foram submetidos ao exame de fezes (baseado no método Kato-Katz, KATZ *et al.*, 1972), que permite diagnosticar a ocorrência de infecção (GRYSEELS *et al.*, 2006; NEVES *et al.*, 2010; COUTO, 2005). As fezes foram solubilizadas com salina a 0,85% e maceradas em lâminas. Esta solução foi, então, prensada com lamínula e observada em microscópio óptico à procura de ovos.

Durante todo o período do experimento, e principalmente durante os primeiros quatro meses de infecção, foi acompanhada a mortalidade por sexo nos animais experimentais. Quatro meses após a primeira infecção foi realizada a eutanásia de 10 animais experimentais, para examinar o envolvimento renal, e o grupo II foi submetido ao tratamento com Praziquantel através de entubação intragástrica (gavagem), enquanto que o grupo III recebeu salina a 0,85%, passando pelos mesmos métodos de entubação intragástrica (DEJANI *et al.*, 2010).

## 5.7 NECRÓPSIAS

A cada período de eutanásia e necrópsia, que foram no quarto, sexto e oitavo mês após os camundongos experimentais sofrerem a primeira infecção, os rins foram retirados e divididos em fragmentos para diferentes finalidades. Um deles foi direcionado para a imunofluorescência em blocos criopreservados; alguns fixados em formol Millionig (pH 7,4) para histopatologia; e outro fragmento foi recortado em pequenas secções para fixação em cacodilato e glutaraldeído, para realização da microscopia eletrônica de transmissão.

Em seguida, o fígado foi retirado para observação das dimensões, foi pesado em balança analítica e seccionado, direcionando a secção parcial do lobo esquerdo para o processo de digestão hepática com KOH a 4% e contagem de ovos na quantificação da carga parasitária, e o intestino foi removido para observação sob lâmpada comum de helmintos adultos nas veias mesentéricas.

## 5.8 TRATAMENTO

O grupo II recebeu tratamento específico contra a esquistossomose, quatro meses após a primeira infecção, o qual correspondeu a uma dose de 400 mg por massa corpórea (400 mg/kg), do Praziquantel, administrada por via oral, entubação intragástrica (OLIVEIRA, 2005). Todos os animais do grupo II foram pesados a fim de obter a média dos pesos e calcular a dose correta para cada camundongo, seguindo a proporção indicada acima.

Assim, com uma média de peso de 30 g, cada camundongo recebeu 12 mg de Praziquantel, cujos comprimidos foram macerados e solubilizados em água destilada, anteriormente, para serem injetados 0,5 mL desta solução por entubação intragástrica. Cada animal do grupo III recebeu 0,5 mL de salina a 0,85%, passando pelos mesmos métodos de entubação intragástrica.

Nesse período, foram submetidos à eutanásia 10 animais dos grupos experimentais, só infectados e não tratados. Após a eutanásia, foram retirados fragmentos do córtex renal para realização de microscopia eletrônica de transmissão. Outros fragmentos renais foram colocados, parte em formol Millonig (pH 7,4) para histopatologia, e outra parte em Tissue-Tek, congelados em nitrogênio líquido para a realização da Imunofluorescência.

Os grupos experimentais tratados e reinfectados foram acompanhados dois meses depois, com 2 meses após o tratamento e 6 meses de infecção através da eutanásia de 5 animais de cada grupo, para examinar o desenvolvimento da glomerulonefrite nos camundongos apenas infectados e os efeitos do tratamento naqueles que receberam a quimioterapia. Novamente, com 8 meses de infecção e 4 meses após o tratamento, todos os animais restantes dos grupos experimentais e de controle foram submetidos à eutanásia, finalizando o experimento.

Todos os animais foram avaliados qualitativamente quanto a análise da estrutura do córtex renal com as três colorações histopatológicas (HE, PAS e PIFG), como também foi realizado em todos a observação dos vermes nas veias mesentéricas, a comparação do peso do fígado e a quantificação da carga parasitária. Mas, as técnicas de imunofluorescência (IF) para IgG e antígenos do *S. mansoni*, microscopia eletrônica e morfometria de área de depósito foram realizadas em aproximadamente 60% do número de animais de cada grupo eutanasiados em cada período de tempo de infecção.

Esse acompanhamento foi de fundamental importância para observar a evolução da glomerulopatia esquistossomótica em modelo murino, assim como examinar os efeitos do tratamento, comparando os aspectos histológicos apresentados por ambos os grupos. A IF e a

ME permitem a localização precisa dos depósitos de antígenos nas estruturas glomerulares na esquistossomose (NUSSENZVEIG, 2002).

## 5.9 PRESENÇA DE VERMES ADULTOS E AVALIAÇÃO DA CARGA PARASITÁRIA

A cada eutanásia, para que fossem acompanhados a evolução da esquistossomose e os efeitos da quimioterapia, os intestinos foram removidos e mantidos em solução salina a 0,85%. Então, sob lâmpada comum, cada intestino de cada camundongo foi observado, e as veias mesentéricas cuidadosamente examinadas, onde foram encontrados e retirados os vermes adultos, confirmando a infecção.

A carga parasitária total e parcial do fígado dos camundongos foi quantificada pelo método de Cheever (1970) que inclui a digestão tissular hepática com hidróxido de potássio (KOH). Inicialmente, o peso líquido do fígado inteiro (a fresco) foi aferido em balança comum. Logo em seguida, foi retirado um fragmento e pesado para obtenção do peso parcial. Esses fragmentos de fígado de cada camundongo foram adicionados a um tubo de ensaio identificado individualmente, contendo 40 ml de hidróxido de potássio a 4%, iniciando um processo de digestão tissular.

As amostras foram mantidas a 4°C, o que reduz a velocidade de digestão, permitindo que todas as amostras fossem quantificadas a seu tempo, sem perdas de material. As amostras a serem quantificadas imediatamente, foram colocadas em estufa a 37°C durante um período de 3 horas para acelerar e concluir a digestão tissular, permitindo a contagem dos ovos em lâminas escavadas.

Depois da digestão, foram obtidas soluções nas quais foram retiradas, separadamente, 5 réplicas de 1 ml cada (1.000 µL), da solução de digestão hepática de cada camundongo, e contados os ovos encontrados em lâmina escavada sob microscópio óptico. Desta forma, calculou-se a média de ovos em todas as réplicas.

Por cálculos de proporção utilizando o peso total e parcial do fragmento de tecido hepático e a quantidade de solução de digestão, foi possível calcular a quantidade de ovos por grama de tecido hepático, assim como a carga parasitária total do fígado. Com a quantidade de ovos presentes nas amostras de 1 ml de cada solução, foi extrapolada para a quantidade total de solução (40 ml), para obter o número de ovos no fígado.

A infecção leva a um aumento anormal do fígado (hepatomegalia) provocado pelos ovos do parasita que impactam e obstruem parcialmente os vasos sanguíneos portais, além da formação dos granulomas, da fibrose, e consequentes processos de neoformação vascular que

alteram efetivamente o peso do órgão. Nesse contexto, peso do fígado e carga parasitária são as variáveis em análise, cuja descrição estatística é fundamental para realizar as avaliações e inferências.

## 5.10 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA

Fragments de rim foram inicialmente fixados em formol Millonig (pH 7.4), em concentração de 10%, durante um período de 24 horas, e depois mantidos sob a fixação de álcool a 70%. Após serem processados e hidratados, foram incluídos em parafina e cortados em micrótomo (RODRIGUES *et. al.*, 2010).

Secções de aproximadamente 3 micrômetros de espessura foram corados com: i) hematoxilina e eosina, para observação da perspectiva geral do córtex renal (COUTO *et. al.*, 2007); ii) PIFG (Picrosírius), corando as regiões de colágeno em vermelho, com fundo verde fluorescente, pela coloração dos outros componentes celulares, para análise histopatológica; e iii) PAS (ácido periódico-Schiff) que cora em vermelho as membranas basais por possuírem glicoproteínas, permitindo a identificação de alterações nessas membranas e a borda em escova das células dos túbulos contornados proximais (DI FIORE, 2001). O PAS é usado principalmente para colorir estruturas contendo uma alta proporção de macromoléculas de carboidratos (glicogênio, glicoproteína, proteoglicanos), tipicamente encontrado em engenharia de tecidos conjuntivos, mucos, e lâminas basais.

As diferenças consideradas como alterações da glomerulopatia esquistossomótica, muitas vezes, são baseadas em parâmetros, como por exemplo na coloração de PIFG em que foi avaliado pela presença histológica detectada de fibrose. Apesar de fornecer mais confiabilidade sobre as descrições na análise qualitativa dos glomérulos no tecido renal de camundongos, os parâmetros para detectar, por exemplo, a proliferação de células mesangiais glomerulares, que podem corresponder a um número a partir de 4 células a mais do que o normal, não teria muita funcionalidade. Isso porque essas alterações não ocorrem em todos os glomérulos de camundongos infectados que apresentaram esse processo inflamatório, e nem todos os camundongos que possuíam alterações inflamatórias em microscopia eletrônica apresentaram alteração glomerular visualizada em microscopia óptica.

Poucas alterações renais em camundongos são observadas em microscopia óptica, e uma análise quantitativa sobre um dado sutil e pouco observável pode gerar comparações equivocadas quando se impõe parâmetros de análise. Essas análises em nível de imunofluorescência e microscopia eletrônica de transmissão são mais confiáveis, observando

que as alterações são mais visíveis e observadas em uma maior quantidade de animais. Já na microscopia óptica alterações podem passar despercebidas, em que a análise da técnica pode ser restrita pela quantidade de camundongos possíveis de serem analisados, pelo tempo de desenvolvimento e trabalho requeridos.

### 5.11 IMUNOFLUORESCÊNCIA

O método possui alta sensibilidade, especificidade e consiste em conjugados de anticorpos ligados a moléculas reveladoras, fluorocromos, que absorvem luz ultravioleta e emitem luz visível, ou seja, ficam fluorescentes. O Isotiocianato de Fluoresceína (FITC) foi o fluorocromo utilizado neste trabalho e foi considerada positiva toda área marcada com cor verde brilhante.

Fragmentos de tecido renal, retirados durante necrópsia dos camundongos, foram imediatamente criopreservados, ao serem adicionados a moldes feitos de alumínio contendo um meio de inclusão (Tissue-Tek, gel) e congelados em nitrogênio líquido. As amostras congeladas foram estocadas em um freezer a -80 °C, e secções de aproximadamente 3 micra foram realizadas nesse material em um criostato a -28 °C. Alguns cortes foram corados com a solução de azul de toluidina e azul de metileno em uma proporção de 1:1, apenas para pré-visualizar a presença da área específica correta a ser adicionado o marcador. As secções seguintes não eram coradas e após cortadas foram fixadas em acetona (100%) gelada, durante 5 minutos, e acondicionadas em cubetas, vedadas com papel alumínio na parte superior e mantidas no freezer a -20°C.

As técnicas de imunofluorescência direta e indireta foram realizadas na metade dos animais experimentais, o que equivale a 25 camundongos dentre os grupos de tratados e apenas reinfetados, e em 3 camundongos controles. As secções foram submetidas à técnica de imunofluorescência indireta para demonstração de antígenos do *S. mansoni*, utilizando um *mix* dos soros de 4 pacientes com infecção crônica<sup>4</sup>, e imunofluorescência direta para demonstração de IgG.

Na marcação dos anticorpos IgG, no tecido renal, foram utilizadas anti-mouse IgG conjugadas com Isotiocianato de Fluoresceína (FITC) da SIGMA, marcador fluorescente mais utilizado (GOLIM *et. al.* 2007, FRANCO *et. al.*, 2010). Como os antígenos são

---

<sup>4</sup> Cedido pelo setor de imunologia do Hospital Universitário Professor Edgar Santos, cujo soro já foi devidamente analisado em relação a ocorrência de coinfeção nos pacientes e outros requisitos para utilização neste teste, durante a execução de outros trabalhos pela equipe do hospital.

polissacarídeos de alto peso molecular, descritos por Nash em 1974, não conseguem ultrapassar a barreira de filtração formada pelas 3 camadas da membrana basal glomerular e ficam depositadas na membrana e no mesângio, dificultando a função renal e liberando substâncias mediadoras de processo inflamatório desencadeando a glomerulopatia. São assim identificados e localizados por marcação de fluorescência nos glomérulos lesionados.

No processo de imunofluorescência indireta, o marcador Isotiocianato de Fluoresceína (FITC) conjugado com anti-humano IgG se liga à imunoglobulina IgG, que está ligada ao antígeno específico, no caso o antígeno de Nash, marcando este antígeno no tecido renal, e a fluorescência é então observada sob microscópio de imunofluorescência. Esse antígeno, conhecido inicialmente como *circulating schistosomal antigen* (CSA), antígeno de Nash (Nash, 1974) ou ainda antígeno polissacarídeo, indicado por marcação de fluorescência, demonstra exatamente onde se localizam os depósitos de complexos imunes no rim, provocados pela infecção esquistossomótica.

## 5.12 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (MET)

A análise com microscopia eletrônica foi realizada em metade dos animais experimentais, correspondendo a 25 camundongos distribuídos entre os grupos de apenas reinfectados e de tratados, sendo que mais 3 animais controles intactos (normais) foram utilizados para comparação. Pequenos fragmentos do córtex renal foram retirados na necrópsia e seccionados em fragmentos menores ainda para permitir uma melhor absorção do fixador, sendo imediatamente fixados, através da imersão em uma solução de glutaraldeído a 4% e tampão cacodilato a 0,2M (1:1), pH 7,4, por 1h a 4°C. Depois, foram realizados três banhos com cacodilato a 0,2M e, após o último banho os fragmentos foram mantidos nesta solução a 4°C até que fosse possível dar continuidade ao processamento (RODRIGUES *et al.*, 2010).

Os fragmentos foram, então, pós-fixados em tetróxido de ósmio a 1% e tampão cacodilato a 0,3M (1:1) por 1h a 4°C, sem luminosidade no ambiente. Os fragmentos foram lavados, rapidamente, em tampão cacodilato a 0,3M e, em seguida, desidratados em um gradiente de acetona de 30%, 50%, 70%, 95% e 3 vezes de 100%.

Logo em seguida foi realizado o processo de substituição, onde os fragmentos foram embebidos em uma solução de resina Polybed 812 e acetona a 100% na proporção de 1:1. O material foi impregnado em resina pura durante 12 horas, incluídos em moldes com a resina e colocados em estufa a 60°C para polimerização durante 3 dias.

Os blocos obtidos após polimerização da resina foram seccionados, após desbaste e formação de um trapézio na parte superior de cada bloco (facilitando os cortes e permitindo que a região correta onde se encontra o tecido no bloco seja cortada). Sendo realizados cortes semifinos, com espessura de 1 micrômetro, corados com uma solução de azul de toluidina e azul de metileno em uma proporção de 1:1, para pré-visualização do material e seleção da área específica, que apresentava glomérulos, a serem realizados os cortes ultrafinos. Posteriormente, os cortes ultrafinos de 70 nanômetros de espessura foram coletados, montados em grades de cobre, contrastados com citrato de chumbo e acetato de uranila e examinados em um microscópio Zeiss EM-9.

A microscopia eletrônica de transmissão demonstra em eletromicrografia ultraestrutural as alterações decorrentes do processo inflamatório que caracteriza a glomerulopatia esquistossomótica e detecta a localização dos depósitos de complexos imunes no glomérulo. Os complexos imunes que desencadeiam o processo inflamatório, consistindo inicialmente na proliferação celular, principalmente das células mesangiais que são estimuladas a proliferar para otimizar a função de englobar os complexos liberando a área da membrana basal onde são retidos, por possuírem alto peso molecular, no processo de filtração do sangue. Então, juntamente aos antígenos, as imunoglobulinas do complexo seguem esse mesmo caminho e são posteriormente encontrados no parênquima mesangial.

### 5.13 MORFOMETRIA

A morfometria foi aplicada às imagens de microscopia eletrônica de transmissão, para mensurar a área em que se encontram os depósitos de complexos imunes no glomérulo renal. Foram levados em consideração os depósitos na membrana basal e no parênquima mesangial, separadamente. Gráficos de comparação entre as áreas de depósitos nos diferentes pontos de tempo de infecção, acompanhando o avanço da doença renal esquistossomótica, foram projetados de acordo com o local de depósito no glomérulo. A observação do tempo de infecção foi importante para verificar se propicia o encontro de depósitos mais frequentemente na membrana basal ou na região mesangial glomerular e comparar o tamanho da área de deposição. A morfometria foi realizada examinando 10 campos microscópicos de glomérulos, por animal, de 3 camundongos de cada grupo em cada período de análise, através do sistema de processamento e análise de imagem ITEM, programa do microscópio eletrônico de transmissão (MET) Zeiss EM109, e para obtenção das imagens também foi utilizado o MET JEOL 1230 que é dotado de sistema de microanálise EDS. Foi mensurada a área de

depósito dos complexos imunes nos glomérulos, que era fornecida, automaticamente, ao circundar marcando a área do complexo imune. No final as áreas dos campos foram somadas e separadas por grupo em cada período de análise.

#### 5.14 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A estatística foi aplicada às variáveis de peso do fígado, carga parasitária e morfometria de área, apresentadas e avaliadas pela estatística descritiva, e testadas quanto a normalidade dos dados utilizando o teste de Shapiro-Wilk. A morfometria foi utilizada como medida do campo onde os complexos imunes estavam depositados no córtex renal, com as imagens obtidas da microscopia eletrônica de transmissão. Os resultados do teste de normalidade direcionaram para utilização de testes não paramétricos, porque os dados não seguiam uma distribuição normal, e esses testes foram aplicados na análise para comprovar a confiabilidade estatística dos dados, assim como calcular se as diferenças provocadas pelo tratamento específico da esquistossomose foram significantes. Os testes consistiram nas análises das medianas com Mann-Whitney e nas análises das variações em torno das médias com o Kruskal-Wallis, aplicado ao teste de Dunn. Para estes testes, foi estabelecido um nível de confiança de 95%, permitindo erro de 5%, nível de significância. Os programas que ajudaram a desenvolver e projetar toda a análise estatística foi o BioEstat 5.0, o GraphPad Prism 6 e o Excel 2013.

## 6 RESULTADOS

No início do experimento, os grupos de camundongos totalizavam 80 animais. Durante o desenvolvimento, ocorreram diversas perdas de seguimento que correspondiam à resposta do organismo de cada camundongo em relação à infecção e reinfecção, necessária para induzir a fase crônica da esquistossomose. Após 4 meses de infecção, 16 animais haviam morrido e 64 restaram, os quais estavam distribuídos nos grupos: controle com 10 animais; Grupo II (tratamento) com 28; e Grupo III (apenas reinfectados) com 26. No final de 8 meses de experimento restaram 60 animais que não sofreram mortalidade espontânea, e que foram submetidos à eutanásia para obter os pontos de análise do desenvolvimento da doença e da possível regressão com o tratamento.

### 6.1 MORTALIDADE ESPONTÂNEA

A perda de seguimento em todo o experimento foi de 20 animais, e diz respeito à mortalidade espontânea do camundongo em virtude da sensibilidade que apresenta frente à infecção. Muitos autores que trabalharam com experimentos similares utilizaram essa mesma nomenclatura, cujos resultados serão discutidos na sessão 7 deste trabalho.

Considera-se mortalidade espontânea aquela que ocorre por simples diferença de resistência à infecção na esquistossomose, durante o período experimental. O presente trabalho apresentou uma mortalidade de 25%, considerando os animais de todos os grupos que os compõem. Levando-se em conta apenas os grupos experimentais, que foram infectados e reinfectados, a mortalidade espontânea foi de 28,6%. No grupo controle intacto (normal) não ocorreu mortalidade. Entre os grupos de reinfectados (grupo III) e reinfectados/tratamento (grupo II) a mortalidade apresentou índices não comparativos.

Como a mortalidade foi maior no terceiro e principalmente no quarto mês de infecção, e o tratamento ocorreu exatamente no quarto mês, momento no qual os grupos estavam homogêneos, não foi possível comparar o percentual de mortalidade espontânea entre os dois grupos de tratados e não tratados. Mas, a mortalidade que ainda ocorreu no quinto mês, mesmo que pequena, afetou apenas os camundongos infectados que não foram submetidos ao tratamento. Os seguintes gráficos de sobrevivência e mortalidade, figura 3, demonstram essas perdas de seguimento ao longo do período experimental:

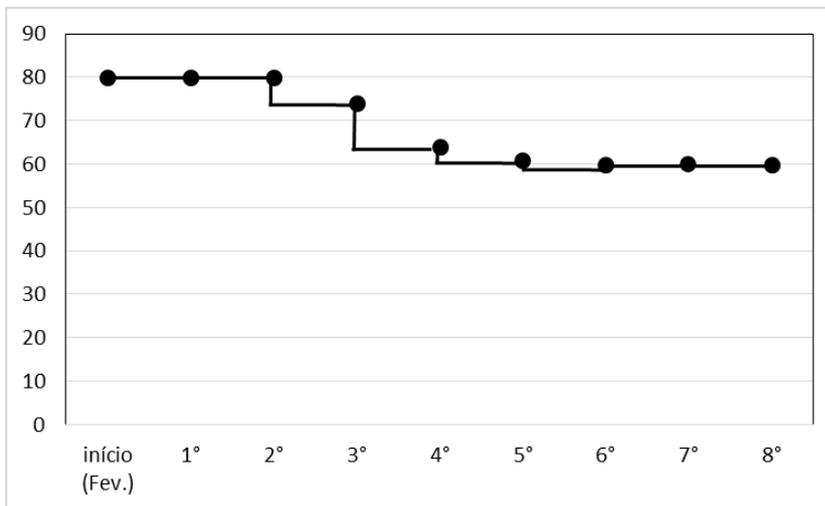
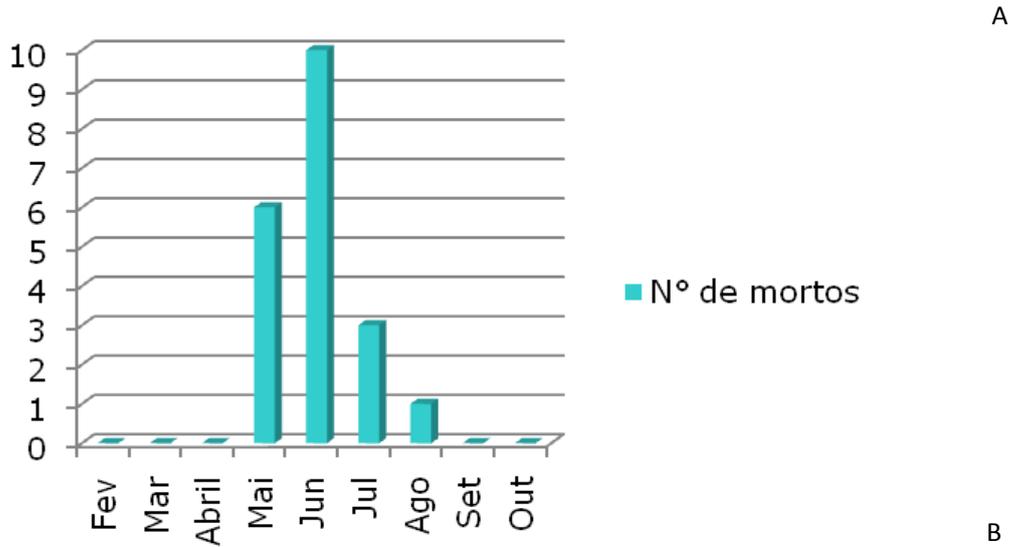


Figura 3. **Sobrevivência e mortalidade espontânea dos camundongos durante os 8 meses de experimento (valores absolutos).** Em “A” se observa uma maior mortalidade espontânea em junho, quando os animais completam 4 meses de infecção. Em “B”, o gráfico de sobrevivência indica uma queda no número de camundongos do terceiro ao sexto mês de infecção.

A mortalidade espontânea também foi acompanhada segundo o sexo do animal. O número de fêmeas e de machos recebidos para o experimento foi igual, sendo distribuídos aleatoriamente nos grupos experimentais. A mortalidade absoluta foi maior entre os machos, cujo resultado está apresentado no gráfico abaixo (figura 4):

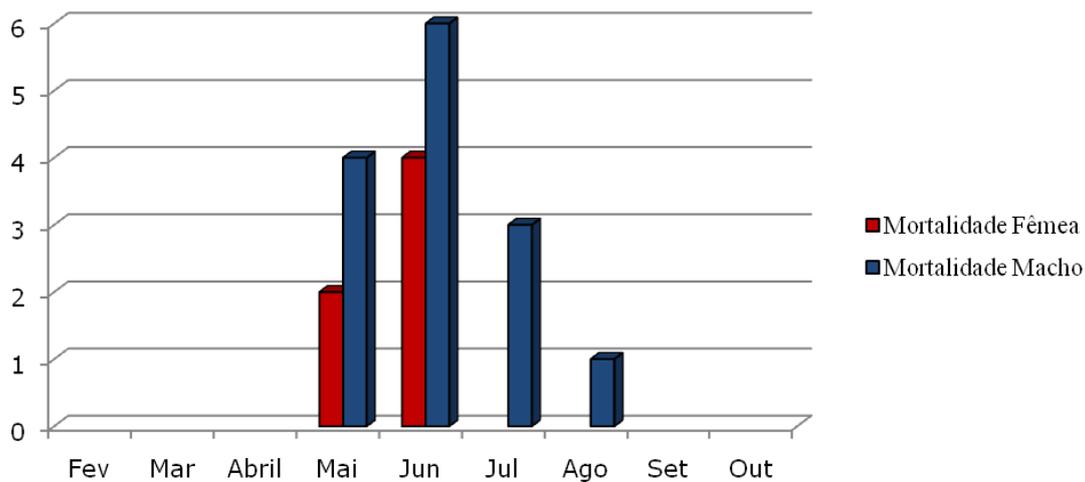


Figura 4. **Mortalidade espontânea segundo o sexo dos camundongos durante os 8 meses de experimento (valores absolutos).** A mortalidade foi maior entre os machos, em todo o período experimental, sendo exclusiva deles durante o quinto e sexto mês de infecção.

Em termos percentuais, 70% da mortalidade espontânea foi de machos e 30% de fêmeas, sendo o número absoluto de mortalidade espontânea 20 animais de ambos os sexos, descrita anteriormente como 28,6% em todo o experimento.

## 6.2 ESTUDO PARASITOLÓGICO

A análise comparativa das vísceras dos camundongos infectados e reinfetados dos grupos experimentais II e III com os do grupo controle intacto ocorreu nos pontos de 6 e 8 meses após a primeira infecção, o que equivale ao segundo e quarto mês de tratamento para o grupo II, respectivamente.

**Exame de fezes** - O exame foi realizado em todos os camundongos experimentais após 2 meses de infecção e foi obtido 100% de positividade entre os animais analisados.

**Dados macroscópicos** - A observação macroscópica, durante a eutanásia, revelou um quadro de hipertrofia atingindo fígado e baço, característico da fase crônica da doença. Esse aumento do fígado e do baço foi observado em todos os camundongos infectados e que não foram submetidos ao tratamento. Animais tratados apresentaram tamanho normal desses órgãos e o fígado com regiões que se assemelhavam a um processo de cicatrização. A macroscopia do rim apresentou-se normal em alguns animais e em outros foi observado uma palidez do órgão notadamente nos animais infectados que não receberam tratamento, apesar de não ter sido observado em todos os camundongos desse grupo.

**Vermes nas veias mesentéricas** – Foi observada a presença de vermes nas veias mesentéricas dos camundongos infectados e tratados, e o resultado está descrito segundo tabela 1 a seguir, para atestar infecção e eficácia do tratamento, mas estes vermes não foram quantificados. A positividade da parasitemia mesentérica pela presença do *S. mansoni* nos grupos de camundongos experimentais foi demonstrada em percentual de cura para avaliar a repercussão do tratamento ao longo do tempo, segundo a tabela 2. Baseado neste tipo de análise, o percentual de cura total no experimento foi de 96,4%, considerando a presença de vermes adultos nas veias mesentéricas. Dados de carga parasitária foram obtidos através da quantificação de ovos no fígado dos camundongos e são apresentados logo em seguida.

Tabela 1 – Presença de vermes nas veias mesentéricas de camundongos reinfectedos, segundo tempo de infecção e tratamento (positivos e negativos).

Pontos de análise (Meses)	Presença de vermes nos animais reinfectedos não tratados (Grupo III)									
	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10
4 meses	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+
6 meses	+	+	+	+	+					
8 meses	+	+	+	+	+	+				
Pontos de análise (Meses)	Presença de vermes nos animais reinfectedos tratados (Grupo II)									
	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10
4 meses	Período de tratamento, os animais não foram avaliados									
6 meses	-	-	-	-	-					
8 meses	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Obs: o número de eutanásia foi diferenciado de acordo com o ponto de análise baseado no tempo de infecção, portanto há alguns campos sem informação.

Nota: A= animais.

Tabela 2 – Avaliação do tratamento ao longo do curso de tempo da infecção, segundo percentual de cura, baseada em parasitemia positiva ou negativa para vermes nas veias mesentéricas.

Tempo de infecção/tratamento (Meses)	Número de Camundongos		Casos Positivos		Cura (%)
	Grupo III	Grupo II	Grupo III	Grupo II	
4 M	10		10		-
6 M / 2 M de Trat.	5	5	5	0	17,9
8 M / 4 M de Trat.	6	23	6	1	78,5

**Carga parasitária** – A avaliação da carga parasitária em camundongos reinfectedos, nos grupos tratados ou não, ocorreu através da quantificação de ovos do fígado, na qual se obteve a proporção da quantidade de ovos/grama de tecido hepático. Comparações com o peso líquido total do fígado entre os grupos experimentais foram utilizadas juntamente à carga parasitária para reforçar as diferenças entre a intensidade de infecção e o tratamento nos diferentes pontos de análise.

A variável peso do fígado apresentou entre os camundongos infectados, independentemente do tempo de infecção, média de 2,0952 gramas, com um desvio de 0,539 (variância de 0,29). Entre os camundongos tratados a média de peso do fígado, independentemente do tempo de tratamento, foi de 1,2857 gramas, valor bem menor em relação aos infectados, e desvio de 0,46 (variância de 0,2116). A assimetria dos dados de peso entre os camundongos tratados (1,0032) foi maior do que entre os infectados (0,1137). Para verificar a normalidade da variável peso, tanto no grupo experimental de infectados quanto no de tratados, foi utilizado o teste estatístico Shapiro-Wilk, que pode analisar variáveis em vários grupos simultaneamente. Foi encontrado um p valor igual a 0,0082 que é menor do que o nível de significância pré-estabelecido de 0,05 ou 5%. Assim, os dados dessa variável não seguem uma distribuição normal, sendo requeridos testes não paramétricos para analisá-los.

Baseado na avaliação das médias e nos desvios de amplitude dos valores pode ser observada no gráfico a seguir a variação dos pesos do fígado entre os camundongos infectados e aqueles que foram submetidos ao tratamento (figura 5). Para esta análise foi utilizado o teste estatístico Kruskal-Wallis na avaliação da variável quantitativa peso do fígado. Portanto, o teste foi direcionado partindo da hipótese nula de que:  $H_0$ : não há diferença entre as médias de peso do fígado de camundongos infectados e tratados. O teste apresentou

um resultado significativo de  $p < 0,05$ , constatando a influência do tratamento sobre o peso do fígado de animais reinfectedos, ou seja, animais com infecção esquistossomótica que tenha provocado hepatomegalia, quando tratados contra a parasitose, têm o peso do fígado diminuído, devido a um processo de reconstituição (figura 5).

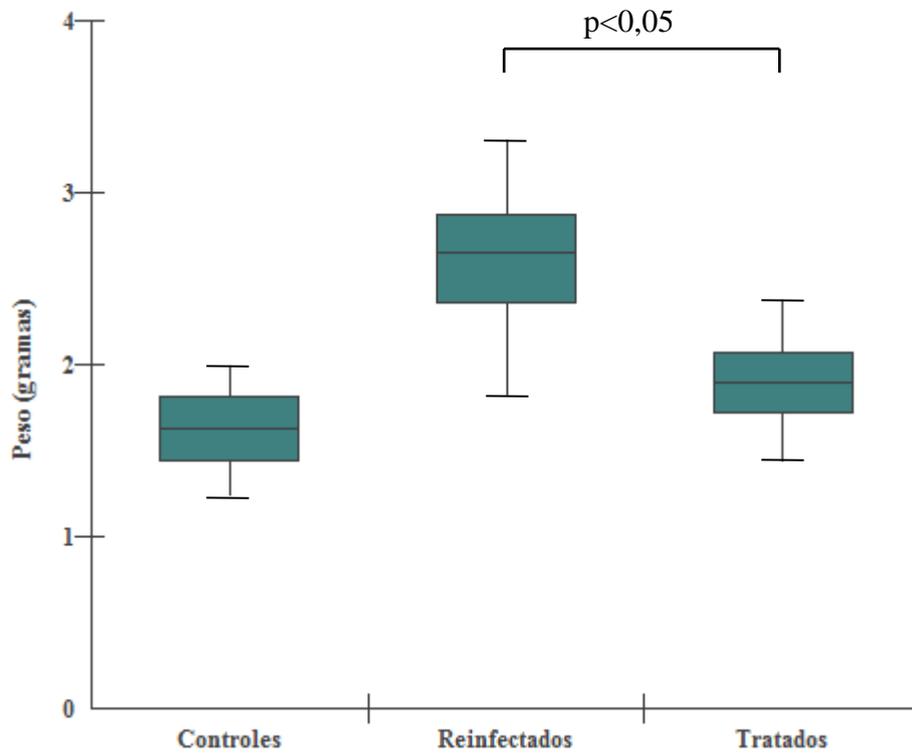


Figura 5 – **Peso líquido (em gramas) dos fígados dos grupos tratados, não tratados e controle, durante 8 meses de experimento.** O Box plot apresenta a média e os desvios da variável peso do fígado nos dois grupos experimentais e no controle, acompanhado ao longo de todo o experimento, nos pontos de análise de 4, 6 e 8 meses de infecção, juntamente com 2 e 4 meses de tratamento, já que este grupo foi tratado após 4 meses de infecção. O gráfico indica os valores centrais, aproximadamente, e apresenta o teste de Kruskal-Wallis de comparação, cujas médias de peso dos fígados foram testadas quanto a variação, segundo o teste de Dunn, sendo observado um valor de  $p < 0,05$  significativo.

A carga parasitária é uma variável quantitativa que foi avaliada nos três pontos de análise para encontrar a intensidade da infecção ao longo do tempo e a repercussão do tratamento. Por isso, é uma variável mais ampla e sua estatística descritiva está apresentada na tabela 3. A média da quantidade de ovos por grama de tecido hepático foi progressivamente maior entre os camundongos reinfectedos com o decorrer do tempo de infecção, e os animais

do grupo de tratamento apresentaram grande redução dessa quantidade de ovos em relação ao grupo de reinfectedos e não tratados. Os grandes valores apresentados no desvio padrão e coeficiente de variação foram decorrentes de grandes diferenças dos valores de carga parasitária entre os animais do mesmo grupo no mesmo período de infecção ou tratamento. Isso ocorre porque depende da sensibilidade orgânica de cada animal à infecção esquistossomótica, ou pela variação da eficiência na infecção transcutânea que é bastante suscetível a provocar essas grandes diferenças.

Tabela 3 – Estatística descritiva da variável carga parasitária segundo tempo de infecção e grupo experimental dos camundongos, analisando média, desvio e coeficiente de variação.

Tempo de infecção/tratamento (Meses)	Média da Carga Parasitária (ovos/gramas)		Desvio Padrão		Coeficiente de variação (%)	
	Grupo III	Grupo II	Grupo III	Grupo II	Grupo III	Grupo II
4 M	35.314		16,06		45,48%	
6 M / 2 M de Trat.	45.377	25.251	16,74	6,85	36,89%	27,15%
8 M / 4 M de Trat.	222.655	15.095	256,39	7,69	115,16%	50,95%

Os dados de carga parasitária apresentaram grande variabilidade, e pela diferença de valores, foi realizado o teste de Mann-Whitney (figura 6, 6 meses de infecção e 2 meses de tratamento), para amostras independentes, que se baseia nas medianas, eliminando as grandes variações dos valores extremos, permitindo identificar a tendência central dos dados. Partindo da hipótese nula de que:  $H_0$ : As cargas parasitárias dos grupos de reinfectedos e tratados não diferem quanto à mediana, o teste apresentou um  $p < 0,05$  significativo. Então, os grupos de infectados e de tratados no ponto de 6 meses de infecção apresentam diferenças significantes em termos de carga parasitária, já que o tratamento provoca uma grande redução nos valores dessa variável. A mediana entre os tratados foi de 25,00 e entre os infectados foi de 47,83. Assim, a carga parasitária dos grupos infectados em relação aos tratados demonstra distribuição independente, já que os resultados se diferenciam por causa da intervenção com o medicamento. Inclusive diferem quanto à mediana, ou seja, não convergem para uma tendência central aproximadamente equivalente.

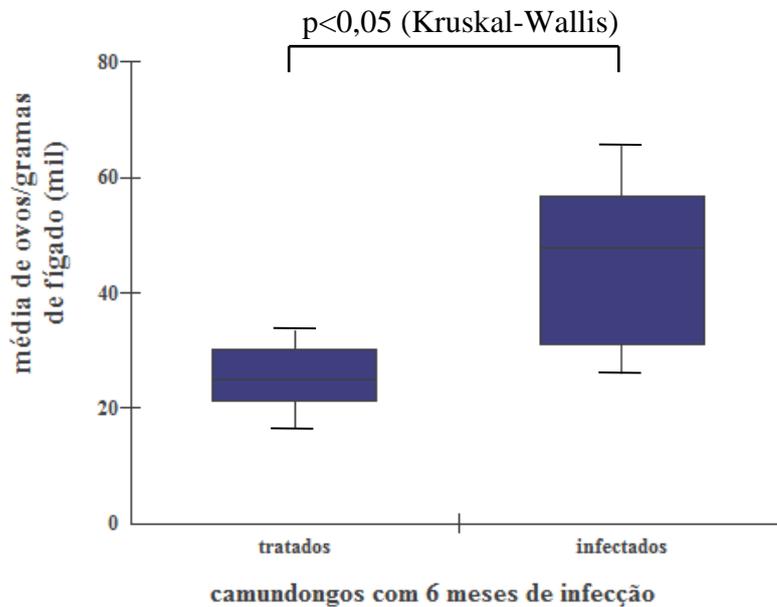


Figura 6 – **Relação das medianas de carga parasitária dos grupos tratados e infectados com 6 meses de infecção e 2 meses de tratamento.** Como resultado do teste de Mann Whitney, um Box plot comparando as medianas de carga parasitária entre os grupos infectados e tratados, que apesar de se aproximarem mais que as médias, a variação entre as medianas foi significativa, com um  $p < 0,05$ . Assim, o tratamento causa redução significativa no valor da carga parasitária na comparação dos grupos segundo este teste de amostras independentes. Através do teste de Dunn, tipo de teste dentro do Kruskal-Wallis, para comparação da variação nas médias de carga parasitária, foi observado um valor de  $p < 0,05$ , significante.

O teste de Mann-Whitney, realizado com os valores de carga parasitária dos animais com 8 meses de infecção, tratados e não tratados (figura 7), partiram da mesma hipótese anterior,  $H_0$ : A carga parasitária entre os grupos de reinfetados e tratados não distanciam quanto à mediana. O teste apresentou um  $p < 0,05$ , ou 5%, significante. Isso quer dizer que a diferença, ou a diminuição nos valores de carga parasitária dos tratados em relação aos camundongos reinfetados foi expressiva, demonstrando que o praziquantel eliminou os vermes, reduzindo efetivamente a carga parasitária. Neste contexto, foi obtida uma mediana entre os tratados de 12,09 e entre os infectados de 172,34, demonstrando elevada variância dos dados.

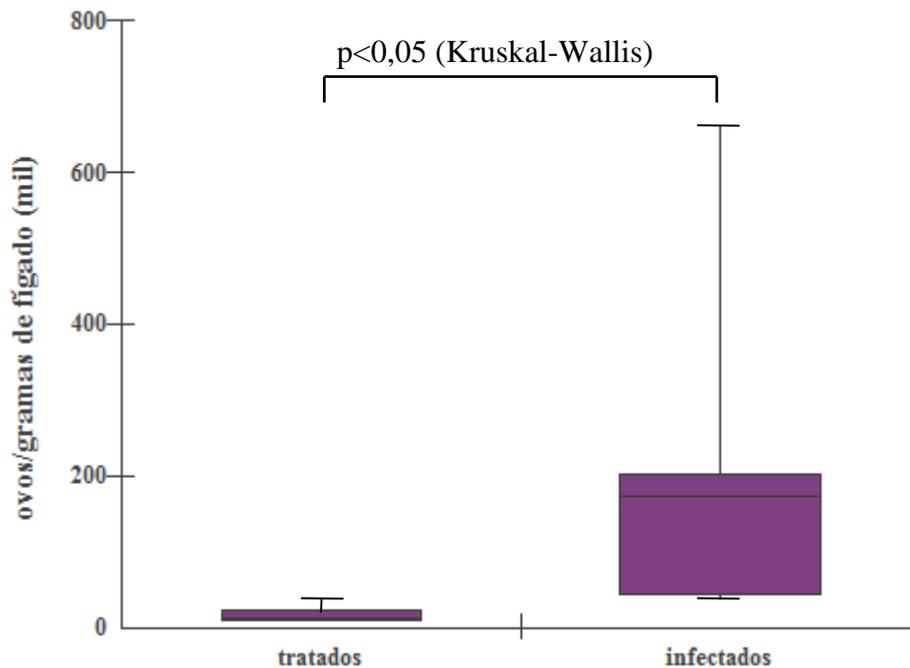


Figura 7 – **Relação das medianas de carga parasitária dos grupos tratados e infectados com 8 meses de infecção e 4 meses de tratamento.** Como resultado do teste de Mann Whitney, um Box plot comparando as medianas de carga parasitária entre os grupos infectados e tratados, com grande variação entre as médias e entre as medianas e significância estatística, cujo valor do p foi  $<0,05$ . O Praziquantel demonstrou provocar uma grande redução nos valores de carga parasitária entre os tratados em comparação aos camundongos infectados, apresentando um grande potencial antiparasitário nos resultados analisados neste teste de amostras independentes. Através do teste de Dunn, tipo de teste dentro do Kruskal-Wallis, para comparação da variação nas médias de carga parasitária foi observado um valor de  $p<0,05$ , significativo.

A relação geral da carga parasitária entre grupos de infectados e tratados, comparando nos três pontos de análises foi realizada através do teste de Kruskal-Wallis, que possibilitou a projeção de uma distribuição em barras de múltipla comparação dessa variável em relação aos grupos e tempo de avaliação. Essa análise das diferenças nas médias encontradas para carga parasitária nos dois grupos por mês de acompanhamento experimental, que ocorreu de dois em dois meses (do 4° ao 8° mês), encontrou na associação entre camundongos tratados por 4 meses e camundongos infectados durante 8 meses as maiores diferenças, ou distâncias dos valores quantitativos de carga parasitária. Isso demonstrou que um animal com infecção mais

prolongada desenvolve uma intensidade maior de carga parasitária e que com um tratamento antiparasitário (praziquantel) por um tempo mais longo ocorre redução maior nessa variável.

### 6.3 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA

A avaliação no estudo histopatológico consistiu em verificar o tecido do córtex renal em três colorações (HE, PAS e PIFG), cada qual com o objetivo de observar as diferenças nas células, nas membranas basais, composição e na estrutura geral dos glomérulos renais provocadas pela infecção esquistossomótica. Essa técnica foi utilizada para acompanhar a progressão das alterações glomerulares que surgem, como consequência do processo inflamatório originado nos rins por causa da deposição de complexos imunes de alto peso molecular que chegam a esse órgão na esquistossomose crônica, e que são contidos durante a filtração realizada na membrana basal glomerular.

#### 6.3.1 Coloração HE

A análise da arquitetura geral do tecido do córtex renal foi feita através de cortes corados com Hematoxilina e Eosina (HE) porque a coloração define bem os limites celulares, coram núcleos e tornam visíveis processos de proliferação celular típicas da fase inicial de reações inflamatórias durante a glomerulopatia esquistossomótica. Mas, na nefropatia esquistossomótica experimental, tem sido observadas, em microscopia óptica, pequenas alterações quando comparadas com aquelas observadas na forma humana, o que ocorreu também neste trabalho, e é compatível com lesões iniciais do processo inflamatório.

4 Meses de infecção (grupo III) – O estudo histológico do córtex renal neste período de infecção e reinfeção com 4 meses, em que os grupos experimentais ainda estavam homogêneos porque nenhum deles havia sido tratado, revelou pequenos processos de proliferação das células mesangiais nos glomérulos, comparado às mesmas estruturas no grupo controle intacto (Figura 8 – B). Assim, demonstra pequena expansão do parênquima mesangial com consequente aumento no tamanho geral dos glomérulos, mas ainda pouco perceptível já que as alterações são bem sutis. Núcleos poliplóides (binucleadas, núcleos em divisão) e células mesangiais em divisão, como um todo, já são observados em pequena quantidade. A estrutura geral dos glomérulos permaneceu íntegra, sem alterações do tipo proliferação difusa com acentuação lobular, ou lesões segmentares em tufos de glomérulos e

sem apresentar focos de esclerose glomerular. Não foi observado em nenhum dos animais dos grupos cilindros proteicos no interior dos túbulos contornados. Essas mudanças são equivalentes às primeiras alterações que ocorrem em um processo inflamatório por complexo imune de uma glomerulopatia parasitária.

6 Meses de infecção (grupo III) e 2 Meses de tratamento (grupo II) – O grupo III, de reinfectados com 6 meses de infecção e que não foram submetidos ao tratamento, manifestou mudanças histológicas que consistiam essencialmente em proliferação de células endoteliais e mesangiais não tão intensas como na forma de glomerulonefrite humana, entretanto mais acentuadas do que apresentaram os glomérulos dos camundongos com 4 meses de infecção. Neste grupo também foram observados núcleos poliplóides, expansão do parênquima mesangial, células em divisão e aumento no tamanho geral do glomérulo por causa da proliferação celular, como ocorre em estágios progressivos de inflamação, mas sem lesões graves e diferenciadas. Essas alterações são mais visíveis com 6 meses de infecção do que foi apresentado no ponto de análise anterior, mas continuam sendo pequenas (figura 8 – C).

No grupo II, com camundongos submetidos ao tratamento após 4 meses de infecção e analisados histologicamente com 2 meses depois do tratamento não apresentaram aspecto glomerular diferente do grupo controle intacto. Os camundongos tratados possuíam glomérulos com tamanho normal, celularidade glomerular normal e pequena expansão do parênquima mesangial indicando que houve estresse estrutural em algum momento na arquitetura glomerular (figura 8 – E). Não foi observado no tecido células em divisão, nem núcleos poliplóides, inclusive não foram encontradas alterações como proliferação difusa com acentuação lobular, lesões segmentares em tufo de glomérulos e focos de esclerose glomerular em ambos os grupos experimentais deste período de análise (6 meses), nem no anterior (4 meses).

8 Meses de infecção (grupo III) e 4 meses de tratamento (grupo II) – Após 8 meses de infecção, os camundongos do grupo III que não foram tratados apresentaram aspecto histológico com células mesangiais hipertrofiadas e com hiperplasia melhor observadas (figura 8 – D). Células endoteliais e mesangiais em divisão e núcleos poliplóides foram observados, mas a progressão do processo inflamatório que ocorreu neste grupo foi melhor percebida pela observação do aumento da proliferação celular glomerular e expansão do parênquima mesangial. As Alterações não ultrapassaram essas observações, nem apresentaram outros tipos histológicos, mesmo no ponto mais crítico com 8 meses de

acompanhamento da infecção, destacando novamente que as lesões observadas na microscopia óptica em glomerulopatia esquistossomótica experimental são pequenas e não manifestam, até este ponto, lesões graves. Alguns casos foram excluídos por apresentar na histologia dissociação do tecido, decorrente da má fixação do material. No grupo II de animais tratados após 4 meses de tratamento, não foram observados processos de divisão celular e núcleos poliplóides, a celularidade apresentou aspecto normal e pequena expansão do parênquima mesangial com sutil aumento no tamanho do glomérulo, indicativos de que a estrutura do córtex renal sofreu algum processo inflamatório (figura 8 – F).

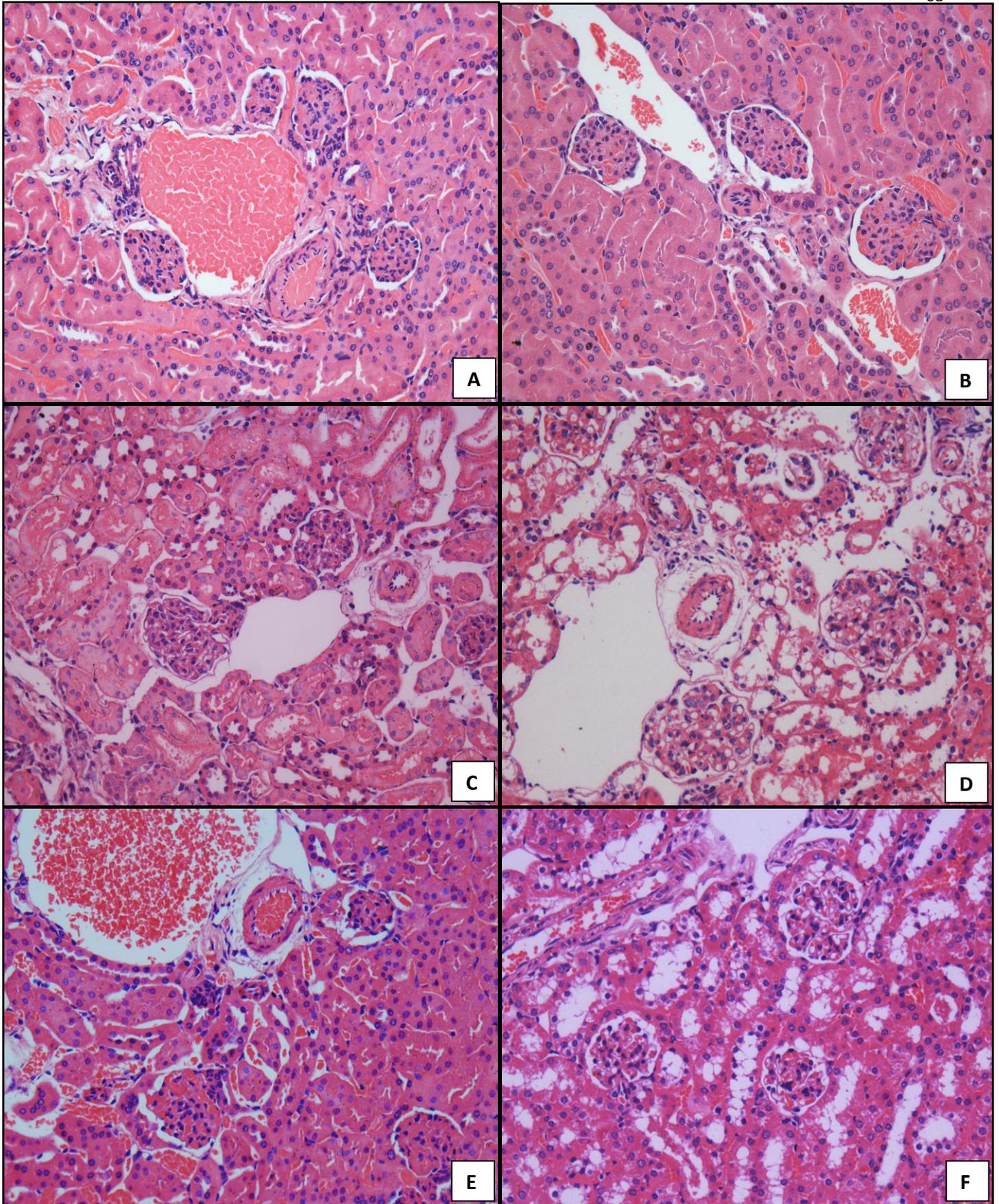


Figura 8 – Aspectos histológicos dos glomérulos renais de camundongo reinfetados com *S. mansoni* submetidos ou não ao tratamento com Praziquantel durante o curso de 8 meses de experimento. A – histologia do córtex renal em camundongo do grupo controle intacto com glomérulos normais. B – região cortical do rim de camundongo com 4 meses de

infecção, demonstrando pequena proliferação de células nos glomérulos. C – Região cortical do rim de animal com 6 meses de infecção, contendo glomérulos com proliferação celular provocando um aumento relativo do tamanho destes. D – Camundongos infectados durante 8 meses apresentando glomérulos com maior proliferação celular e maior tamanho. E e F – Camundongos com 2 e 4 meses de tratamento, respectivamente, demonstrando na histologia renal glomérulos normais similares ao controle. Coloração Hematoxilina/Eosina, 200X.

### 6.3.2 Coloração PAS

Em análise mais detalhada sobre os efeitos da infecção parasitária esquistossomótica, nas membranas glomerulares do córtex renal, em diferentes períodos pré-estabelecidos de avaliação da progressão da doença, foi utilizada a coloração PAS (ácido periódico-Schiff) que cora de vermelho estruturas compostas por glicoproteínas, como as membranas basais. Essa coloração é principalmente usada para colorir estruturas contendo uma proporção alta de macromoléculas de carboidratos (glicogênio, glicoproteína, proteoglicanos) e para verificar o aspecto histológico em nefropatias parasitárias.

4 Meses de infecção (grupo III) – Camundongos com 4 meses de infecção apresentaram espessamento e duplicação das membranas, alterações mais bem visíveis através da microscopia óptica nas membranas externas do glomérulo (figura 9 – B). A proliferação celular e as células em divisão também são bem visíveis com essa coloração. Foram observadas contorções e alteração conformacional das membranas, que perderam a integridade, e os limites lobulares são mais difíceis de determinar por causa da distorção membranar. Apesar dessas mudanças na estrutura das membranas glomerulares, não ocorreu lesões segmentares em tufo glomerulares e essas alterações não equivalem a rompimento de membranas ou a processos de proliferação celular difusa com acentuação lobular.

6 Meses de infecção (grupo III) e 2 Meses de tratamento (grupo II) – O grupo III de reinfectados não tratados com 6 meses de infecção demonstraram aspectos estruturais das membranas glomerulares semelhantes às observadas em camundongos com 4 meses de infecção (figura 9 – C). As diferenças entre eles apenas foi a observação caracterizada de maiores distorções e espessamento das membranas glomerulares, demonstrando um processo gradual dessas alterações e expressando que o modelo experimental murino chega a apresentar somente alterações pequenas de uma glomerulopatia inicial e discreta, como

referido anteriormente, uma glomerulite. No grupo II de tratados, analisados após 2 meses de tratamento, os camundongos apresentaram espessamento da membrana menor do que o grupo de infectados durante 6 meses, e não tiveram duplicação das membranas basais (figura 9 – E).

8 Meses de infecção (grupo III) e 4 meses de tratamento (grupo II) – animais infectados durante 8 meses demonstraram duplicação e maior espessamento das membranas basais, ocorreu aumento das distorções membranares, alterações na estrutura ou formato geral dos glomérulos, dos tufos lobulares sem lesões segmentares (figura 9 – D). Camundongos infectados durante 4 meses e tratados, foram avaliados após 4 meses de tratamento e apresentaram estrutura da membrana basal glomerular normal, semelhante ao aspecto histológico observado nos camundongos de controle intacto (figura 9 – F e A). Sem distorções e proliferação celular, a estrutura geral do glomérulo estava normal. Isso sugere que, como os animais com 2 meses de tratamento ainda apresentaram espessamento das membranas, o processo de recuperação é gradual.

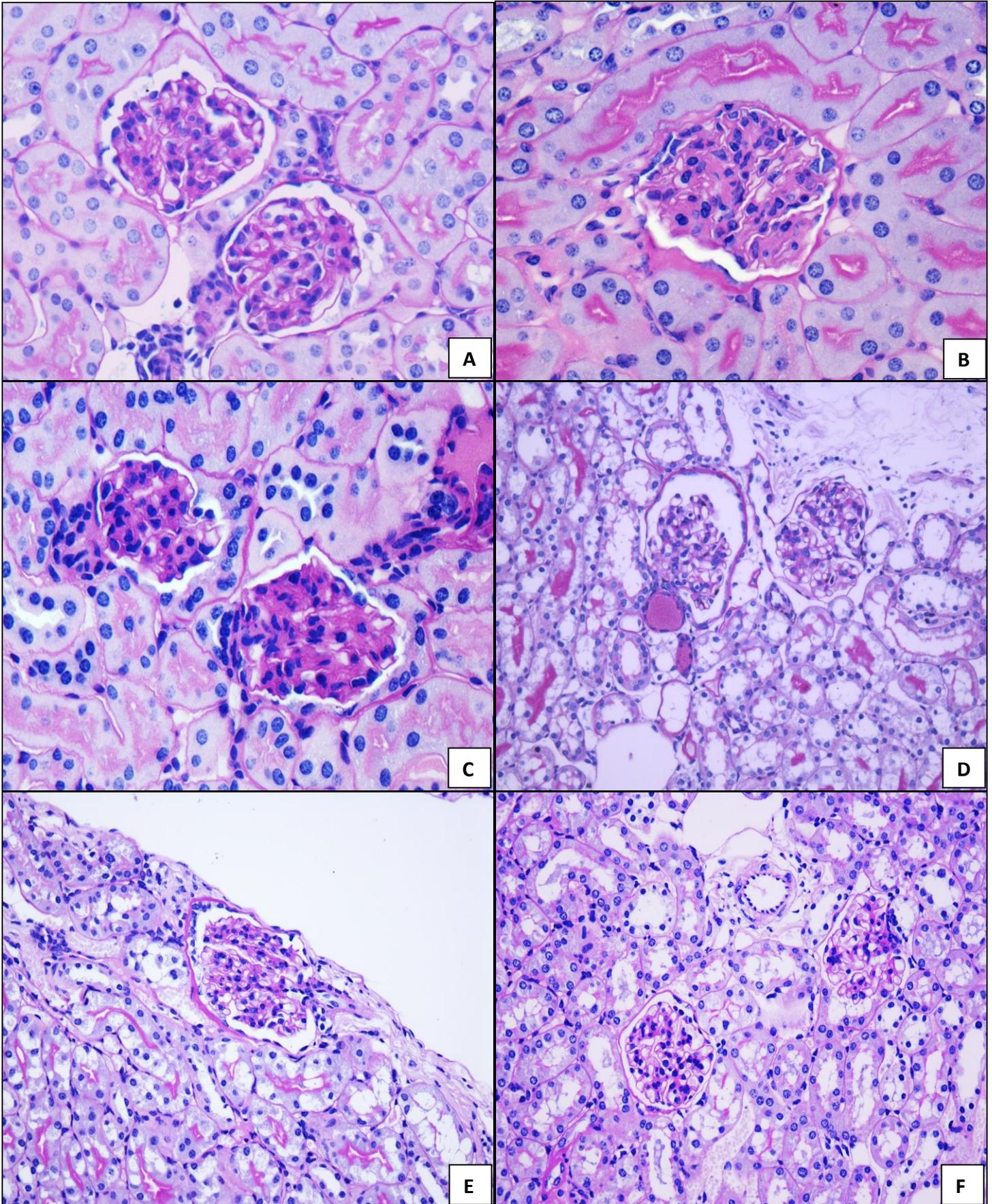


Figura 9 – Histopatologia do córtex renal de camundongos infectados com *S. mansoni* e tratados ao longo do curso de 8 meses de experimento. A - Controle intacto apresentando glomérulos com estrutura normal. B – Rim de camundongo com 4 meses de infecção

demonstrando espessamento da membrana basal. C – Histologia de animal com 6 meses de infecção demonstrando espessamento e distorção da membrana basal. D – Ilustração de glomérulos de camundongo com 8 meses de infecção apresentando membranas espessas e bastante distorcidas. E e F – Camundongos com 2 e 4 meses após o tratamento, respectivamente, demonstrando estrutura normal das membranas glomerulares, exceto com 2 meses após o tratamento que apresentou distorção e espessamento da membrana basal. Coloração PAS, 400X.

### 6.3.3 Coloração PIFG

Os depósitos e organização de fibras colágenas e o processo de fibrose no tecido renal, com o desenvolvimento da esquistossomose crônica provocando o processo inflamatório nos rins, foram analisados através da coloração de PIFG (Picrosirius-red). Esse método de coloração é baseado nas próprias características do corante, sendo ele fortemente ácido, por causa dos seus seis grupamentos sulfônicos, reagem com os grupamentos aminicos das moléculas de lisina presentes no colágeno, marcando especificamente as fibras de vermelho. Essa coloração é importante para visualizar mais uma alteração da glomerulopatia avançada encontrada em humanos, que é a fibrose.

4 Meses de infecção (grupo III) – Camundongos infectados durante quatro meses não apresentaram processo fibrótico no córtex renal. Foram observados depósitos de colágeno em quantidade normal e semelhante à demonstrada no aspecto histológico dos animais do grupo controle intacto (figura 10 – B e A).

6 Meses de infecção (grupo III) e 2 Meses de tratamento (grupo II) – com 6 meses de infecção, não foi observado nos camundongos fibrose na estrutura histológica do tecido renal. A quantidade de colágeno depositado foi maior do que o observado normalmente, principalmente próximo ou ao redor de grandes vasos corticais (figura 10 – C). Camundongos tratados após 2 meses do tratamento apresentaram quantidade de colágeno maior que o normal, e semelhante ao do grupo de infectados 6 meses, mas sem processo fibrótico (figura 10 – E).

8 Meses de infecção (grupo III) e 4 meses de tratamento (grupo II) – camundongos infectados durante 8 meses não manifestaram nenhum processo fibrótico, indicando que

mesmo uma infecção esquistossomótica experimental murina durando 8 meses não causa aspectos da glomerulopatia crônica, difusa e mais grave, caracterizada também pela presença de fibrose. A quantidade de depósito de fibras colágenas foi a maior apresentada entre os grupos durante todo o período experimental (figura 10 – D), e nenhum dos camundongos apresentou glomerulosclerose. Já os animais analisados após 4 meses de tratamento, além de não demonstrarem fibrose, possuíam quantidade de colágeno semelhante ao normal, e presente na histologia renal dos camundongos do grupo controle intacto (figura 10 – F e A).

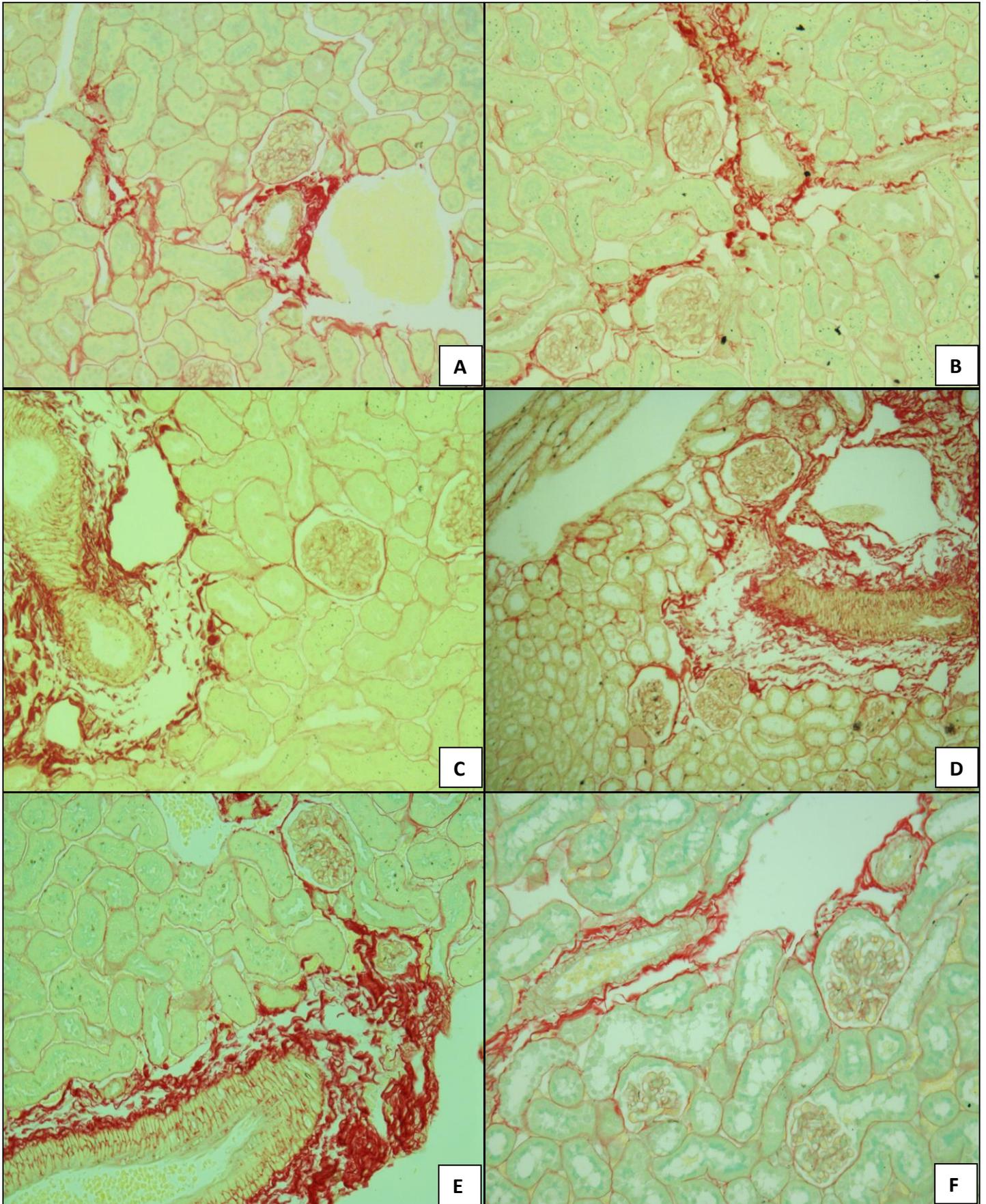


Figura 10 – Ilustrações dos depósitos de fibras colágenas no parênquima do córtex renal de camundongos Balb/C infectados e tratados durante o período experimental de 8 meses. A- Constitui região glomerular de animal do grupo controle intacto com pequeno

depósito de colágeno, que ocorre normalmente. B, C e D – Animais infectados com 4, 6 e 8 meses de infecção, respectivamente, apresentando aumento progressivo da quantidade de colágeno depositado próximo de glomérulos e vasos. E e F – camundongos com 2 e 4 meses de tratamento, demonstrando redução desses depósitos de colágeno, apesar do animal de 2 meses após o tratamento apresentar quantidade de colágeno maior que o do grupo controle, próximo a grandes vasos, zona de recuperação. Coloração Picrosírius-red Fast Green (PIFG), 200X.

#### 6.4 IMUNOFLUORESCÊNCIA

Uma das mais importantes técnicas quando se busca testar um medicamento é ainda precisa e eficiente em termos de marcar antígenos e imunoglobulinas nos tecidos. A imunofluorescência permite a detecção e localização de antígenos e anticorpos em células e tecidos utilizando, respectivamente, anticorpos específicos e antígenos correspondentes, marcados com fluorocromos, tornando-os visíveis ao microscópio de fluorescência.

##### 6.4.1 Direta para IgG

As Secções do tecido renal congeladas foram avaliadas através da técnica de imunofluorescência direta com o objetivo de marcar depósitos de imunoglobulinas IgG de camundongos. Essas imunoglobulinas devem estar depositadas nos glomérulos renais formando complexos imunes com o antígeno de Nash e complementos e são retidos no processo de filtração do sangue que ocorre no rim.

4 Meses de infecção (grupo III) – Observando a região do córtex renal, os glomérulos de camundongos infectados durante 4 meses apresentaram marcação para IgG, mas em pequena quantidade, comparando com o grupo controle intacto cujo glomérulo não demonstrou nenhuma marcação (Figura 11 e 12 – B e A). Isso indica que já ocorre depósito de complexo imune lesionando e originando glomerulopatia em modelo experimental murino com 4 meses de infecção pelo *S. mansoni*.

6 Meses de infecção (grupo III) e 2 Meses de tratamento (grupo II) – analisando os camundongos infectados durante 6 meses, foi possível observar o aumento considerável da marcação, que atingiu praticamente todos os glomérulos visualizados no microscópio de

fluorescência (figura 11 e 12 – C). Esse grande aumento de anticorpos depositados sugere aumento de depósitos de complexos imunes e avanço da doença, um processo gradual de progressão da glomerulopatia. Animais tratados com 2 meses após tratamento apresentaram ainda marcação para o anticorpo, mas bem pequena, menor do que em camundongos com 4 meses de infecção (figura 11 e 12 – E).

8 Meses de infecção (grupo III) e 4 meses de tratamento (grupo II) – a imunofluorescência direta em animais infectados durante 8 meses marcaram IgG em alguns glomérulos, mas não em todos como observado no grupo de 6 meses de infecção (figura 11 e 12 – D). Nessa comparação, a intensidade de marcação da fluorescência também foi menor no grupo de 8 meses em relação ao de 6 meses de infecção, apesar de continuar sendo alta. Camundongos tratados com 4 meses após o tratamento foram avaliados e ainda demonstraram uma mínima marcação para os anticorpos IgG (figura 11 e 12 – F). O tratamento não chegou a eliminar todo tipo de depósito nos glomérulos, retornando-os ao estágio inicial como se nunca tivessem sofrido nenhum tipo de estresse glomerular, mas ocorreu redução considerável indicando um progressivo processo de cura e reestruturação.

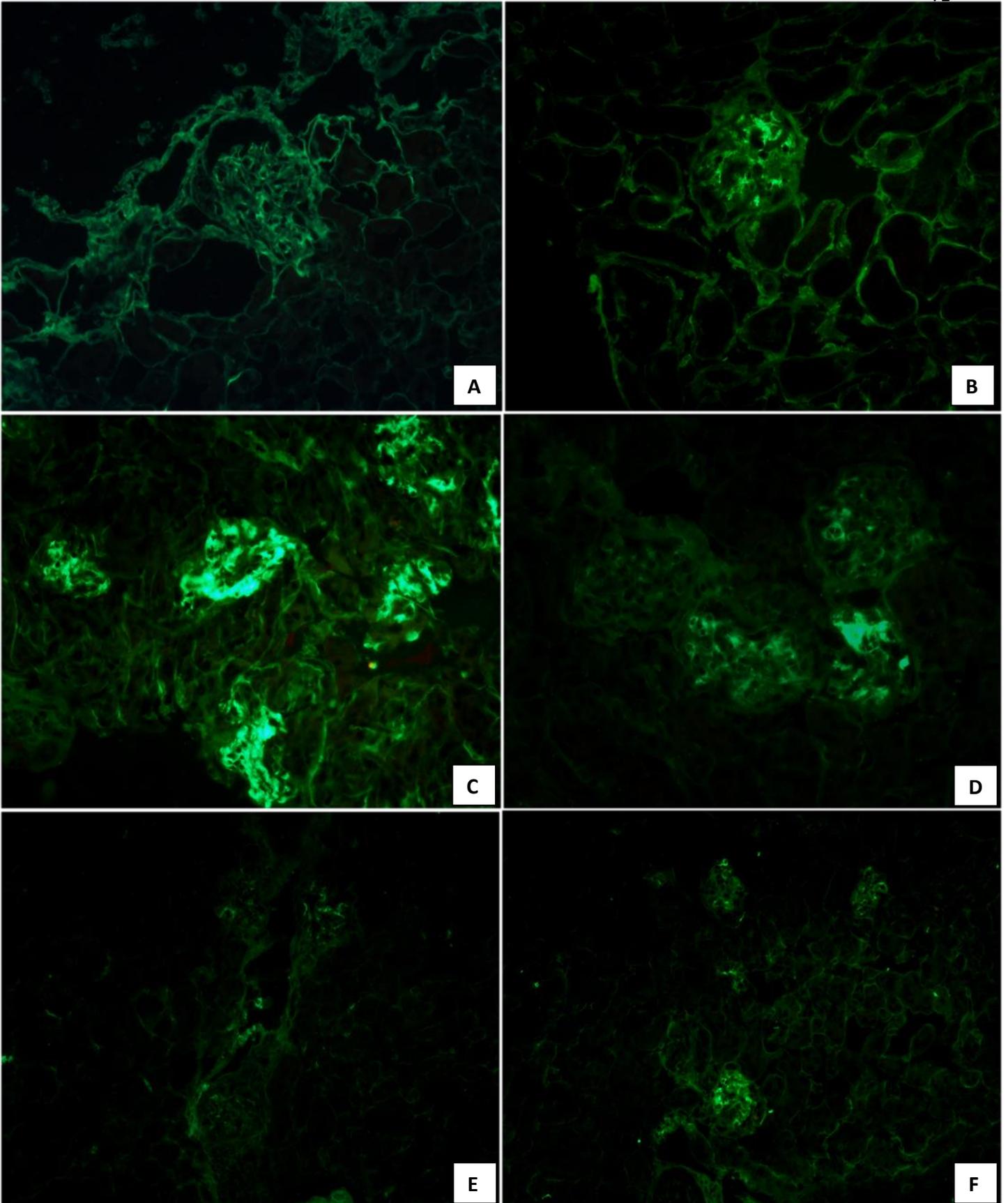


Figura 11 - **Imunofluorescência direta marcando depósitos de imunoglobulinas IgG em glomérulos renais de camundongos infectados e tratados ao longo do período de 8 meses.**  
A – Glomérulo renal normal (não marcado para IgG) de camundongo do grupo controle intacto, 400X. B, C e D – região glomerular de animais com 4, 6 e 8 meses de infecção pelo *S.*

*mansoni*, marcando depósitos de IgG em áreas mesangiais e membranares dos glomérulos, 400X. E e F – camundongos com 2 e 4 meses de tratamento, respectivamente, apresentaram pequena marcação para IgG, 200X. Imunofluorescência direta para IgG, filtro 1 para fluoresceína.

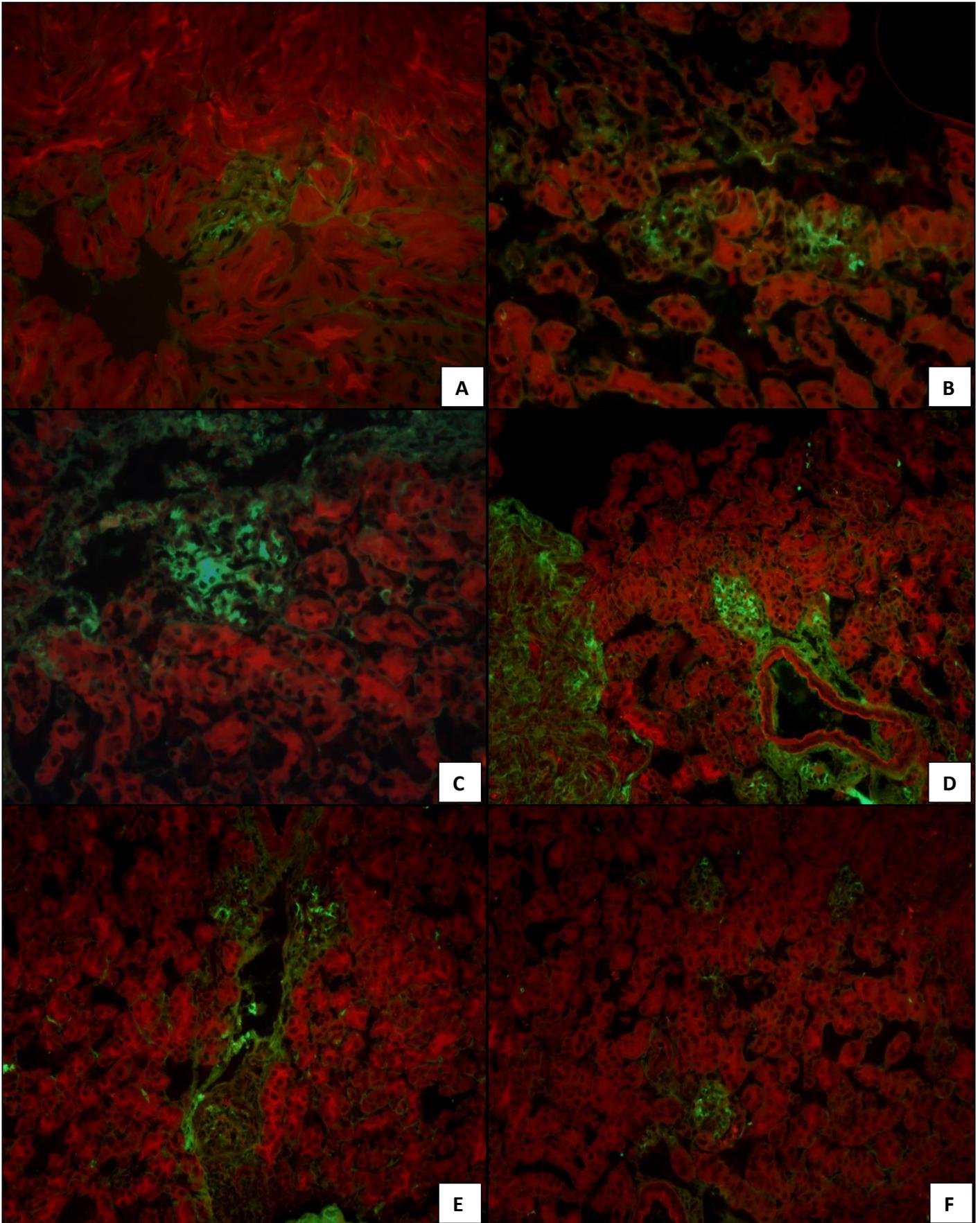


Figura 12 - **Imunofluorescência direta com sobreposição de filtros marcando depósitos de imunoglobulinas IgG em glomérulos renais de camundongos infectados e tratados ao longo do período de 8 meses.** A- Controle intacto, glomérulo normal, 400X. B, C e D –

Camundongos infectados durante 4, 6 e 8 meses, respectivamente, com glomérulos marcados de depósitos de IgG, 400X. E e F – Animais com 2 e 4 meses de tratamento apresentando pequena marcação para a imunoglobulina, 200X. Imunofluorescência direta para IgG, filtro 1 (para fluoresceína) sobreposto ao filtro 2 (para rodamina).

#### **6.4.2 Indireta para Antígeno de Nash**

A técnica de imunofluorescência indireta foi utilizada para marcar antígenos do verme no tecido do córtex renal de camundongos infectados com *S. mansoni* ao longo de 8 meses de experimento.

4 Meses de infecção (Grupo III) – O grupo de controle intacto não apresentou nenhuma marcação e camundongos infectados durante 4 meses também não demonstraram glomérulos marcados com fluorescência para antígeno de Nash (figura 13 – A e B). Isso indica, neste trabalho, que com infecção esquistossomótica de 4 meses de duração em modelo experimental, ainda não foi desencadeado um processo inflamatório de origem parasitária com repercussão sobre redução da função renal, apesar da presença detectada de anticorpos IgG que determina o início do processo.

6 Meses de infecção (Grupo III) e 2 Meses de tratamento (Grupo II) – Animais com 6 meses de infecção apresentaram marcação em glomérulos no tecido renal e demonstraram a maior intensidade de marcação comparada a todos os outros animais infectados, independente do período de infecção (figura 13 – C). Camundongos com 2 meses de tratamento não demonstraram marcação em glomérulos do córtex renal (figura 13 – E).

8 Meses de infecção (Grupo III) e 4 meses de tratamento (Grupo II) – A marcação do antígeno de Nash em animais infectados durante 8 meses ocorreu de forma intensa, mas em menor quantidade que animais de 6 meses de infecção (figura 13 – D e C). Camundongos com 4 meses de tratamento não demonstraram nenhuma marcação nos glomérulos renais (figura 13 – F), indicando que o tratamento realmente regrediu os depósitos e eliminou os complexos imunes de origem parasitária (esquistossomótico) formado pelo antígeno polissacarídeo do verme.

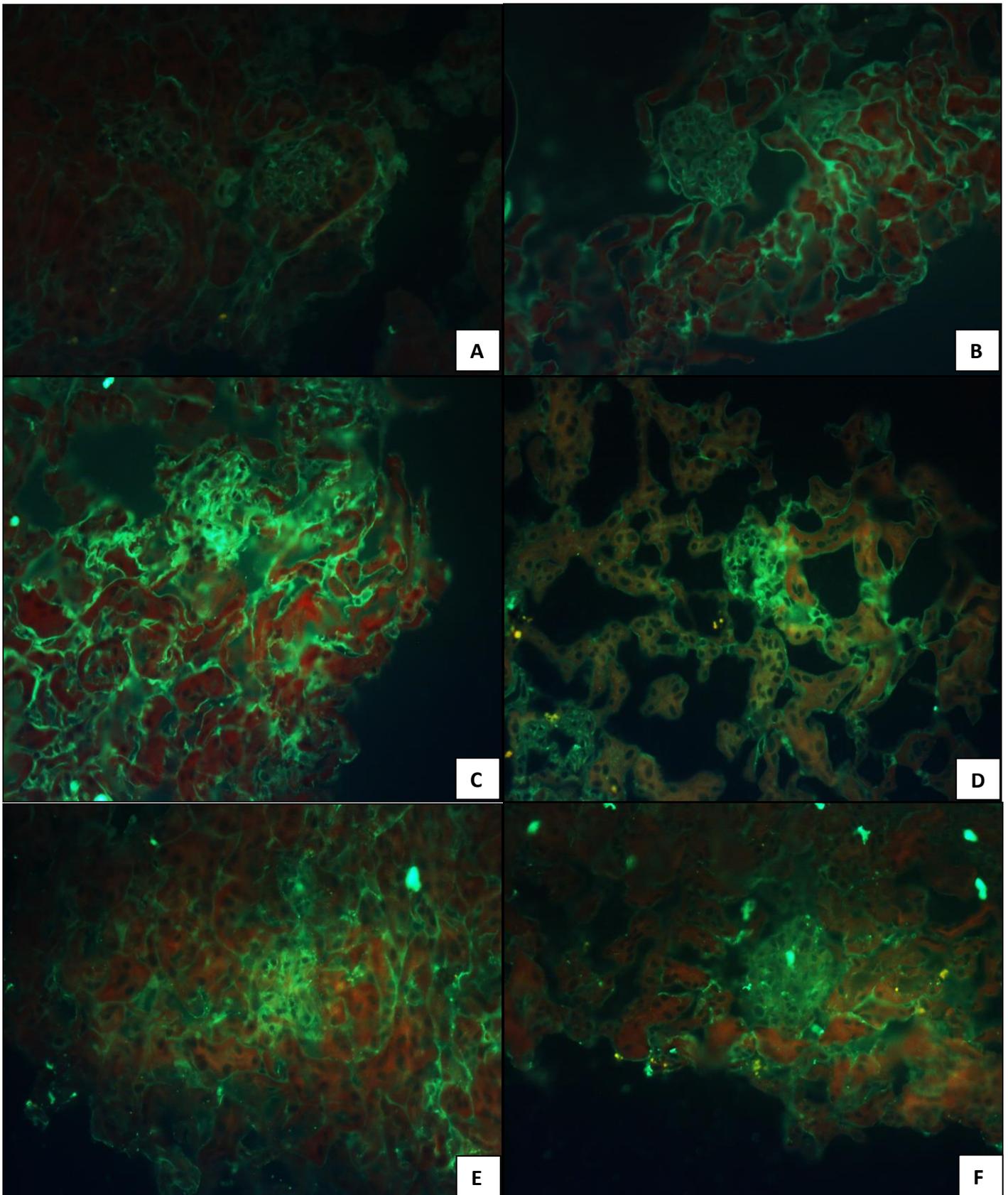


Figura 13 – **Imunofluorescência indireta marcando depósitos de antígenos de Nash em glomérulos renais de camundongos infectados e tratados durante 8 meses de experimento.** A – Glomérulo renal normal de camundongo do grupo controle intacto, 400X.

B, C e D – região glomerular de animais com 4, 6 e 8 meses de infecção pelo *S. mansoni*, respectivamente. O camundongo de 4 meses de infecção não apresentou depósito (400X), mas os animais de 6 e 8 meses de infecção demonstraram glomérulos marcados identificando depósitos do antígeno, 200X. E e F – camundongos com 2 e 4 meses após o tratamento, respectivamente, apresentaram glomérulos normais, não identificando depósitos do antígeno, 200X. Imunofluorescência indireta para antígeno de Nash, filtro 1 para fluoresceína.

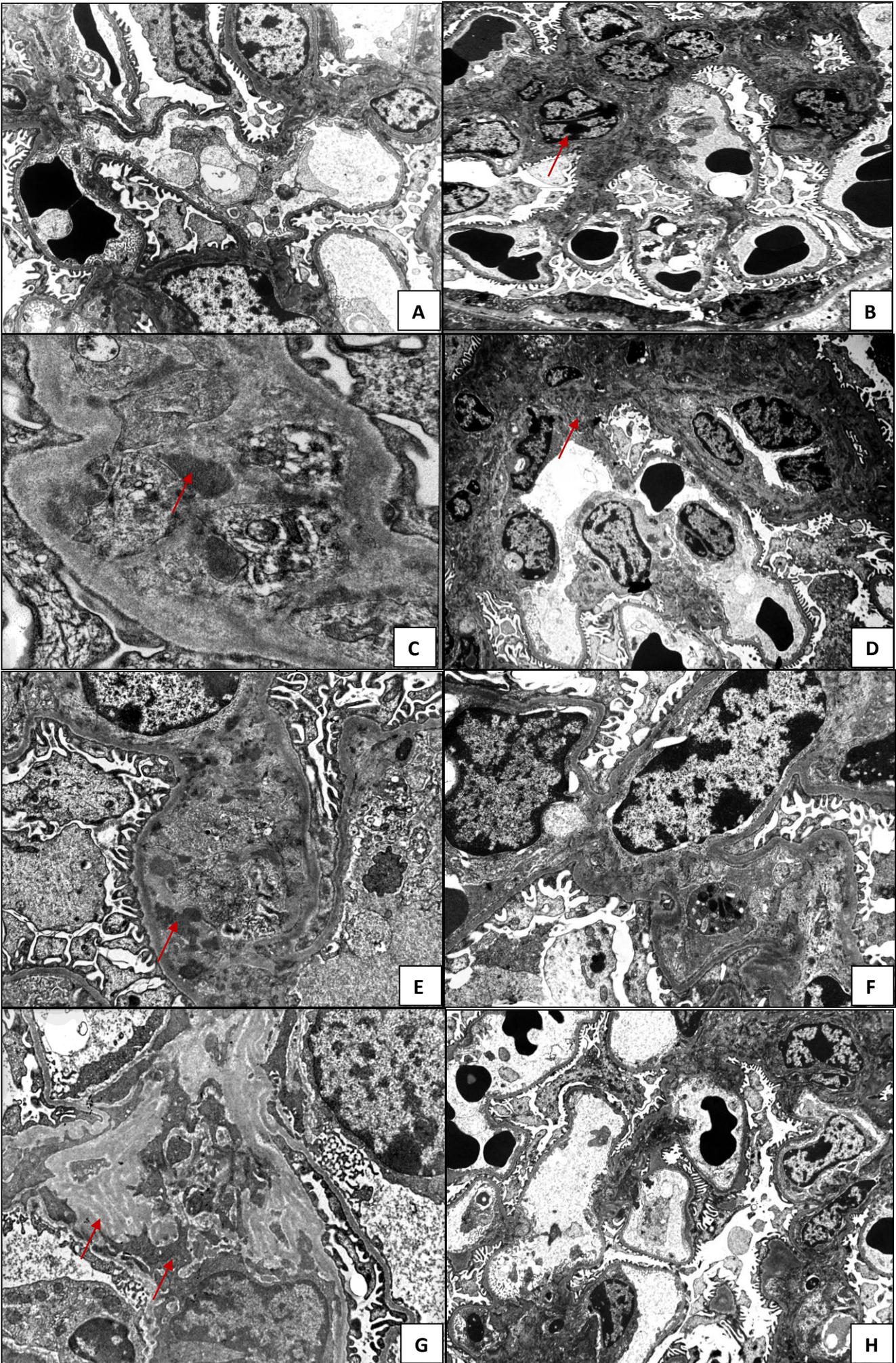
#### 6.5 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (MET)

A análise completa, em que são observadas alterações celulares, membranares, e identificados compostos que participam da gênese dessas lesões em estudo ultraestrutural, confere a grande importância da técnica em um estudo. A microscopia eletrônica de transmissão foi essencial a este trabalho, porque consegue demonstrar em eletromicrografia ultraestrutural todos os tipos de alterações que podem ocorrer no processo inflamatório que caracteriza a glomerulopatia esquistossomótica. Inclusive detecta a localização dos depósitos de complexos imunes na região exata do glomérulo onde são encontrados depositados.

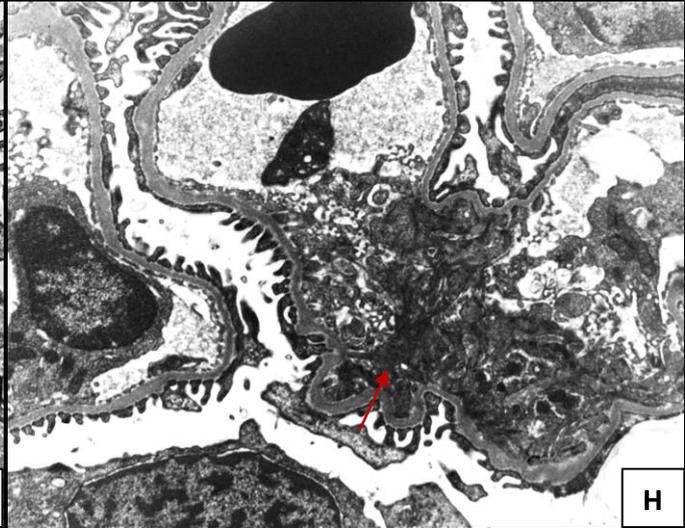
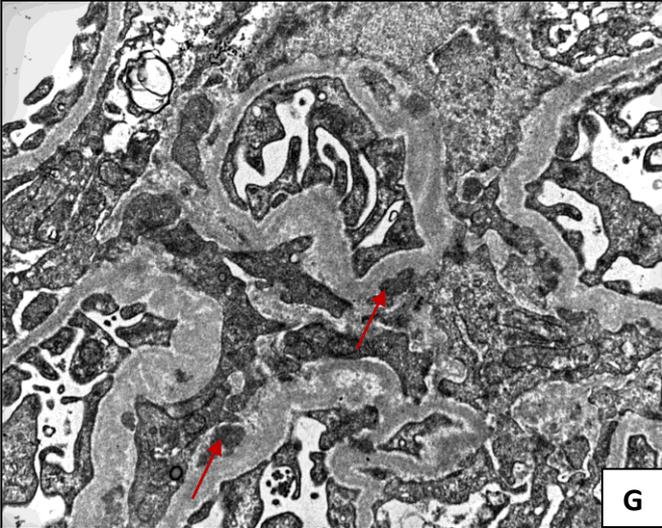
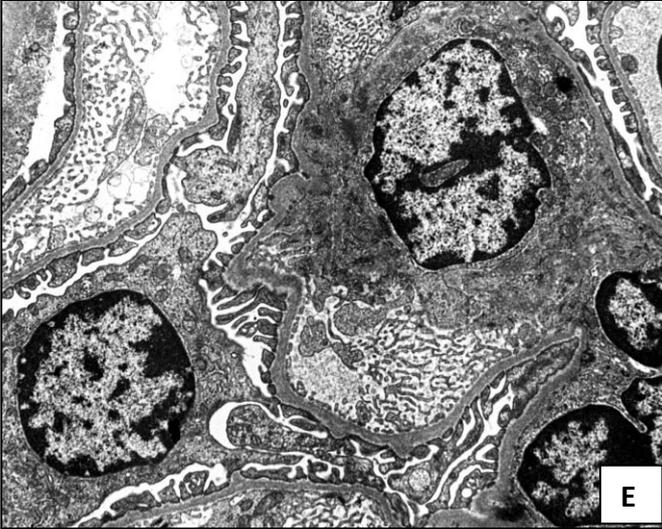
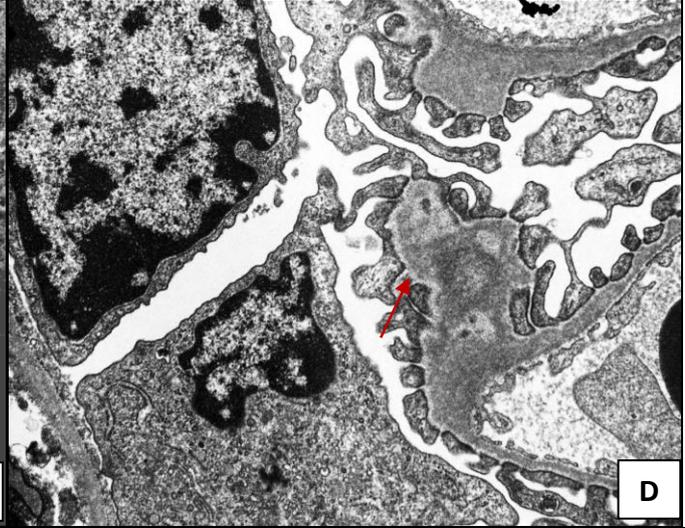
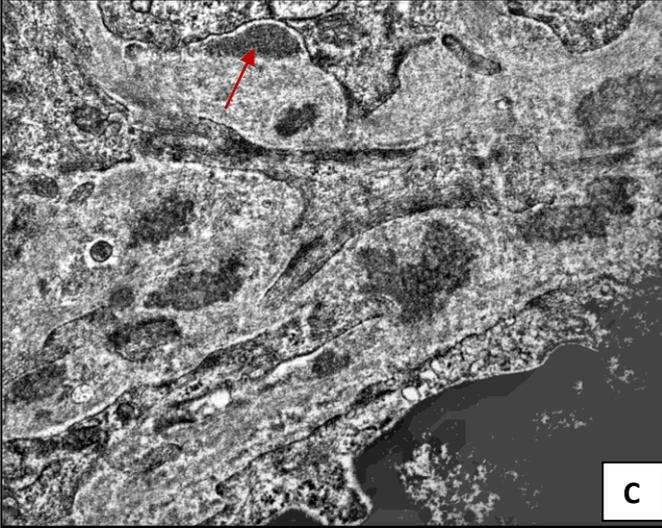
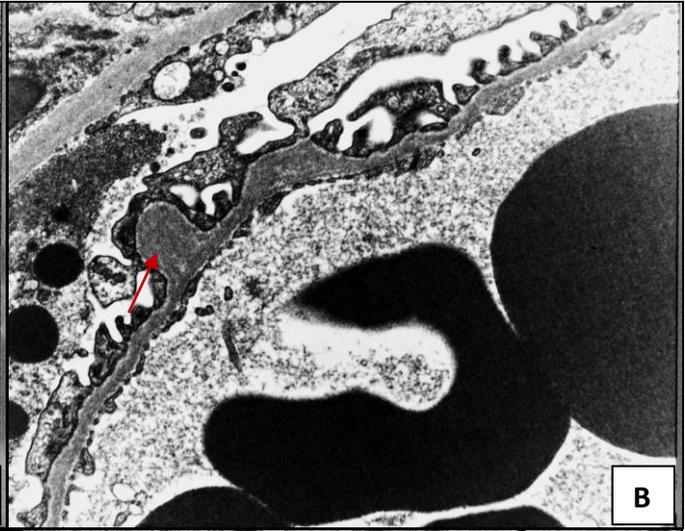
4 Meses de infecção (Grupo III) – Este grupo de animais infectados durante 4 meses revelou na eletromicrografia área de proliferação mesangial no glomérulo comparado às imagens dos glomérulos de camundongos do grupo de controle intacto (figura 14 - B e A). As imagens também demonstraram pequenos depósitos mesangiais, membranares (sub-epiteliais e intramembranosos) e pequenas alterações na estrutura da membrana, distorções provenientes de um processo inflamatório (figura 14 C e 15 A e B).

6 Meses de infecção (Grupo III) e 2 Meses de tratamento (Grupo II) – com 6 meses de infecção foi observado uma grande área de expansão mesangial associada a proliferação celular e aumento dos depósitos de complexos imunes em uma área maior no mesângio (figura 14 – C e D). Foram demonstradas também mudanças na estrutura da membrana basal, proeminências, mas consistem dos depósitos sub-epiteliais, sub-endoteliais e intramembranosos presentes alterando as membranas, além de vários pontos de fusão podal (figura 15 – C e D). O grupo de camundongos com 2 meses de tratamento apresentou membrana com estrutura normal, regular, sem presença de depósitos, mesmo nas pequenas proeminências encontradas em poucos pontos dos glomérulos observados (figura 14 F e 15 E).

8 Meses de infecção (Grupo III) e 4 meses de tratamento (Grupo II) – Animais com 8 meses de infecção apresentaram na eletromicrografia depósitos eletrodensos irregulares localizados principalmente nas áreas mesangiais e no epitélio da membrana basal glomerular, depósitos sub-epiteliais, sub-endoteliais e intramembranosos (figura 14 – G e H; figura 15 – F e G). Ocorreu expansão da área mesangial pela proliferação de células e distorções da estrutura da membrana basal pela presença dos depósitos que deformaram sua conformidade normal. Áreas de fusão podal e a imprecisão dos limites das membranas foram comumente observadas nesses animais infectados, e as membranas sem integridade, deformaram a estrutura geral do glomérulo delimitado pela membrana basal no ponto de separação dos tufo capilares. A maior área com deposição desses complexos eletrodensos no glomérulo foi encontrada claramente nestes animais com maior tempo de infecção. Os camundongos com 4 meses de tratamento demonstraram alguns pontos de deformação da membrana, proeminências, e um único animal ainda apresentou um único depósito na membrana e com áreas pequenas, mas consideráveis de depósito mesangial (figura 14 I e 15 H e I).



**Figura 14 - Microscopia Eletrônica de Transmissão demonstrando o aspecto ultraestrutural dos glomérulos renais e suas alterações na área mesangial, em camundongos Balb/C reinfetados e tratados durante o período de 8 meses.** A – Aspecto normal do glomérulo de um camundongo do grupo controle intacto, 4400X. B e C – Animal infectado durante 4 meses, demonstrando expansão da área mesangial pela proliferação celular, B (seta), 3000X, e depósitos de complexo imune no parênquima mesangial, C (seta), 20000X. D e E – Camundongo com 6 meses de infecção apresentando grande área de proliferação de células mesangiais em D (seta), 3000X, e depósitos de complexos imunes em parênquima mesangial em E (seta), 7000X. G – Glomérulo de camundongo com 8 meses de infecção apresentando grandes depósitos de complexos imunes tomando a maior parte do parênquima mesangial e distorções membranares (setas), 7000X. F e H – Camundongos com 2 e 4 meses de tratamento, respectivamente, com glomérulos normais tanto em F, 7000X, quanto em H, 3000X.



**Figura 15 - Microscopia Eletrônica de Transmissão demonstrando o aspecto ultraestrutural dos glomérulos renais e suas alterações na membrana basal, em camundongos Balb/C reinfetados e tratados durante o período de 8 meses.** A e B – Camundongo 4 meses infectado com depósitos e alterações (projeções) da membrana, 20000X. C e D – Animais com 6 meses de infecção apresentando depósitos que causam projeções na membrana em C(seta), 20000X, e projeções da membrana sem depósitos em D(seta) 12000X. F e G – Camundongos com 8 meses de infecção, demonstraram grandes projeções da membrana basal em F, 20000X, e depósitos distorcendo toda a estrutura de membrana basal glomerular em G (seta), 12000X. E – glomérulo de animal com 2 meses de tratamento apresentando estrutura da membrana basal normal, 7000X. H– Glomérulo de camundongo com 4 meses de tratamento, demonstrando em H pequenas deposições mesangiais de complexo imune (seta), 7000X.

## 6.6 MORFOMETRIA

A presença de depósitos de complexos imunes, identificados em eletromicrografia em praticamente todos os grupos experimentais, levou a necessidade de uma análise morfométrica da área de depósitos desses complexos para se saber estatisticamente os reais efeitos do tratamento sobre a presença dos depósitos de complexos imunes causadores da glomerulopatia esquistossomótica em modelo experimental murino. Para este estudo, dez campos eletromicrografados por animal foram selecionados aleatoriamente, utilizando-se aumento de 7.000X. Foram analisados cortes ultrafinos do rim de 3 animais de cada grupo experimental em cada ponto de análise.

A avaliação através de morfometria de áreas de depósitos dos complexos imunes nos glomérulos do tecido renal é uma variável quantitativa que foi estudada nos três pontos de análise para acompanhar a eficiência da quimioterapia antiparasitária, utilizando o Praziquantel, sobre os depósitos eletrodensos que provocam a glomerulopatia. Assim, foi possível inferir sobre intensidade de inflamação renal ao longo do tempo e reconstituição com o tratamento. Por isso, é uma variável muito ampla e sua estatística descritiva está, em parte, apresentada na tabela 4. Os desvios em torno da média sobre os valores da variável foram altos e são tratados no coeficiente de variação da tabela 4. Foi necessário analisar através de teste de normalidade a distribuição da variável para escolha do teste estatístico de inferência. Para isso, foi obtido a assimetria dos grupos, em que os únicos valores de área simétricos foram dos depósitos membranares em camundongos com 4 meses de infecção. Nos outros

grupos em todos os outros pontos de análise, os dados apresentaram uma elevada assimetria positiva, exceto animais com 2 meses após tratamento que não foi observado depósitos e por isso não foram medidos morfometricamente, e os animais com 4 meses de tratamento que só foi encontrado um depósito na membrana em uma imagem de campo visual, na qual a estatística não se aplica. Segundo o teste de Shapiro-Wilk, todos os dados da variável área morfométrica de depósitos dos complexos no rim foram significantes, com  $p < 0,05$ , ou seja, os dados não seguem uma distribuição normal e devem ser tratados por testes não paramétricos.

A comparação das médias de área dos depósitos demonstrou mais depósitos na região mesangial (MO) em comparação com a região da membrana basal (MA) em todos os grupos, exceto no grupo de reinfetados com 8 meses, que demonstrou maior área de depósito na membrana basal (MA), o que indica um processo intenso e contínuo de deposição de complexos. As áreas de deposição dos complexos entre os camundongos infectados foram progressivamente maiores à medida que se aumentou o tempo de infecção. Camundongos com 6 meses de experimento e 2 meses de tratamento não apresentaram depósitos e aqueles com período experimental de 8 meses e 4 meses de tratamento demonstraram depósitos com quantidade mais elevada que em animais com 4 meses de infecção, mas bem menor que aqueles com 6 e 8 meses de infecção.

Tabela 4 - Estatística descritiva da variável área de depósito de complexo imune no córtex renal, obtida por avaliação morfométrica, segundo tempo de infecção e grupo experimental dos camundongos, analisando média e coeficiente de variação.

<b>Tempo de infecção/tratamento (Meses)</b>	<b>Grupos</b>	<b>n*</b>	<b>Média da Área (nm<sup>2</sup>)</b>	<b>Coeficiente de variação (%)</b>
4 M	Reinfectados	3	97564,65 (MA)	90,42
			714587,19 (MO)	104,76
6 M	G III	3	627477,28 (MA)	45,98
			145342,00x10 <sup>9</sup> (MO)	122,37
8 M / 4 M de Trat.	G III	3	120544,00x10 <sup>9</sup> (MA)	183,79
			11836631,93 (MO)	97,29
	G II	3	1066983,62 (MA)	1
			36129437,12 (MO)	93,29

Obs: No tempo de 6 meses de infecção, o grupo II (camundongos tratados) não apresentou depósitos eletrodensos na eletromicrografia do córtex renal.

Nota: n\* = número de animais por grupo (dos animais submetidos à eutanásia usados no estudo microscópico, apenas 3 participaram do estudo morfométrico). MA – membrana e MO – mesângio.

Na análise da variável morfométrica área de depósito foi utilizado tanto o teste estatístico Kruskal-Wallis, como o Mann-Whitney para testar as hipóteses nulas de que não há variação entre as médias e medianas das áreas de depósito entre camundongos do grupo de reinfectados e os do grupo de tratamento nos 3 pontos de análise. Portanto, o teste foi direcionado partindo dessas hipóteses e apresentaram resultados significantes de  $p < 0,05$ , e a distribuição dos valores das áreas de depósito relacionadas aos locais de depósitos (MA e MO) no glomérulo por período de análise (4, 6 e 8 meses) estão demonstradas nos gráficos da figura 16. Os resultados apresentaram maior área de depósito dos complexos imunes na região mesangial dos rins de camundongos reinfectados ao decorrer 4 e 6 meses de infecção. A influência do tratamento foi constatada ao analisar os gráficos da figura 17.

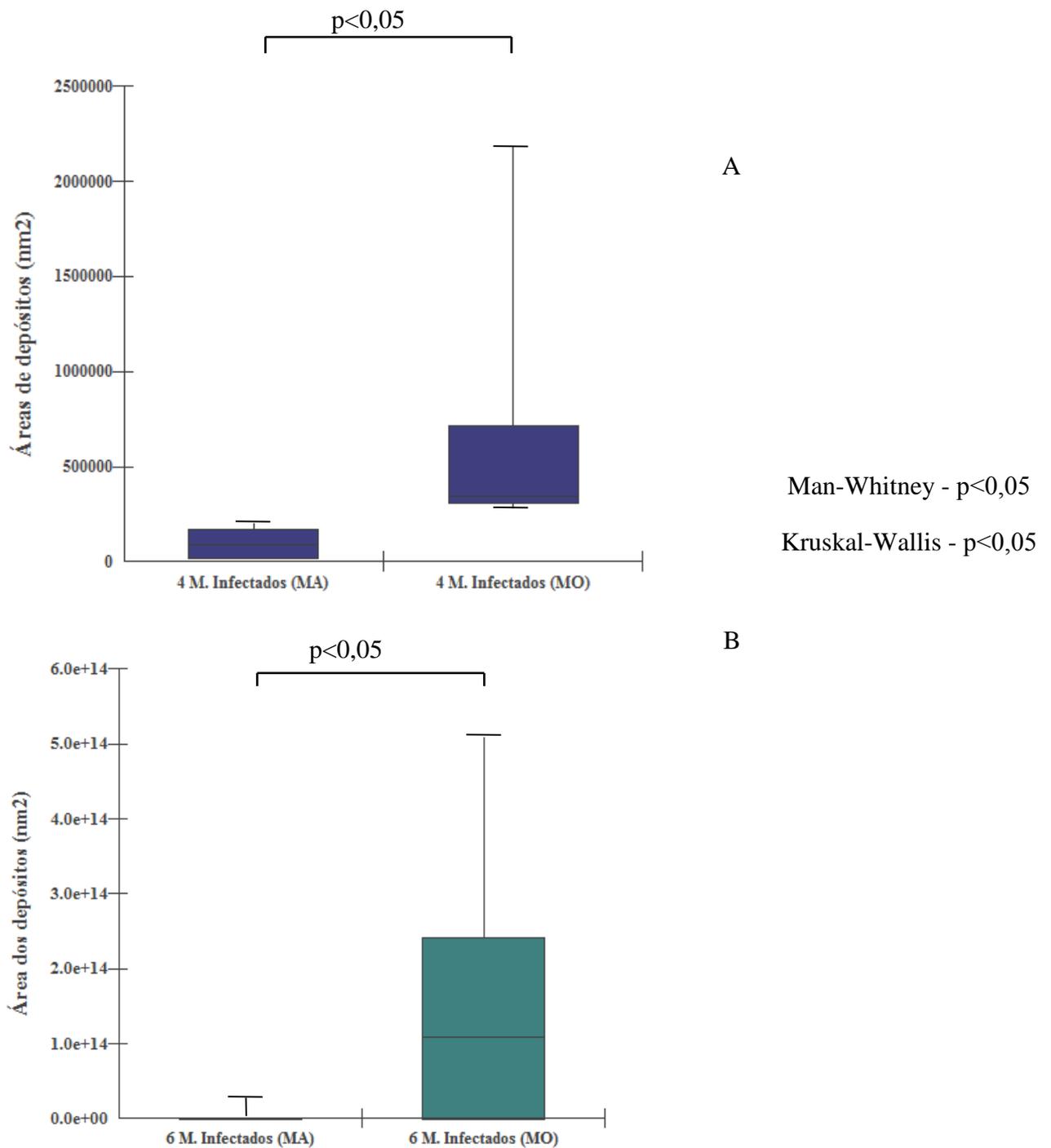


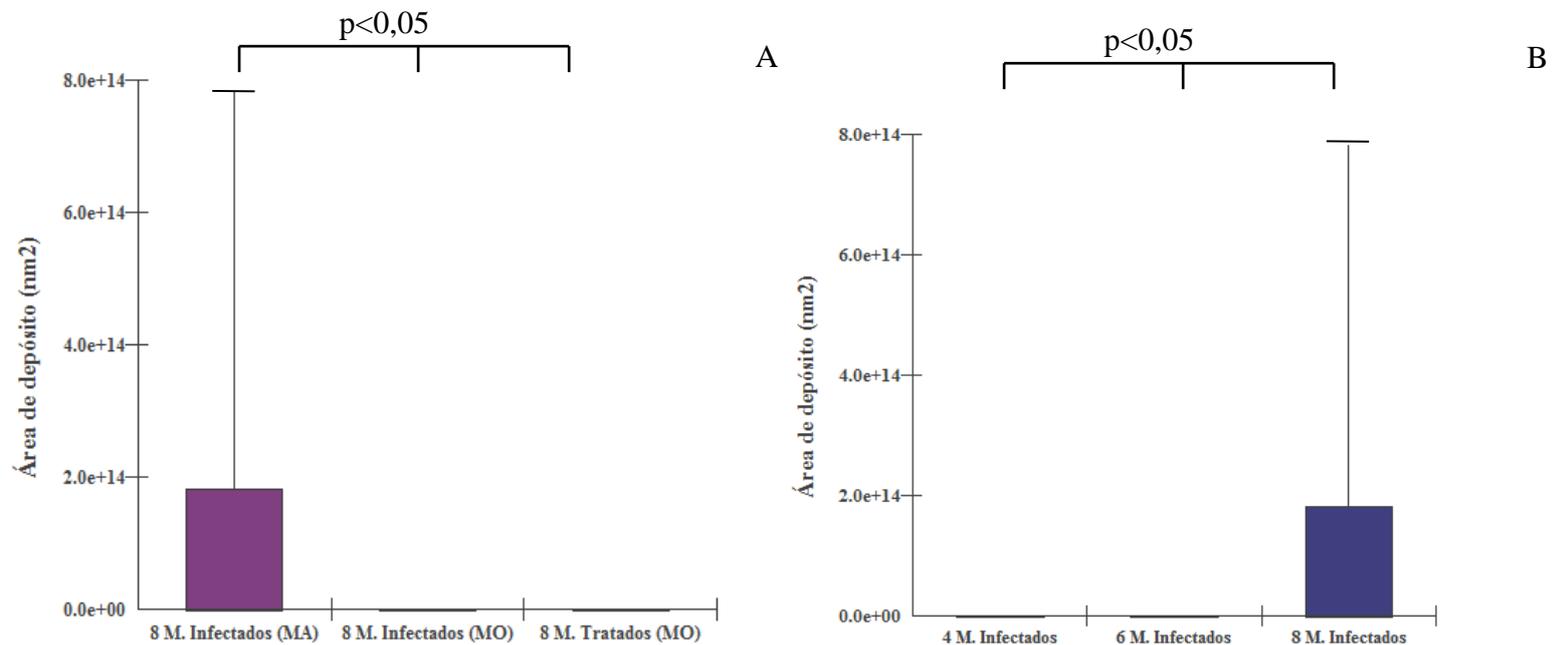
Figura 16 – **Análise morfométrica da área de deposição de complexos imunes segundo a região glomerular de deposição em camundongos com 4 e 6 meses de infecção.** Os Box plot gerados nos gráficos A e B apresentam a média e os desvios da variável área de deposição de complexo imune nas regiões membranares (MA) e mesangiais (MO) de camundongos com 4 meses em A e com 6 meses de infecção em B. O gráfico indica os valores centrais, aproximadamente, e a morfometria de área em nm<sup>2</sup> que foi realizada nas

imagens de microscopia eletrônica de transmissão. Os testes estatísticos Man-Whitney e Kruskal-Wallis foram utilizados para avaliar os dados e apresentaram  $p < 0,05$ , significante, demonstrando grande diferença entre as áreas de depósito mesangial e membranar no glomérulo.

As médias das áreas de depósitos dos complexos fornecem informações da tendência ou equivalência central da variável e permitem que comparações e inferências possam ser feitas com esses imunocomplexos causadores da doença renal. O tamanho da área pode ser associado com intensidade ou quantidade desse tipo de “intoxicação imunológica” renal, o que é fundamental em testes de análises da eficiência ou repercussão de tratamento parasitário para o problema.

A figura 17(A) apresenta as médias de área de depósito e o elevado valor dessa variável na região da membrana basal de glomérulos de camundongos com 8 meses de infecção. Isso identifica que infecções mais prolongadas são acompanhadas de contínuo processo de agressão, como a retenção desses depósitos que iniciam na membrana basal, indicando aumento ou evolução do problema, ao agravar a inflamação pelo maior acúmulo de complexo imune estimulando as diversas alterações glomerulares. Em B são apresentadas as médias das áreas de depósito, sem separação da região glomerular afetada, em camundongos de 4, 6 e 8 meses de infecção, em um processo progressivo que demonstrou, como esperado, maior área de glomérulo afetada pelos complexos eletrodensos encontrados em camundongos infectados durante 8 meses.

O gráfico projetado com o teste de Kruskal-Wallis para análise da variação em torno das médias de áreas demonstra significância dos resultados em quase todas as correlações analisadas, sendo a linha que percorre as barras no gráfico igual à média e as hastes superiores nas barras equivalentes ao erro do teste. As relações estabelecidas que tiveram as maiores diferenças nas áreas foram os depósitos membranares nos animais com 4 meses de infecção, com as menores áreas em relação aos depósitos mesangiais nos animais com 6 e 8 meses de infecção, inclusive em relação aos depósitos mesangiais em animais com 4 meses de tratamento. Assim, o tratamento reverte os processos iniciais de agressão renal no início da glomerulopatia em modelo experimental murino e reestrutura a maioria das alterações provocadas pelo processo inflamatório que vai progressivamente sendo instalado, mas não é completamente eficaz e podem ocorrer casos em que o tratamento não tem muita repercussão e a doença se mantém, podendo evoluir.



Kruskal-Wallis -  $p < 0,05$

Figura 17 – Avaliação morfométrica da área de depósitos de complexos imunes segundo a região glomerular de deposição em camundongos com 8 meses de infecção e tratamento e acompanhamento do quantitativo da área de deposição segundo tempo de infecção. Os gráficos de Box plot comparam as médias e os desvios da variável área de depósito nos dois grupos experimentais encontrados, segundo o tempo de infecção para avaliar a intensidade do desencadeamento inflamatório. Em A animais com infecção durante 8 meses apresentaram maior área de complexo imune nas membranas basais (MA) do que na região mesangial (MO) e os tratados com o mesmo tempo experimental. Em B demonstra o acompanhamento desses depósitos nos camundongos infectados (grupo III) durante 4, 6 e 8 meses. Os gráficos indicam os valores centrais, e o teste de Kruskal-Wallis foi utilizado para verificar a variabilidade dos dados, encontrando um  $p$  significativo com valor  $< 0,05$ .

## 7 DISCUSSÃO

A elucidação dos mecanismos de progressão da esquistossomose, o agravamento das alterações patológicas e a patogênese das lesões renais requerem um modelo experimental que mimetize o desenvolvimento da doença humana e permita o seu estudo. Já em meados do século XX, pesquisadores que investigaram vários modelos experimentais de mamíferos sobre a susceptibilidade à esquistossomose mansoni, encontraram diversas vantagens dos camundongos sobre outros modelos, por desenvolverem os vermes adultos maduros sexualmente e eliminarem ovos viáveis nas fezes (MOORE *et. al.* 1949 e STIREWALT *et. al.* 1951). Além de serem hospedeiros de baixo custo, fácil manuseio e manutenção em laboratório, os camundongos acabaram se tornando os hospedeiros definitivos mais utilizados em estudos experimentais (CAPRON *et. al.*, 1982).

A forma grave de glomerulopatia, como a glomerulonefrite difusa, normalmente observada em pacientes esquistossomóticos, não é reproduzida na maioria dos modelos experimentais. O modelo murino tem sido cada vez mais utilizado como modelo para esquistossomose mansoni. Mas, poucas referências são encontradas sobre o uso desses animais na reprodução da glomerulopatia esquistossomótica, porque apesar de desenvolverem alterações (observadas também neste trabalho), não chegam a manifestar as características da forma grave, o que restringe o estudo sobre esse assunto com este modelo.

Em estudo sobre nefropatia esquistossomótica experimental é importante acompanhar o desenvolvimento progressivo das alterações resultantes da infecção parasitária. Assim, (Houba, 1979, *apud* KIBUKAMUSOKE, 1984) já reforçava a importância de infecções prolongadas, ou reinfecções, como pré-requisitos para a produção de lesões glomerulares. Para isso, no presente trabalho foi mantido um período longo de acompanhamento experimental, oito meses, iniciando com a primeira infecção dos camundongos, seguida de mais cinco reinfecções a cada quinze dias, induzindo as lesões renais. Como já era esperado, durante esse período, ocorreu mortalidade espontânea de camundongos experimentais (28,6%) devido à diferença de resistência orgânica desses animais à infecção pelo *S. mansoni*.

A similaridade genética entre os camundongos (BALB/c isogênico) não elimina completamente certas diferenças de resistência física individual, mas possibilita que sejam utilizados como modelos experimentais, sem terem de ser controles de si próprios (situações de biópsias, avaliando o mesmo animal). Então, levando-se em conta as condições

laboratoriais e a resistência orgânica de cada animal com cargas genéticas pouco diferenciadas, podem proporcionar maior ou menor resistência ao verme.

Muitos autores indicam que quando a mortalidade ocorre até um percentual de 30% (estudos sobre a esquistossomose experimental apontam essa perda de seguimento sobre camundongos infectados, WYNN *et. al.*, 1998; COUTO *et. al.*, 2007) do total de animais, é considerada esperada, e conhecida como espontânea. Neste estudo, foi observado durante o acompanhamento do experimento uma taxa de mortalidade entre os camundongos experimentais infectados de 28,6%, portanto dentro da faixa “esperada”, sendo uma perda de seguimento aceitável para mortalidade espontânea e que não interfere significativamente nos resultados.

Pellegrino e Katz (1968) descrevem em seu trabalho experimental que a taxa de mortalidade ocorre em torno de 10-20% até o 50º dia, ou seja, em menos de dois meses de infecção. Depois desse período há um grande aumento na mortalidade por causa das alterações teciduais provocadas pelos ovos do verme. Neste estudo, foi observado esse percentual inicial de mortalidade com três meses de infecção e o aumento da mortalidade espontânea atingiu sua maior taxa no mês seguinte (4º mês), equivalente ao período das alterações teciduais correspondentes à fase aguda da esquistossomose mansônica.

É difícil determinar o período e caracterizar a fase aguda e crônica da esquistossomose em camundongos, mas alguns trabalhos consideram a fase aguda da infecção até a 6ª semana (WYNN *et. al.*, 1998) e a crônica a partir da 12ª (FALLON, 2000; PEARCE; MACDONALD, 2002). O período diferente do que foi encontrado no experimento, deve ser considerado pelas condições de reinfecção e por via transcutânea não terem feito parte da metodologia dos trabalhos citados anteriormente. Mas, dado as reinfecções terem ocorrido ao longo dos quatro meses desde a primeira infecção, provocaram um prolongamento do período das reações às alterações teciduais causadas pelos ovos do parasita, que levam a um grande aumento na mortalidade nesse período, ainda mais porque ocorreu reinfecção até dois meses após o experimento ter sido iniciado.

A mortalidade espontânea pode ainda ser diferente quanto ao gênero do animal, manifestando maior resistência à infecção pelo *S. mansoni* em machos ou em fêmeas. Vários trabalhos, utilizando modelos experimentais para o estudo da esquistossomose, indicam uma maior mortalidade em fêmeas, como o de Souza e colaboradores (1992) que testou o modelo experimental de rato (*Nectomys squamipes*) e outros, como no estudo desenvolvido por Eloi-Santos e colaboradores (1992) que indicou uma maior mortalidade de fêmeas infectadas com *S. mansoni* em comparação com machos em modelo murino.

No trabalho de Barros (2008) que utilizou camundongos para o modelo de esquistossomose murina ao avaliar a influência do fator nutricional sobre a doença, encontrou um percentual de mortalidade espontânea bem próxima ao deste trabalho, mas os camundongos eram apenas machos, não analisando a mortalidade por gênero. Os achados deste experimento se referem a uma taxa de mortalidade espontânea muito maior em machos do que em fêmeas, o que difere dos trabalhos citados anteriormente. Mas, naqueles trabalhos os modelos experimentais utilizados são diferentes ou com linhagens distintas do mesmo modelo, tendo em vista as grandes variações de resposta à infecção esquistossomótica de um animal para outro, gêneros distintos podem ser mais sensíveis à esquistossomose de acordo com sua linhagem.

A análise meramente descritiva do quadro observacional das alterações nas vísceras (estrutura macroscópica), durante a eutanásia, identificou o aumento anormal ou hipertrofia do fígado e do baço (hepatoesplenomegalia) nos camundongos reinfectedados e não submetidos ao tratamento. A forma hepatoesplênica caracterizada pela fibrose hepática periportal consiste no estado grave da esquistossomose, que macroscopicamente, é observada como um processo de fibrose estelar generalizada, com graus variáveis de neoformação e dilatação vascular no tecido hepático (BOGLIOLO, 1957).

Souza (2011) descreve a hepatomegalia em vários aspectos do campo visual (baseado em observação) no qual afirma que o fígado com hepatomegalia é palpável, apresenta hipertrofia predominante do lobo esquerdo, de consistência endurecida e de superfície irregular, semelhante ao que foi encontrado nas descrições da observação macroscópica do fígado em camundongos Balb/c experimentais reinfectedados. No fígado, o processo de cicatrização observado nos animais tratados, é sequência da reação inflamatória granulomatosa aguda que ocorreu ao redor dos ovos do parasita aprisionados nos pequenos vasos hepáticos. A extensa fibrose dos espaços periportais também faz parte deste processo de cicatrização e é o substrato anatômico da doença, que está presente no quadro de hipertensão portal, umas das formas letais por causa das suas inúmeras consequências (SALES *et. al.*, 2009; COUTO *et. al.*, 2008; SOARES *et. al.*, 2007; SILVA *et. al.*, 2012).

O aumento do tamanho do baço, que ocorre concomitantemente ao aumento do fígado, é ocasionado em parte pela congestão venosa do ramo esplênico e também pela hiperplasia das células do sistema macrofágico linfocitário, com diferenciação e produção de anticorpos para defesa do organismo contra os antígenos do verme que chegam à corrente sanguínea geral (MAGALHÃES – FILHO; COUTINHO, 1961; REY, 2001). Atta e colaboradores (1981), em análise histopatológica do baço e do fígado de camundongos infectados com *S.*

*mansoni*, observou no baço hiperplasia intensa do tecido e congestão moderada ou intensa dos seios venosos esplênicos, indicando que esses processos participam da instalação da esplenomegalia. No fígado as alterações consistiram de hiperplasia e infiltrações celulares, além de áreas necrosadas e granulomas.

Foi observado também a presença de líquido na cavidade abdominal de alguns camundongos reinfectedos, o que é conhecido como ascite, característica da fase aguda da doença, similar ao observado no trabalho sobre acompanhamento do ciclo de vida do *S. mansoni* de Ariadna e colaboradores (2001). Já a macroscopia do rim apresentou-se normal em alguns animais reinfectedos, em outros manifestou uma palidez do órgão causada provavelmente por uma tumefação celular, por conta do processo inflamatório implantado que comprimia os capilares, ou simplesmente por causa de alguma hemorragia.

Uma das formas mais utilizadas para detectar infecção é através do exame para diagnóstico parasitológico de fezes, encontrando os ovos com esporão lateral do *S. mansoni*. O método de Kato Katz tem sido o mais utilizado, com vantagens de baixo custo, esse método quantitativo é de simples e rápido processamento, mas principalmente é muito utilizado em decorrência de sua maior sensibilidade em comparação com outros testes (CHAVES *et. al.*, 1979). Assim, baseado neste método, mas sem a utilização do formato quantitativo para comprovar a infecção esquistossomótica nos camundongos experimentais submetidos a infecções artificiais por via transcutânea, foi obtido 100% de positividade com a visualização dos ovos do *Schistosoma* nas fezes de todos os animais experimentais.

Os resultados corroboram aqueles obtidos em outros trabalhos que demonstram a grande sensibilidade do teste de Kato Katz e indicam que todos os camundongos testados partiram de uma infecção esquistossomótica. A infecção pode apresentar graus de intensidade variável, dependendo da carga parasitária, por isso os animais foram submetidos a reinfecções para aumentar a probabilidade de indução de infecção mais intensa, com consequência de hepatoesplenomegalia e repercussão em acometimento renal com glomerulopatia.

A quantidade de ovos é importante para avaliar a intensidade da infecção, e pode ser quantificada normalmente através das fezes ou da digestão hepática, contando a quantidade de ovos por grama de fígado, o que foi realizado no presente trabalho. É importante observar que mesmo na esquistossomose crônica, apresentando a forma grave de hepatoesplenomegalia, existe apenas um mínimo de comprometimento funcional hepático. Mas, devido à hipertensão portal, a hemorragia digestiva alta decorrente da ruptura de varizes esofagogástricas, podendo ser esta uma das causas da palidez do rim observada macroscopicamente em alguns dos camundongos reinfectedos, constitui-se em séria complicação e representa a causa usual de

óbitos nesta fase (MACHADO *et. al.*, 2002). Inicialmente na hepatomegalia, o fígado apresenta aumento no volume e, com o efeito cumulativo das lesões granulomatosas, as alterações hepáticas se tornam mais graves (MELLO; COELHO, 2002).

Estudos das dimensões hepáticas na forma hepatoesplênica da esquistossomose humana demonstram que o fígado tem peso maior que 1,5 kg em mais de 50% dos indivíduos que possuem este estado da doença. O fígado é o maior órgão visceral do corpo, pesando, no estado normal, aproximadamente 1,3 kg no adulto (POTH, 2004). Além do aumento significativo do peso do fígado, provocado pela esquistossomose em pelo menos metade dos indivíduos hepatoesplênicos, ocorre a assimetria dos lobos hepáticos, com aumento do lobo esquerdo e redução do lobo direito, demonstrado em 81% dos casos (MACHADO *et. al.*, 2002).

Lescano e colaboradores (2004), em seu trabalho experimental utilizando modelo murino, ao testar os efeitos antiparasitários do artemether, droga usada no tratamento da malária, contra a esquistossomose mansônica experimental observou uma diminuição significativa nos pesos hepáticos e esplênicos entre os animais tratados em comparação aos grupos infectados, em diferentes períodos de tempo de desenvolvimento do parasita no hospedeiro.

Essas observações sobre o peso do fígado, tanto em humanos como em modelo experimental utilizando camundongos Balb/c, identificaram um aumento do peso hepático significativo com a infecção esquistossomótica, assim como a redução dos valores de peso obtidas após o tratamento antiparasitário. Resultados muito similares foram demonstrados neste trabalho, o qual comparou o peso hepático entre os grupos de camundongos reinfetados, reinfetados e tratados e o controle intacto. Todos os animais reinfetados apresentaram considerável aumento do peso do fígado e aqueles animais que foram submetidos ao tratamento expressaram redução significativa dessa variável, aproximando o peso hepático dos tratados ao de um camundongo normal, que não sofreu nenhum tipo de infecção, encontrado nos animais do grupo controle intacto.

A infecção esquistossomótica, quando presente, pode ser identificada pela presença de ovos nas fezes ou de vermes nas veias mesentéricas intestinais, em situações de biópsias, necrópsias ou ainda por perfusão do sistema porta e do fígado, para retirada de vermes que tenham permanecido no sistema porta-hepático. A verificação da presença de vermes nas veias mesentéricas foi realizada para avaliar os efeitos do tratamento antiparasitário utilizando Praziquantel, cujos resultados de positividade e negatividade de vermes foram utilizados para calcular o percentual de cura do quimioterápico nos camundongos. Os 96,4% de cura

encontrados ao avaliar os camundongos tratados, reflexo do resultado de apenas um camundongo submetido ao tratamento que apresentou positividade para verme, demonstra a eficácia do praziquantel no tratamento da esquistossomose mansônica tanto em humanos (já evidenciada em outros trabalhos e nos centros médicos, segundo Ministério da Saúde, 2008) quanto em modelo experimental.

A observação de vermes nas veias mesentéricas é eficiente para detectar infecção ou ausência de infecção ativa causando alterações esquistossomóticas típicas, mesmo que possam ser encontrados vermes no sistema porta-hepático. O trabalho de Zanotti e colaboradores (1982), um estudo sobre a localização de vermes de *S. mansoni* no plexo porta, fígado e veias mesentéricas, acompanhando desde a primeira até a oitava semana de infecção em modelo experimental murino, identificou em infecções bissexuais o comportamento migratório dos vermes.

O deslocamento desses helmintos visa ao acasalamento e ocorre principalmente no interior dos vasos mesentéricos, a partir da sexta semana, coincidindo com o aparecimento dos primeiros ovos no intestino. Os vermes, então, migram dos vasos intra-hepáticos para os vasos mesentéricos, usando a veia porta apenas como “ponte de passagem”, e esta migração é feita com os vermes acasalados, chegando à oitava semana de infecção com quase 70% do total de vermes localizados nas veias mesentéricas. Aqueles que ainda permanecem no sistema porta-hepático são normalmente vermes jovens que ainda não amadureceram sexualmente e, portanto, não provocam infecção ativa causando processos inflamatórios provenientes de reações aos ovos do parasita, que neste estado ainda não podem ser produzidos (ZANOTTI *et. al.*, 1982). Com o passar do tempo de infecção esse percentual de vermes nas veias mesentéricas aumenta muito mais, e a quantidade de vermes encontrados no sistema porta-hepático se torna muito pequena, não apresentando significância sobre a análise da eficiência do tratamento na detecção de infecção ativa, em infecções esquistossomóticas bissexuais prolongadas.

Ariadna e colaboradores (2001) verificaram a presença de vermes de *S. mansoni* na sua fase adulta no sangue das veias do sistema porta-hepático de um dos camundongos analisados em seu estudo de acompanhamento do ciclo de vida deste verme. Assim, podem ocorrer vermes adultos no plexo porta e no fígado, mas o percentual é pequeno em situações de infecções bissexuais, sendo irrelevantes na promoção de erros em estudos com análises de vermes restritas às veias mesentéricas.

A cura da esquistossomose mansoni com a utilização do praziquantel possui índices que variam de 60% a 90% (ROSS *et. al.*, 2002; TAVARES, 2009; QUINTAS *et. al.*, 1993;

HUGGINS, 1982), e está ligada à efetiva redução ou eliminação dos vermes, redução da carga parasitária e da produção de ovos pelo *S. mansoni*. Alguns estudos ainda sugerem que o tratamento com o praziquantel é eficiente na redução da morbidade em pacientes com fibrose hepática grave (MARTINS-LEITE *et. al.*, 2008; VITORINO *et. al.*, 2012).

A grande importância que envolve o tratamento da parasitose consiste em curar a doença, diminuindo todos os aspectos estimuladores das reações inflamatórias parasitárias. A redução da carga parasitária no hospedeiro é um dos aspectos que impedem a progressão para as formas graves, assim como a minimização da produção e a eliminação de ovos do helminto consiste numa prevenção primária contra a transmissão da doença (BRASIL, CVE 2007). Além do tratamento específico, algumas particularidades devem ser consideradas na terapêutica dos diferentes estágios, formas e consequências graves da esquistossomose mansoni (VITORINO *et. al.*, 2012).

Os pacientes e os animais experimentais devem ser acompanhados durante tratamento porque existem fatores que exercem influência sobre o desenvolvimento da forma grave na patologia hepática esquistossomótica crônica, como a fibrose periportal. Dentre os fatores, a desnutrição possui grande importância e, segundo o trabalho de Barros (2008) que avalia camundongos infectados com *S. mansoni* e desnutridos, seria a causa de reações imunológicas deficientes, estando relacionada com a inibição do desenvolvimento da fibrose periportal. A má nutrição modifica os mecanismos de defesa do organismo, comprometendo os órgãos hematopoiéticos e linfoides responsáveis pela produção, manutenção e função das células que medeiam esses processos, considerada então como determinante crítico da resposta imune (CHANDRA, 1991; MEIRA, 1995). Esse e outros fatores devem ser considerados na avaliação da eficiência do quimioterápico, mesmo em modelos experimentais, nos quais se pode ter mais controle sobre tais variáveis, tentando eliminar ao máximo as variações das reações nos diferentes organismos.

No trabalho de Chaiworaporn e colaboradores (2005), ao comparar em dose curativa e subcurativa de praziquantel em camundongos infectados com *S. mansoni*, nenhum verme foi encontrado nos camundongos submetidos ao tratamento com a dose curativa, e poucos vermes foram encontrados em camundongos que receberam dosagem subcurativa. A dose curativa utilizada foi de 600 mg/kg, e a subcurativa foi de 300 mg/kg, observando 100% de redução dos vermes nas veias mesentéricas e nos vasos porta-hepáticos nos camundongos com a dose curativa, e uma faixa de 90 a 99% de redução dos vermes com a dose subcurativa.

Avaliando os resultados do presente trabalho, em que se observou 96,4% de redução dos vermes nas veias mesentéricas em todos os camundongos submetidos ao tratamento com

dose única de 400 mg/kg de praziquantel, foi obtido índice de cura dentro do esperado e semelhante ao trabalho citado anteriormente, apesar de corresponder a uma dosagem um pouco maior do que a considerada dose subcurativa. Conforme outros estudos, o efeito do praziquantel ocorreu de forma similar em camundongos tratados com dose única de 200-300 mg/kg (SHAW e ERASMUS, 1988; SHAW, 1990; FALLON *et. al.*, 1996).

Estudos anteriores demonstraram que os danos causados pelo praziquantel sobre os vermes adultos ocorrem rapidamente, e além de afetar o tegumento do verme, levam também à paralisia e deslocando desses vermes adultos a partir da veia mesentérica para o fígado, onde são destruídos pelo sistema fagocitário. Uma consequência desta lesão é a exposição dos antígenos tegumentares do *S. mansoni*, os quais se tornam acessíveis ao anticorpo específico do hospedeiro dentro de 1 hora (FALLON *et. al.*, 1995).

No tratamento de camundongos infectados com *S. mansoni*, essas doses subcurativas são eficientes na redução dos resultados parasitológicos e patológicos. Outro resultado parasitológico é a carga parasitária, cuja redução pode ser observada através da administração do quimioterápico. A oviposição e o ovo do parasita também são afetados após tratamento com praziquantel. O trabalho de Botros e colaboradores (1989) demonstrou que o tratamento de camundongos infectados pelo *S. mansoni*, com 5 semanas de infecção, utilizando dose única de 333 mg/kg de praziquantel, reduziu significativamente o número de ovos nas vísceras.

No estudo de que trata este trabalho também foi verificada grande redução do número de ovos presentes no tecido hepático, correspondente à carga parasitária, em camundongos Balb/c tratados com dose única de 400 mg/kg de praziquantel. Foi observado ainda que o tempo de tratamento influenciou na carga parasitária, pois animais com 4 meses de tratamento apresentaram número de ovos por grama de tecido hepático quantitativamente menor do que os animais com 2 meses de tratamento. Camundongos apenas reinfetados demonstraram uma quantidade de ovos no fígado cada vez maior, de acordo com o aumento do tempo de infecção, em análise da carga parasitária com 4, 6 e 8 meses de infecção. Logo, as maiores diferenças nessa variável foram então encontradas no período mais prolongado de tempo de infecção (com 8 meses).

A ação do praziquantel sobre os ovos *in vivo* consiste em estimular sua eclosão e, logo em seguida, ocorre a morte do miracídio. Mas, o ovo imaturo não fica danificado e desenvolve-se em um miracídio que depois degenera num ovo granuloso e calcificado (MATSUDA *et. al.*, 1983; GIBODA *et. al.*, 1994). Chaiworaporn e colaboradores (2005) também observaram ovos não viáveis no fígado de camundongos com uma semana de

tratamento, indicando que uma dose de 300 mg/kg de praziquantel é suficiente para danificar o ovo maduro. Isso é importante para o tratamento da esquistossomose porque o ovo é uma das principais causas da patogênese da esquistossomose.

A resistência parasitária observada, neste trabalho, nos camundongos após tratamento com dosagem de 400 mg/kg demonstrou redução gradual do número de ovos depositados no tecido hepático e desaparecimento lento dos vermes adultos, com conseqüente desaparecimento progressivo do seu antígeno associado, observados na imunofluorescência e na microscopia eletrônica de transmissão. Doses mais altas de anti-helmíntico devem ser cuidadosamente consideradas, especialmente para evitar as reações de resistência a drogas, que algumas vezes ocorrem, demonstrando uma eficiência reduzida do medicamento em relação, a sua real capacidade antiparasitária (FALLON; DOENHOEFF, 1994). Segundo Atta e colaboradores (1981) a variabilidade na carga parasitária pode estar relacionada a diferenças na constituição genética dos hospedeiros, tanto de humanos, quanto dos animais, assim como pode ser explicada por populações de *S. mansoni* com diferentes capacidades defensivas às reações do hospedeiro.

Uma vez que uma grande variedade de doenças parasitárias que cronicamente estimulam o hospedeiro tem sido demonstrado induzirem glomerulonefrite, dano renal semelhante é esperado desenvolver em infestações esquistossomóticas clínicas e experimentais. Isso se deve pela presença de circulação colateral porto-sistêmica em infecções com o *S. mansoni*, o que permite o desvio dos complexos imunes a partir do fígado e principalmente das células de Kupffer que os retém. Assim esses complexos irão atingir o rim e outros órgãos através da circulação sistêmica (ANDRADE, ROCHA, 1989; TITO *et. al.*, 1974; DEELDER *et. al.*, 1980).

Na análise histopatológica são observadas as alterações teciduais induzidas durante o desenvolvimento da infecção esquistossomótica no hospedeiro. Sobh e colaboradores (1987) encontraram grande variabilidade das naturezas histopatológicas das lesões glomerulares em pacientes com infestação ativa por *S. mansoni*. Vários tipos histológicos podem ser encontrados em exame de tecido renal, observando glomérulos corados com hematoxilina/eosina (HE) e ácido periódico Schiff (PAS), ao analisar a forma clínica de pacientes com esquistossomose grave.

Muitas mudanças glomerulares são observadas em microscopia óptica e consistem essencialmente em proliferação de células endoteliais e mesangiais. Em modelo experimental de camundongos, por exemplo, muitos glomérulos são usualmente afetados com extensiva variação, em que alguns se apresentam praticamente normais, e vários estudos identificam

alterações, mas apontam para a ausência de lesões renais graves (envolvendo esclerose ou lesões difusas e segmentares em tufo de glomérulos) nesses animais. A lesão da fase inicial da glomerulopatia envolve essencialmente o mesângio e é a forma encontrada em muitos modelos experimentais, como o murino. Esta área mostra expansão de material amorfo e fibrilar, detectado pela coloração de PAS. Em seguida, as células mesangiais apresentam hipertrofia e hiperplasia evidentes (KIBUKAMUSOKE, 1984).

Neste trabalho, a análise em microscopia óptica da estrutura histopatológica renal de camundongos encontrou pequenas alterações (proliferação e expansão mesangial, distorções e espessamento das membranas) com as 3 colorações utilizadas na técnica. Na coloração com HE, se observou na maioria dos glomérulos renais de 80% dos camundongos reinfetados e não submetidos a tratamento, proliferação celular mesangial aparente, seguida de consequente aumento do glomérulo. Essas alterações se apresentaram cada vez mais evidentes à medida que foram analisados cortes renais de camundongos com maior tempo de infecção. Por outro lado, todos os animais tratados apresentaram glomérulos com estrutura aparentemente normal segundo a observação e comparação com a histologia renal de animais controles.

Com a coloração de PAS, foi possível observar que a estrutura da membrana basal glomerular dos camundongos reinfetados e não tratados estava alterada, apresentando espessamento e grandes distorções nas membranas. Essas alterações se mostraram progressivas com o aumento do tempo de infecção. Animais com apenas 2 meses após tratamento ainda apresentaram alteração na estrutura da membrana basal, como o espessamento e distorções, mas aqueles camundongos com 4 meses após tratamento demonstraram membranas basais com estrutura aparentemente normal e similar à observada no grupo controle. Esse resultado indica que ocorre recuperação glomerular progressiva com utilização do tratamento, ou seja, ocorre reestruturação dos componentes glomerulares.

A coloração com PIFG (picrossírius) demonstrou não haver fibrose na estrutura glomerular de camundongos reinfetados e não tratados, apenas apresentando depósitos de colágeno em regiões próximas a glomérulos e vasos corticais. Outros trabalhos na literatura também não encontraram fibrose glomerular em doença renal esquistossomótica utilizando o modelo experimental murino. Andrade e Susin (1974), estudando a doença glomerular esquistossomótica em camundongos, encontraram em microscopia óptica apenas pequenas mudanças. Essas análises histológicas foram apenas qualitativas, por observação da lesão e de como esta se processa e apresenta na estrutura glomerular de rins de camundongos esquistossomóticos, mas não foram feitas análises quantitativas comprovando, por exemplo, o aumento do número de células mesangiais.

O aprimoramento dos estudos sobre a deposição dos complexos imunes em rins de hospedeiros com ligação parcial da veia porta foi realizado em animais experimentais, permitindo estudar a patogênese da doença. O efeito da ligação da veia porta com a circulação é desviar os complexos imunes de circulação flutuante portal e extraí-los do sistema retículo endotelial do fígado para a circulação sistêmica geral. Estes depósitos imunes acabam sendo retidos nos rins e são largamente encontrados, muitas vezes, restritos à área mesangial. Os trabalhos de Kelsoe e Weller (1978), Van Marck e colaboradores (1977) foram capazes de detectar CAA em biópsias de rins de hamsters e ratos infectados com *S. mansoni*. Esses antígenos na corrente sistêmica são acoplados a anticorpos específicos juntamente com os complementos. No trabalho de Ghanem e colaboradores (1987) foi observada síntese exarcebada de IgG em pacientes esquistossomóticos crônicos, e essa síntese estaria associada ao desenvolvimento da forma de fibrose periportal. Com efeito, depósitos de IgG já foram observados nos espaços de Disse, no fígado de pacientes com a forma de fibrose de Symmers avançada (GRIMAUD; BOROJEVIC; BRADRAWY, 1977).

Magalhães Filho e colaboradores (1965) já tinham verificado por técnicas de imunofluorescência que os antígenos do *S. mansoni* encontravam-se no endotélio dos vasos portais e nos neutrófilos das infiltrações celulares do espaço porta de camundongos infectados na fase pré-patente da infecção. Bastos (1979), investigando sobre a especificidade das imunoglobulinas que se apresentam aumentadas durante a infecção experimental de camundongos com *S. mansoni*, observou que anticorpos para antígenos do parasita apareciam inicialmente, mas de forma discreta.

Silva e colaboradores (2004) verificaram que, em camundongos BALB/c infectados com *S. mansoni*, a produção de anticorpos é predominantemente do tipo IgG para os pontos de tempo de infecção analisados (20 e 40 semanas). Lesões renais associadas com imunocomplexos tem sido demonstradas em camundongos infectados com 80 a 100 cercárias de *Schistosoma mansoni* no período de 2 e 3 meses de infecção (WHO, 1974), assim como a participação desses imunocomplexos como promotores das lesões renais de pacientes esquistossomóticos (ANDRADE, 1977). Para estas análises, os ensaios imunológicos são necessários e aplicados em algumas situações, sendo mais empregados na fase crônica da doença (são positivos a partir do 25º dia de infecção).

A imunofluorescência permite localizar nos tecidos os antígenos e as imunoglobulinas que participam da formação do complexo imune, promotores da doença renal parasitária. Como possibilita acompanhar a localização desses componentes imunológicos nos tecidos

renais de camundongos ao longo do período de infecção e do tratamento ao qual foram submetidos, permite testar o medicamento quanto aos seus efeitos sobre esses componentes.

A imunofluorescência direta marcando IgG demonstrou depósitos glomerulares dessas imunoglobulinas em animais reinfetados com 4, 6 e 8 meses de infecção, apresentando progressivamente mais depósitos com o aumento do tempo de infecção. Animais tratados revelaram pequena fluorescência, o que indica poucos depósitos glomerulares após a aplicação da quimioterapia. A imunofluorescência indireta utilizando anti-IgG humana com marcação de FITC acoplada detectou depósitos de antígeno de Nash em glomérulos renais de camundongos reinfetados e não tratados com 6 e 8 meses de infecção. Esses depósitos foram demonstrados apenas nos períodos de maior tempo de infecção, indicando que a glomerulopatia em modelo experimental murino possui desenvolvimento lento e gradual. Animais tratados não apresentaram fluorescência de depósitos desses antígenos nos glomérulos, assemelhando-se aos animais não marcados do grupo controle.

A presença de pequenos depósitos de IgG em glomérulos de animais tratados pode ocorrer porque os anticorpos circulantes permanecem após a cura da doença, por isso que a positividade em alguns exames imunológicos não indica necessariamente infecção ativa pelo *S. mansoni* (VITORINO *et. al.*, 2012). Uma composição de IgM, IgA e complemento em depósitos glomerulares foi relatada na esquistossomose mansoni em camundongos infectados por Van Marck e colaboradores em 1977. Outros autores descreveram depósitos predominantes de IgG, IgM e complemento (ANDRADE & SUSIN, 1974; MAHMOUD & WOODRUFF, 1975; NATALI & CIOLI, 1976). Andrade e Susin (1974) encontraram depósitos de IgG no mesângio e ao longo da parede capilar de glomérulos de camundongos com infecção esquistossomótica. Através de microscopia eletrônica, localizaram também depósitos eletrodensos irregulares, principalmente nas áreas mesangiais e sobre o epitélio da membrana basal glomerular dos camundongos infectados.

Uma forte correlação é encontrada entre a ocorrência dos depósitos glomerulares e a presença de complexos imunes circulantes. Outra associação na infecção esquistossomótica ocorre entre a gravidade da lesão glomerular e o grau e duração de fibrose hepática portal (CAVALLO *et al.*, 1974). Assim, apesar da evidência de imunocomplexos circulantes contendo antígenos do SM, a presença de lesões hepáticas com hipertensão portal é um pré-requisito para o desenvolvimento de lesões glomerulares nessa infecção, em que a esquistossomose hepatoesplênica pode representar um modelo de lesões glomerulares relacionados à lesão hepática (DIGEON *et. al.*, 1977).

O mesângio é a área mais alterada na glomerulopatia esquistossomótica, cujas alterações são descritas como um espessamento fibrilar, com PAS-positivo, e aumento da celularidade. Segundo Brito (1973) em casos muito precoces de envolvimento renal e sem manifestações clínicas da doença renal, a proliferação celular mesangial foi tão notável que indicava o diagnóstico de glomerulonefrite mesangial. Além disso, a microscopia eletrônica das lesões glomerulares revelam depósitos eletrodensos dentro do mesângio e ao longo do lado endotelial da membrana basal, o que leva à conclusão de que o dano renal da esquistossomose é de origem imunológica (ANDRADE & ROCHA, 1979).

Nos ratos e camundongos, em contraste com a presença de depósitos identificados por imunofluorescência, as alterações glomerulares observadas são moderadas e limitadas, se tornando difícil a detecção de lesões inflamatórias glomerulares por microscopia óptica. Entretanto, a microscopia eletrônica e a imunofluorescência mostram a presença de depósitos eletrodensos e de depósitos de antígenos e imunoglobulinas específicas, confirmando relatos anteriores (ANDRADE & MARCK, 1984; ANDRADE & SUSIN, 1974; NATALI & CIOLI, 1976). A microscopia eletrônica é a técnica ideal para estudar as fases iniciais das lesões renais, quando apenas pequenas alterações ocorrem, porque permite a análise dos componentes em ultraestrutura (CAVALLO *et. al.*, 1974). Estudos com microscopia eletrônica (CAVALLO *et. al.*, 1974; ANDRADE & SUSIN, 1974; BARBOSA, 1970; ROCHA *et. al.*, 1976; SILVA *et. al.*, 1970; BRITO *et. al.*, 1969) demonstraram a presença de depósitos eletrodensos, tanto na membrana basal glomerular, como perto das células mesangiais e na área mesangial.

Inicialmente, apenas parte dos glomérulos são envolvidos, mas posteriormente, um maior número de glomérulos são afetados. Com a microscopia eletrônica de transmissão, neste trabalho, o tecido renal de camundongos exibiu expansão da matriz mesangial e proliferação das células mesangiais, além de serem observados depósitos eletrodensos localizados na área mesangial de alguns glomérulos dos camundongos reinfetados e sem tratamento. Essa técnica revelou também um padrão homogêneo de lesões, caracterizadas principalmente pelos depósitos de complexos imunes localizados na membrana basal glomerular, sob as células epiteliais, endoteliais e no mesângio.

Com presença ou não de depósitos, as membranas glomerulares apresentaram diversas distorções e espessamento, sendo observados processos de fusão podal ao longo da superfície dessas membranas. Essas alterações foram observadas em 90% dos camundongos reinfetados que não receberam tratamento, enquanto que animais com 2 meses de tratamento apresentaram glomérulos renais sem alteração e 30% dos animais com 4 meses de tratamento

apresentaram pequenas alterações, alguns desses com pequenos depósitos mesangiais e distorções na membrana basal. Nenhuma destas lesões foi observada nos animais controles. A distribuição dos depósitos sugere que complexos de antígeno-anticorpo formados ficaram retidos nas paredes da membrana basal e dos capilares glomerulares, que funcionam como filtro renal.

Estas lesões foram observadas no trabalho experimental com macacos, no qual Brito e colaboradores (1971) estudaram lesões renais nesses animais infectados com *S. mansoni*. Este seria o mecanismo de lesão renal em doenças infecciosas, onde complexos imunes circulantes, formados nas áreas em que se encontram antígenos em excesso, tornam-se, em determinadas circunstâncias, disponíveis em grande quantidade para o rim, produzindo aí a doença glomerular. A deposição de complexos imunes é intensificada pelo desvio porto-sistêmico, secundário à hipertensão portal (VAN MARCK *et al.*, 1979; SANTOS *et al.*, 2011).

Os complexos imunes induzem a ligeira hipertrofia e hiperplasia das células mesangiais, este estado é considerado como uma glomerulite inespecífica reativa que ocorre ou é geralmente observada em modelos experimentais. Se é mantida uma proporção de complexo imune retido no glomérulo, a lesão em modelo experimental tem uma semelhança estreita com a lesão glomerular humana, encontrada em doentes sem evidência clínica de doença renal. É possível que outros fatores, além da disponibilidade de complexos imunes, possam estar envolvidos na prevenção da reversão da lesão (BRITO *et al.*, 1971).

Como ocorre com os granulomas no fígado, em que o resultado de um processo longo de acumulação das lesões pode agravar o estado da doença que se mostra progressiva, o acúmulo de complexo imune também pode ser indicativo desse agravamento do quadro de glomerulopatia esquistossomótica, que segundo muitos autores, inclusive já citados, também se mostra progressiva. O estudo quantitativo da área de depósito desses complexos imunes demonstra o acúmulo de complexo imune glomerular, tanto nas áreas da membrana basal, como na área mesangial, analisadas separadamente, as quais são bastante afetadas na fase inicial da doença glomerular parasitária. A morfometria de área de depósito de complexo imune, utilizando as imagens de microscopia eletrônica de transmissão, proporcionou uma forma alternativa, mas coerente e bem precisa, para a análise da área de agressão glomerular, dos processos inflamatórios e do desencadeamento da doença renal.

Neste trabalho, a morfometria de área demonstrou um crescente acúmulo de área de deposição dos complexos imunes conforme o aumento do tempo de infecção. Animais com 2 meses de tratamento não apresentaram depósitos eletrodensos, impedindo sua quantificação.

Camundongos com 4 meses de tratamento apresentaram pequenos depósitos mesangiais e em apenas um animal foi encontrado um depósito na membrana basal glomerular. Inicialmente, nos camundongos com 4 e 6 meses de infecção, a área mais atingida, contendo a maior superfície visualizada de depósitos foi a matriz mesangial. Mas, com 8 meses de infecção, os depósitos estavam mais concentrados na membrana basal.

O tratamento específico da esquistossomose não mostrou, até o momento, capacidade de alterar o curso da glomerulopatia esquistossomótica clínica. Vários achados indicam que, uma vez deflagrado o quadro clínico, a nefropatia já está avançada, irreversível, em estágio no qual os mecanismos não imunológicos de progressão da doença renal já estão ativados e independem da presença ou da ausência do parasita (MARTINELLI & ROCHA, 1996). É possível que o tratamento antiparasitário eficiente e precoce, em pacientes ainda sem manifestações clínicas de doença renal, possa alterar ou reverter o desenvolvimento ou a progressão do envolvimento glomerular incipiente (MARTINELLI & ROCHA, 1989).

Os resultados deste estudo demonstram que as alterações macroscópicas, mas principalmente as alterações microscópicas e ultraestruturais, a quantidade de ovos depositados em tecido hepático e, tanto as dimensões por análise observacional quanto o peso do fígado, assim como a área de depósitos de complexos imunes glomerulares, foram significativamente reduzidos após o tratamento. No entanto, a resistência ao tratamento por parasitas, investigada após 2 e 4 meses de tratamento, cuja dose pode ter interferido na eficácia absoluta da quimioterapia, apresentou desaparecimento lento de vermes adultos e do seu antígeno associado. Foi possível observar neste trabalho que em modelo experimental murino ocorreu reversão do quadro geral de lesão glomerular provocada pela esquistossomose na maioria dos camundongos estudados. Isso indica e estimula análises e estudos na forma clínica que possivelmente seguirão esses resultados.

Entretanto, ressalta-se que resultados às vezes conflitantes publicados na literatura sobre o tema ocorrem por conta de diferenças na metodologia empregada, na observação de pacientes com distintas formas clínicas e na utilização de modelos experimentais diferentes em vários aspectos. A avaliação da histologia renal de camundongos que sofreram mortalidade espontânea, da função renal através da proteinúria e de depósitos de complemento, além da utilização de outras técnicas, não realizados neste estudo, podem se tornar bases de novas pesquisas e avançar as análises sobre a glomerulopatia esquistossomótica experimental. A continuação desses estudos é importante e recomendável, possibilitando assim uma melhor compreensão geral da doença.

## 8 CONCLUSÕES

Com a utilização das técnicas, que permitiram observar os vários aspectos de alteração e acompanhar durante vários períodos a infecção, foi demonstrado que as consequências da esquistossomose apresentam parâmetros de progressão e agravamento da doença com o tempo, em suas diversas formas. A carga parasitária foi proporcional às alterações vistas em ultraestrutura, das marcações de antígeno e anticorpos (IgG) glomerulares e, principalmente ao tamanho da área de depósitos eletrodensos, indicando que a mesma está diretamente ligada à grande liberação de antígenos desencadeando a doença renal parasitária

Diante do que foi exposto, observou-se lesões renais na maioria dos camundongos reinfectados durante longo período de infecção, bem como que o tratamento reverte os processos iniciais de agressão renal na glomerulopatia em modelo experimental murino e reestrutura a maioria das alterações provocadas pelo processo inflamatório que progressivamente se instala. Embora em alguns poucos camundongos, após a quimioterapia, a doença se manteve

Ao comparar os resultados obtidos neste estudo com outros da literatura, (encontrados em pesquisas utilizando técnicas ou análises similares), verificou-se que na maioria das vezes os mesmos são compatíveis, permitindo concluir que a metodologia utilizada foi adequada para este tipo de estudo. Os achados deste trabalho reforçam a possibilidade de que o estado normal de estrutura renal pode ser restabelecido com o tratamento antiparasitário, desde que ministrado logo que se instala a glomerulopatia esquistossomótica clínica. Esses resultados contribuem efetivamente para a patologia da esquistossomose mansônica e podem estimular os respectivos estudos na forma clínica.

## REFERÊNCIAS

ALLEN, G. P. R.; BARTLEY, P. B.; SLEIGH, A. C.; OLDS, G. R.; YUESHENG, L.; GAIL, W. M.; MCMANUS, D. P. Esquistossomose. **The New England Journal of Medicine**. 346:1212-1220. 2002.

ANDRADE, Z. A. A esquistossomose no Brasil após quase um século de pesquisas. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. 509-513. 2002.

ANDRADE, Z. A. Imunologia da esquistossomose. In: Tosta, C. E., ed. Progressos da imunologia das parasitoses. **Brasília. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 1977. p. 42-59.

ANDRADE, Z. A. The situation of Hepatosplenic Schistosomiasis in Brazil today. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. 93 (1): 313 - 316. 1998.

ANDRADE, Z. A.; ANDRADE, S. G.; SADIGURSKY, M. Renal changes in patients with hepatosplenic schistosomiasis. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**; 20:77. 1971.

ANDRADE, Z. A.; BAPTISTA, A. P.; SANTANA, T. S. Remodeling of hepatic vascular changes after specific chemotherapy of Schistosomal periportal fibrosis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. 101 (1): 267 - 272. 2006.

ANDRADE, Z. A.; MARCK, E. V. Schistosomal Glomerular Disease (A review). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. 79 (4): 499 - 506. 1984.

ANDRADE, Z.A.; QUEIROZ, A. Lesões renais na esquistossomose hepatoesplênica. **Rev. Inst. Med. Trop.**, São Paulo; 10:36. 1968.

ANDRADE, Z. A.; RAMOS, E. G.; REIS, M. G. A patologia da esquistossomose mansoni no coelho. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, vol. 83(3): 323-333, 1988.

ANDRADE, Z. A.; ROCHA H. Schistosomal Glomerulopathy. **Kidney International**. 6, 23 – 29. 1979.

ANDRADE, Z. A.; SADIGURSKY, M. Immunofluorescence study of schistosome structures which share determinants with circulating schistosome antigens. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** 1978.

ANDRADE, Z. A.; SUSIN, M. Renal changes in mice infected with *Schistosoma mansoni*. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, 23: 400 – 403. 1974.

ARIADNA, J. A.; BRESCIA, F.; CONCEIÇÃO, D. R. G.; DIAS, A.; PERÔNICO, C.; ESTHER, M. M. Acompanhamento do ciclo de vida de *Schistosoma mansoni* (PLATYHELMINTHES: TREMATODA) em condições laboratoriais. **Artigo da Revista de Biologia e Ciências da Terra**. Vol. 1, Nº 2, ISSN 1519-5228. 2001.

ATTA, A. M.; MAGALHÃES, L. A.; ALCÂNTARA, F. G.; PAREJA, G. Esquistossomose mansônica - evolução do quadro patológico: análise parasitológica, hematológica e histopatológica. **Revista Saúde Pública**, São Paulo, 15:72-92, 1981.

AZEVEDO, L. S.; DEPAULA, F. J.; JANHEZ, L. E.; SALDANHA, L. B.; SABBAGA, E. Renal Transplantation and *Schistosoma mansoni*. **Transplantation**, 44: 795-798. 1987.

BARBOSA, F. S. **Epidemiologia**. Chapter 3, in Esquistossomose mansoni, edited by CUNHA AS, São Paulo, Servier Ed., 1970, p. 31.

BARBOSA, C. S.; BARBOSA, F. S.; Padrão epidemiológico da esquistossomose em comunidade de pequenos produtores rurais de Pernambuco, Brasil. **Cad. Saúde Públ.**, Rio de Janeiro, 14(1):129-137, jan-mar, 1998.

BARROS, A. F. **Resposta imune humoral e patologia hepática de camundongos desnutridos, infectados com *Schistosoma mansoni***. Dissertação de Mestrado, Pós-graduação em Saúde Pública, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/Fiocruz, Recife 2008. 127 pgs.

BASTOS, O. C. **Utilização de soros pluri-específicos no estudo da evolução das**

**imunoglobulinas envolvidas na resposta imune de camundongos ao *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907.** Campinas [Tese de Doutorado — Instituto de Biologia da UNICAMP]. 1979.

BERGGREN, W. L.; WELLER, T. H. Immuno-electrophoretic demonstration of specific circulating antigen in animals infected with *Schistosoma mansoni*. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 16:606- 612, 1967.

BINA, J. C. **Estudo das variáveis que podem influenciar na evolução da esquistossomose mansônica.** Efeito da Terapêutica Específica e da Interrupção da Transmissão, PhD Thesis, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 1995. 126 pg.

BINA, J. C.; ANDRADE, Z. A.; DIETZE R.; PRATA, A. A field study of proteinuria in individuals infected with *Schistosoma mansoni*. **Rev. Soc. Brasil. Med. Trop.**; 18(1): 7-10. 1985.

BINA, J. C.; PRATA, A. Esquistossomose na área hiperendêmica de Taquarendi. I – Infecção pelo *Schistosoma mansoni* e formas graves. **Rev. da Soc. Bras. de Med. Trop.** 36 (2):211-216, 2003.

BJORNEBOE, M.; PRYTZ, H. In: **Immunological aspects of the liver and gastrointestinal tract.** Ferguson, A., Mac Sween, R. N. M., M. T. P. Press, Lancaster. 1976. Pg. 251.

BOGLIOLO, L. The anatomical picture of the liver in hepatosplenic schistosomiasis mansoni. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, Liverpool, v. 51, p. 1-14, 1957.

BOROS, D. L. Immunopathology of *Schistosoma mansoni* infection. **Clin Microbiol Rev** 2, 250-69. 1989.

BRASIL. **Centro de Vigilância Epidemiológica (CVE)** – Coordenadoria do Controle de Doenças. Vigilância Epidemiológica e Controle da Esquistossomose: Normas e Instruções. Controle da Esquistossomose do Estado de São Paulo/PCE-SP, versão 2007.

BRITO, E. G. V. **Patologia renal na esquistossomose mansônica hepatoesplênica.** Um estudo de material de biópsias renais. Tese, Universidade Federal da Bahia, Faculdade de Medicina, Brasil, 1973.

BRITO, T.; BONI, D.; LOPES, J. D.; SILVA, L. C. Kidney biopsy in human schistosomiasis: An ultrastructural study (preliminary report). **Rev. Inst. Med. Trop.** São Paulo, 11:62-64, 1969.

BRITO, T.; GUNJI, J.; CAMARGO, M. E.; CARAVOLO, A.; SILVA, L. C. **Bulletin of the World Health Organisation.** 45, 419. 1971.

BRITO, T.; GUNJI, J.; CAMARGO, M. E.; CERAVOLO, A.; SILVA, L. C. Glomerular Lesions in Experimental Infections of *Schistosoma mansoni* in *Cebus apela*, Monkeys. **Bull. Org. mond. Sante, Bull. Wld Hlth Org,** 45, 419-422. 1971.

BOTROS, S.; SOLIMAN, A.; EL-GAWHARY, N.; SELIM, M.; GUIRGUIS, N. Effect of combined low dose praziquantel and oxamniquine on different stages of schistosome maturity. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.;** 83: 86-9. 1989.

BURKE, M. L.; JONES, M. K.; GOBERT, G. N.; LI, Y. S.; ELLIS, M. K.; McMANUS, D. P. Immunopathogenesis of human schistosomiasis. **Blackwell Publishing Ltd.** Vol. 31, pages 163-176, april 2009.

CAPRON, A. *et al.* Effector mechanisms of immunity to Schistosomes and their regulation. **Immunol. Rev.,** Copenhagen, v. 61, p. 41 - 66, 1982.

CARVALHO, O. S.; COELHO, P. M. Z.; LENZI, H. L. **Schistosoma mansoni e esquistossomose: uma visão multidisciplinar.** Rio de janeiro: Editora Fiocruz, 2008. 1123 pg.

CAVALLO, T.; GALVANEK, E. G.; WARD, P. A.; LITCHTENBERG, F. V. The Nephropathy of Experimental Hepatosplenic Schistosomiasis. **American Journal of Pathology,** Boston, MA. Vol. 76, No. 3. 1974.

CHAIWORAPORN, R.; MANEERAT, Y.; ROJEKITTIKHUN, W.; RAMASOOTA, P.; JANECHARUT, T.; MATSUDA, H.; KITIKOON, V. Therapeutic effect of subcurative dose praziquantel on *Schistosoma mansoni* infected mice and resistance to challenge infection after treatment. **Southeast Asian J. Trop. Med. Public. Health.** Vol. 36, N<sup>o</sup>. 4, July, 2005.

CHANDRA, R. K. Immunocompetence is a sensitive and functional barometer of nutritional status. **Acta Paediatr. Scand.**, Stockholm , n. 374, p. 129 - 132, 1991.

CHAVES, A.; ALCÂNTARA, O. S.; CARVALHO, O. S.; SANTOS, J. S. Estudo comparativo dos métodos coprológicos de lutz, kato-katz e faust modificado. **Rev. Saúde Públ.** São Paulo. 13: 348-52. 1979.

CHEEVER, A. W. Quantitative comparison of the intensity of *Schistosoma mansoni* infection in man and experimental animals. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** 63: 781-795. 1969.

CHEEVER, A. W. Relative resistance of the eggs of human schistosomes to digestion in potassium hydroxide. **Bull. World Health Organ.** Genebra, v. 43, p. 601 - 603, 1970.

CHEEVER, A. W.; LENZI, J. A.; LENZI, H. L.; ANDRADE, Z. A. Experimental Models of *Schistosoma mansoni* Infection. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, Vol. 97 (7): 917-940, October. 2002.

CHIEFFI, P. P.; WALDMAN, E. A. Aspectos particulares do comportamento epidemiológico da esquistossomose mansônica no Estado de São Paulo, Brasil. **Cad. Saúde Pública** vol.4 n<sup>o</sup> 3 Rio de Janeiro July/Sept. 1988.

CONCEIÇÃO, M. J.; ARGENTO, C. A.; PEREIRA, N. G.; COURA, J. R.; FIGUEIREDO, N. Estudo comparativo de pacientes esquistossomóticos tratados com diferentes esquemas terapêuticos de Oxamniquine e Praziquantel. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, 24 (Supl. II): Abstract 230. 1991.

CORREIA, E. I. S.; MARTINELLI, R. P.; ROCHA H. Está desaparecendo a glomerulopatia da esquistossomose mansônica? **Soc. Bras. Med. Trop.** 30 (4): 341 - 343. 1997.

COUTO, J. L. A. Esquistossomose mansoni em duas mesorregiões no estado de Alagoas. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** 38 (4):301-304, jul-ago, 2005.

COUTO, J. L. A.; VIEIRA, R. C. S.; BARBOSA, J. M.; ROCHA, D. B.; FERREIRA, H. S. Esquistossomose murina associada à desnutrição: alterações histopatológicas no fígado, baço e jejuno. **Revista de Patologia Tropical**, Vol. 36 (1): 54-66. jan.-abr. 2007.

COUTO, J. L. A.; VIEIRA, R. C. S.; BARBOSA, J. M.; MACHADO, S. S.; FERREIRA, H. S. Alterações da função hepática de camundongos desnutridos e infectados pelo *Schistosoma mansoni*. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**; 41(4):390-3. 2008.

DEELDER, A. M.; KORNELIS, D.; VAN MARCH, E. A.; EVELEIGH, P. C.; VAN EGMOND, J. G. *Schistosoma mansoni*: Characterization of two circulating polysaccharide antigens and the immunological response to these antigens in the mouse, hamster, and human infection. **Exp. Parasitol.** 50:16 - 32, 1980.

DEJANI, N. N.; SOUZA, L. C.; RODOLPHO, J. M. A.; OLIVEIRA, S. R. P.; NERIS, D. M.; CORREIA, R. O.; VIEIRA, P. C.; RODRIGUES, V.; SILVA, L. V. S.; ARAÚJO, H. S. S.; ANIBAL, F. F. Avaliação de células sanguíneas em camundongos infectados com *Schistosoma mansoni* tratados com extrato de *mentha piperital*. **Revista Saúde**, São Paulo, 4, (Esp. 1), 2010.

DI FIORE, M. S. H. **Atlas de histologia**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S. A., 7ª edição, 2001, 229 pg.

DIGEON, M.; LAVER, M.; RIZA, J.; BACH, J. F. Detection of circulating immune complexes in human sera by simplified assays with polyethylene glycol. 1. **Immunol. Methods**, 16, 165. 1977.

DONG, Y.; CHOLLET, J.; VARGAS, M.; MANSOUR, N. R.; BICKLE, Q.; ALNOUTI, Y.; HUANG, J.; KEISER, J.; VENNERSTROM, J. L. Praziquantel analogs with activity against juvenile *Schistosoma mansoni*. **Bioorg. Med. Chem. Lett.** Apr 15; 20(8):2481-4. 2010.

DOUMENGE, J. P.; MOTT, K. E. Global distribution of schistosomiasis: CEGET/WHO atlas. **World Health Stat Q**; 37: 186–99. 1984.

ELOI-SANTOS, S.; OLSEN, N. J.; CORRÊIA-OLIVEIRA, R.; COLLEY, D. G. *Schistosoma mansoni*: mortality, Pathophysiology, and susceptibility differences in male and female mice. **Exp. Parasitol.**, 75: 168-175, 1992.

FALLON, P. G.; FOOKES, R. E.; WHARTON, G. A. Temporal difference in praziquantel and oxamniquine induced tegumental damage to adult *Schistosoma mansoni*: implications of drug-antibody synergy. **Parasitol**; 112: 47-58. 1996.

FALLON, P. G. Immunopathology of chistosomiasis: a cautionary tale of mice and men. **Immunol. Today**, Cambridge, v. 21, n. 1, p. 29 - 35, 2000.

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

FALLON, P. G.; HAMILTON, J. V.; DOENHOEFF, M. J. Efficacy of treatment murine *Schistosoma mansoni* infection with praziquantel and oxamniquine correlates with infection intensity: role of host antibody. **Parasitology**; 111: 59-66. 1995.

FLANNERY, L. M. S. **Estudo sobre a patogenia da fibrose hepática, periportal na esquistossomose do camundongo.** Tese de Doutorado, Pós-graduação em Patologia, CPqGM-Fiocruz/UFBA, Salvador 2003. 122 pg.

FRANCO, M.; MONTENEGRO, R. M.; BRITO, T.; BACCHI, C. E.; ALMEIDA, P. C. **Patologia: processos gerais.** São Paulo: 5º Ed. Atheneu Editora, 175-182. 331 pgs. 2010.

GARTNER, L. P.; HIATT, J. L. **Atlas colorido de histologia.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007 il, 432 pg.

GHANEM, A. M. *et al.* Circulating immune complex levels in patients with schistosomiasis and complication. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, London, v.81,n.5, p. 773 - 777, 1987.

GIBODA, M.; SMITH, J. M.; PRICHARD, R. K. Reduction in tissue egg load and maintenance of resistance to challenge in mice infected with *Schistosoma mansoni*, following combined treatment with praziquantel and an antifibrotic agent. **Ann. Trop. Med. Parasitol**; 88: 385-95. 1994.

GLEREAN, A. **Manual de Histologia: texto e atlas**. Editora Atheneu, São Paulo, 2003. 223 pg.

GOLD, R.; ROSEN, R. S.; WELLER, T. H. Specific circulating antigen in hamsters infected with *Schistosoma mansoni*: Detection of antigen in serum and urine, and correlation between antigenic concentration and worm burden. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 18:545-552, 1969.

GOLIM, M. A. *et. al.*; Conjugação e validação de controle isotópico IgG1-FITC para uso em citometria de fluxo; **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.** vol.29 no.4 São José do Rio Preto Oct./Dec. 2007.

GRIMAUD, J. A.; BOROJEVIC, R.; BRADRAWY, N. E. IgG deposits and Disse's space pathology in human schistosomal liver. **Experientia**, Basel, v.15, n. 33 - 38, p. 1078 - 1079, 1977.

GRYSEELS, B.; POLMAN, K.; CLERINX, J.; KESTENS, L. Human schistosomiasis. **Lancet** 368:1106 - 1118. 2006.

GRYSEELS, B.; DE VLAS, S. J. Worm burdens in schistosome infections. **Parasitol Today** 12: 115-119. 1996.

HILLYER, G. V. Schistosoma deoxyribonucleic acid (DNA), antibodies to DNA in schistosoma infection, and their possible role in renal pathology. **Bol. Asoc. Med. PR** 65:1-22, 1973.

HILLYER, G. V.; LEWERT, R. M. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene.** 23, 404. 1974.

HINES-KAY, J.; CUPIT, P. M.; SANCHEZ, M. C.; ROSENBERG, G. H.; HANELT, B.; CUNNINGHAM, C. Transcriptional analysis of *Schistosoma mansoni* treated with praziquantel in vitro. **Mol. Biochem Parasitol.** Dec; 186(2):87-94. 2012.

HOUBA, V.; STURROCK, R. F.; BUTTERWORTH, A. E. **Clinical and Experimental Immunology.** 30, 439. 1977.

HUGGINS, D. W. Praziquantel - Nova opção para o tratamento da esquistossomose mansônica. **Anais do XXVIII Congresso Brasileiro Gastroenterologia.** São Paulo, 1982.

HUGGINS, D. W.; MEDEIROS, L. B.; SIQUEIRA, B. R, *et. al.* **Evolução clínica.** In: HUGGINS, D. W.; SIQUEIRA-BATISTA, R.; MEDEIROS, L. B.; *et al.* (editores). **Esquistossomose mansoni.** São Paulo: Grupo Editorial Moreira Jr; p. 56-74. 1998.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica.** 9º edição. Editora Guanabara Koogan S. A. Rio de Janeiro, 1999. 427 pg.

KATZ, N. Dificuldades no desenvolvimento de uma vacina para a esquistossomose mansoni. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** vol.32, n.6, Uberaba. Nov./Dec. 1999.

KATZ, N. The discovery of Schistosomiasis mansoni in Brazil. **Acta Trop** 108, 69-71. 2008.

KATZ, N.; BRENER, Z. Evolução de 112 casos de esquistossomose mansoni observados após 10 anos de permanência em focos endêmicos de Minas Gerais. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, 8: 139-142. 1966.

KATZ, N.; CHAVES, A.; PELLEGRINO, J. A. Simple device for quantitative stool thick-smear technique in schistosomiasis mansoni. **Rev. Inst. Med. Trop.**, São Paulo, 14:397-400. 1972.

KELSOE, G. H.; WELLER, T. H. Immunodiagnosis of infection with *Schistosoma mansoni*: Enzyme linked immunosorbent assay for detection of antibody to circulating antigen. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA** 75:5715 - 5717, 16. 1978.

KIBUKAMUSOKE, J. W. **Nephrology Tropical**. CITFORGE PTY. LTD., G.P.O. Box 1291, Canberra City, ACT 2601, Australia, 1984. 466 pg.

KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N. **Robbins e Cotran: Patologia: Bases Patológicas das Doenças**. Editora Elsevier, R.J., 2005, 1504 pg.

LAMBERTUCCI, J. R.; GRECO, D. B.; PEDROSO, E. R., *et al.* A double-blind trial with oxamniquine in chronic schistosomiasis mansoni. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**;76(6):751-5. 1982.

LAMBERTUCCI, J. R.; SILVA, L. C. S.; VOIETA, I. **Esquistossomose Mansônica**. In: Coura, J. R., (editor). Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; P.931-46. 2005.

LESCANO, S. Z.; CHIEFFI, P. P.; CANHASSI, R. R.; BOULOS, M.; NETO, V. A. Atividade antiparasitária do artemether na esquistossomose mansônica experimental. **Rev. Saúde Pública**; 38(1):71-571, 2004.

MACHADO, M. M.; *et. al.* Aspectos Ultrassonográficos da esquistossomose hepatoesplênica. **Radiol. Bras.**, São Paulo. vol. 35, n. 1, p. 41-45. 2002. Disponível em <http://www.scielo.br/pdf/rb/v35n1/8526.pdf>. Acesso em 30 de março de 2013.

MAGALHÃES FILHO, A.; COUTINHO, E. M. Lesões esplênicas iniciais na Esquistossomose mansônica humana. **Rev. Inst. Med. Trop.** São Paulo, São Paulo, v. 2, p. 251 - 259, 1961.

MAGALHÃES FILHO, A.; *et. al.* Localization of antigen and presence of antibody in tissues of mice infected with *Schistosoma mansoni*, as indicated by fluorescent antibody technics. **Amer. J. trop. Med. Hyg.**, 14:84-99, 1965.

MAHMOUD, A. A. F.; WARREN, K. S.; PETERS, P. A. A role for the eosinophil in acquired resistance to *Schistosoma mansoni* infection as determined by antieosinophil serum. U. S. Public Health Service grant AI 08163 and grants from The Rockefeller and Edna McConnell Clark Foundations. **The Journal of Experimental Medicine** - volume 142, 1975.

MAHMOUD, A. A. F.; WOODRUFF, A. W. Renal lesions caused by immune complex deposition in schistosomiasis. **Trans. roy. Soc. Trop. Med. Hyg.** 69, 187. 1975.

MAHMOUD, K. M.; SOBH, M. A.; EL-AGROUDY, A. E.; MOSTAFA, F. E.; EL BAZ, M.; SHOKEIR, A. A.; GHONEIM, M. A. Impact of schistosomiasis on patient and graft outcome after renal transplantation: 10 years' follow-up. **Nephrol Dial Transplant**, 16: 2214-2221. 2001.

MALAFAIA, G. A importância do encorajamento de estudos sobre as doenças tropicais negligenciadas. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** 42(5):609-610, set-out, 2009.

MALTA, J. **Esquistossomose mansônica**. Recife: Editora Universitária da Universidade Federal de Pernambuco; 1994. p. 387.

MARTINELLI, R.; NOBLAT, A. C. B.; BRITO, E.; ROCHA, H. *Schistosoma mansoni*-induced mesangiocapillary glomerulonephritis: Influence of therapy. **Kidney Int.** 35: 1227-1233. 1989.

MARTINELLI R.; ROCHA H. Aspectos Clínicos e Evolutivos da Glomerulopatia da Esquistossomose Mansônica. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, Suppl., Vol. 84, 1989. Pg. 241.

MARTINELLI R.; ROCHA H. Revisão/Atualização em Nefrologia Clínica: Envolvimento glomerular na esquistossomose mansônica. **J. Bras. Nefrol.**; 18(3): 279-282. 1996.

MARTINS-LEITE, P.; GAZZINELLI, G.; ALVES-OLIVEIRA, L. F., *et. al.* Effect of chemotherapy with praziquantel on the production of cytokines and morbidity associated with schistosomiasis mansoni. **Antimicrob Agents Chemother**; 52(8):2780-6. 2008.

MATSUDA, H.; TANAKA, H.; NOGAMI, S.; MUTO, M. Mechanism of action of praziquantel on the eggs of *Schistosoma japonicum*. **Jpn J. Exp. Med.**; 53: 271- 4. 1983.

MCMANUS, D. P.; LOUKAS, A. Current Status of Vaccines for Schistosomiasis. **Clin. Microbiol Rev.** Jan; 21(1):225-42. 2008.

MEIRA, D. A. Interactions of infection, nutrition, and immunity. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, Brasília, v. 28, n. 4, p. 315 - 319, 1995.

MELLO, A. L.; COELHO, P. M. Z. *Schistosoma mansoni* e a doença. In: NEVES, D. P.; *et al.* Parasitologia Humana. 10 ed. São Paulo: Atheneu, 2002. p. 174-193.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Esquistossomose mansônica. **Secretaria de vigilância em saúde.** CID 10, B65, 7<sup>o</sup> edição. Brasília, 2008.

MOORE, D. V. *et al.* A comparison of common laboratory animals as experimental hosts for *Schistosoma mansoni*. **J. Parasitol.**, Lawrence, v. 35, p. 156 - 170, 1949.

NASH, T. E.; PRESCOTT, B.; NEVA, F. A. The characteristic of a circulating antigen in schistosomiasis. **J. Immunol.** 112:1500- 1507, 1974.

NASH, T. E. Localization of schistosome antigen in *Schistosoma mansoni*. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 23:1085-1088, 1974.

NATALI, P. G.; CIOLI, D. **Fed. Proceedings.** 33, 757. 1974.

NATALI, P. G.; CIOLI, D. **European Journal of Immunology.** 6, 359. 1976.

NATALI, P. G.; CIOLI, D. Immune complexe nephritis in *Schistosoma mansoni* infected mice. **Eur. J. Immunol.** 6:359 – 364. 1976.

NEVES, D. P.; MELO, A. L.; LINARDI, P. M.; VITOR, R. W. A. **Parasitologia Humana.** São Paulo: Editora Atheneu, 11<sup>o</sup> edição. 2010. 494 pg.

NUSSENZVEIG, I.; BRITO, T.; CANEIRO, C. R. W.; SILVA, A. M. G. Human *Schistosoma mansoni* associated glomerulopathy in Brazil. **Nephrol Dial Transplant.** 17: 4 - 7. 2002.

OLIVEIRA, F. A. **Avaliação do efeito do praziquantel, da oxamniquina e da associação destas drogas sobre o verme adulto de *Schistosoma mansoni***. Dissertação de mestrado, Centro de Pesquisas René Rachou (Fiocruz), 2005. 98 pgs.

OKABE, K.; TANAKA, T. Urine precipitin reaction for schistosomiasis japonica. **Kurume Med. J.** 8:24-37, 1961.

PEARCE, E. J.; MACDONALD, A. S. The Immunobiology of Schistosomiasis. **Nat. Rev. Immunol**, Londres, v. 2, p. 499 - 511, 2002.

PELLEGRINO, J.; KATZ, N. Experimental chemotherapy of Schistosomiasis mansoni. **Adv. Parasitol.** 6: 233-90. Review. PubMed PMID: 4978052. 1968.

PORTH, C. M. **Fisiopatologia**. 6 ed. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan, 2004.

PRATA, A. **Esquistossomose Mansonii**. In: Veronesi R, Veronesi FR, (editor). Tratado de infectologia. 3ª ed. São Paulo: Atheneu; 2007. Pg. 1695-1720.

QUINTAS, L. E. M.; SIQUEIRA-BATISTA, R.; CORRÊA, A. D.; *et. al.* Tratamento da esquistossomose. **Rev. Bras. Med.**; 50 : 683. 1993.

RAMOS, E. A. G.; ANDRADE, Z. A. Chronic Glomerulonephritis Associated with Hepatosplenic Schistosomiasis mansoni. **Rev. Inst. Med. Trop.** São Paulo. 29(3):162-167. 1987.

REIMERT, C. L.; FITZSIMMONS, C. M.; JOSEPH, S.; MWATHA, J. K.; JONES, F. M.; KIMANI, G.; HOFFMANN, K. F.; BOOTH, M.; KABATEREINE, N. B.; DUNNE, D. W.; VENNervalD, B. J. *Eosinophil activity in Schistosoma mansoni* infections in vivo and in vitro in relation to plasma cytokine profile pre-and posttreatment with praziquantel. **Clin. Vaccine Immunol.** 13:584–593. 2006.

REY, L. **Bases da parasitologia médica**. 2ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2002. p. 379.

REY, L. *Schistosoma mansoni* e Esquistossomíase: O Parasito. In: Parasitologia, 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001, cap. 32, p. 413-424.

RIBEIRO, F.; MELLO, R. T.; TAVARES, C. A. P.; KUSEL, J. R.; COELHO, P. M. Z. Synergistic action of praziquantel and host specific immune response against *Schistosoma mansoni* at different phases of infection. **Rev. Inst. Med. trop.** S. Paulo. 10.1590/S0036-466. 2004.

RIDI, R. E.; MAHROUS, A.; AFIFI, A.; MONTASH, M.; VELEK, J.; JEZEK, J. Human and murine humeral immune recognition of multiple peptides from *Schistosoma mansoni* glyceraldehyde 3-P dehydrogenase is associated with resistance to schistosomiasis. **Scand. J. Immunol.**; 54: 477-85. 2001.

ROCHA, H.; CRUZ, T.; BRITO, E.; SUSIN, M. Renal involvement in patients with hepatosplenic schistosomiasis mansoni. **Am J Trop Med Hyg.**; 25:108. 1976.

RODRIGUES, V. L.; OTONI, A.; VOIETA, I. ANTUNES, C. M. F.; LAMBERTUCCI, J. R. Glomerulonefrite na esquistossomose mansônica: um tempo para reavaliar. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, 43(6): 638-642, 2010.

ROFFATO, H. K.; LEITE, L. C. C.; TARARAM, C. A.; KANNO, A. I.; MONTOYA, B. O. A.; FARIAS, L. P. Antígenos vacinais contra esquistossomose mansônica: passado e presente. **Revista da Biologia.** 6b: 54-59, 22 julho de 2011.

ROSS, A. G.; BARTLEY, P. B.; SLEIGH, A. C., *et. al.* Schistosomiasis. **N. Engl. J. Med.**;346 (16):1212-20. 2002.

SADUN, E. H.; LICHTENBERG, F. V.; CHEEVER, A. W.; ERICKSON, D. G. Schistosomiasis mansoni in the chimpanzee. The natural history of chronic infection after single and multiple exposures. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 19: 258-277. 1970.

SADUN, E. H.; LICHTENBERG, F. V.; HICKMAN, R. L.; BRUCE, J. I.; SMITH, J. H.; SCHOENBECHLER, M. J. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene.** 15, 496. 1966.

SALES, D. M.; SANTOS, J. E. M.; SHIGUEOKA, D. C.; LEÃO, A. R. S.; NETO, R. C.; BORGES, D. R.; IPPOLITO, G.; SZEJNFELD, J. Correlação Inter observador das alterações morfológicas das vias biliares em pacientes com esquistossomose mansoni pela colangiorressonância magnética. **Radiol. Bras.**; 42(5):277–82. 2009.

SANTOS, A.B.A.; SOUZA M.M.; ANDRADE Z.A. Reinfections and the development of schistosomal periportal fibrosis in the murine model. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** 33(2): 197 - 200. 2000.

SANTOS, W. L. C.; SWEET, G. M. M.; OLIVEIRA, M. B.; ROCHA, P. N. Schistosomal glomerulopathy and changes in the distribution of histological patterns of glomerular diseases in Bahia, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.** vol. 106 no.7, Rio de Janeiro. 2011.

SHAW, M. K. *Schistosoma mansoni*: stage dependent damage after in vivo treatment with praziquantel. **Parasitology**; 100: 65-72. 1990.

SHAW, M. K; ERASMUS, A. *Schistosoma mansoni*: praziquantel induced changes to the female reproductive system. **Exp. Parasitol**; 65: 31-42. 1988.

SILVA, S. P. **Estudo da ação do praziquantel sobre as propriedades da adesão e contração do *Schistosoma mansoni* in vitro.** Tese pelo Departamento de Farmacologia Básica e Clínica, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 1993.

SILVA, T. M. C. **Patologia da esquistossomose na infecção natural de roedores silvestres (*Nectomys sp.*).** M. Sc. Thesis, Universidade Federal da Bahia. 1984. 112 pg.

SILVA, M. L. *et. al.* Comparasion of immune responses of *Schistosoma mansoni* -infected mice with distinct chronic forms of the disease. **Acta Trop.**, Basel, v. 91, p. 189 - 196, 2004.

SILVA, K. E. R.; SILVA, R. M. F.; COSTA, S. P. M.; ROLIM, L. A.; LIMA, M. C. A.; ROLIM-NETO, P. J. Alternativas terapêuticas no combate à Esquistossomose mansônica. **Revista de Ciências Farmacêutica Básica e Aplicada**, Recife (PE); 33(1):9-16. 2012.

SILVA, L. C.; BRITO, T.; CAMARGO, M. E.; BONI, D. R.; LOPES, J. D.; GUNJI, J. Kidney biopsy in hepatosplenic form of infection Schistosomal glomerulopathy 29 with *Schistosoma mansoni* in man. **Bull WHO** 42:907-910, 1970.

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

SINAN – **Sistema de Informação de Agravos de Notificação**. 2012. Disponível em: [www.datasus.gov.br](http://www.datasus.gov.br). Acesso em 30 de abril de 2012.

SOARES, S.; JÚNIOR, V. R.; SILVA, D. T. N.; SOUZA, H. M. Participação das plaquetas no processo de fibrose dos pacientes com esquistossomose mansônica. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, vol. 40, n. 3, p. 321-325, 2007.

SOBH, M. A.; MOUSTAFA, F. E.; SALLY, S. M.; DEELDAR, A. M.; GHONIEN, M. A. Effect of Antischistosomal treatment on Schistosomal specific Nephropathy. **Nephrol Dial Transplant**. 3: 744-751. 1998.

SOBH, M. A.; MOUSTAFA, F. E.; EL-HOUSSEINI, F.; BASTA, M. T.; DEELDER, A. M.; GHONIEM, A. Schistosomal specific nephropathy leading to end-stage renal failure. **Kidney Int**. 31, 1006-1011. 1987.

SOUSA, M. R. C. Esquistossomose no Brasil: ensinar versus educar. **Revista Brasileira de Educação Médica**. 33 (1):144 – 147; Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, Brasil. 2009.

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

SOUZA, V. A. M.; SILVA, R. R.; MALDONADO, A. J.; SILVA, J. R. M.; REY, L. *Nectomys squamipes* (Rodentia: Cricetidae) as an experimental model for Squistosmiasis mansoni. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, Vol. 87, Suppl. I, 277-280. 1992.

STEINMANN, P.; KEISER, J.; BOS, R.; TANNER, M.; UTZINGER, J. Schistosomiasis and water resources development: systematic review, meta-analysis, and estimates of people at risk. **The Lancet Infectious Diseases** 6:411-425, 2006.

STIREWALT, M. A.; KUNTZ, R. E.; EVANS, A. S. The relative susceptibilities of the commonly used laboratory mammals to infection by *Schistosoma mansoni*. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, 31, 57-82. 1951.

SYMMERS, W. ST. C. Note on a new form of liver cirrhosis due to the presence of the ova of *Bilharzia haematobia*. **J. Pathol. Bacteriol.** 9. 237-239. 1904.

TAVARES, W. **Antibióticos e quimioterápicos para o clínico**. 2<sup>a</sup> ed. São Paulo: Atheneu; 2009.

TERRY, R. J. Human immunity to schistosomes: concomitant immunity? **Parasitol. Today**; 10:377-8. 1994.

TITO, C.; ELEONORA, G. G.; PETER, A. W.; FRANZ, V. L. The nephropathy of experimental hepatosplenic schistosomiasis. **Am. J. Pathol.** 76: 433 - 450, 1974.

VAN MARCK, E. **Ann. Soc. Belg. Med. Trop.** 55, 373. 1975.

VAN MARCK, E. Presence of the circulating polysaccharide antigen in the liver of mice infected with *Schistosoma mansoni*. **Ann. Soc. Belg. Med. Trop.** 55:373-377, 1975.

VAN MARCK, E. A.; DEELDER, A. M.; GIGASE, P. L. Effect of partial portal vein ligation on immune glomerular deposits in *Schistosoma mansoni* infected mice. **Br. J. Exp. Pathol.** 58:412 - 417, 1977.

VAN MARCK, E. A.; DEELDER, A. M.; GIGASE, P. L. Schistosomal glomerulopathy: role of the circulating anodic polysaccharide antigen, in: The Host Invader Interplay, pg. 507, H. Van den Bossche, Ed., **Elsevier North Holland Biomedical Press** Amsterdam. 1980.

VAN MARCK, E. A.; DEELDER, A. M.; GIGASE, P. U. Effect of partial porta vein ligation on immune glomerular deposits in *Schistosoma mansoni* infected mice. **Br. J. Exp. Pathol.** 58:412-417, 1977.

VAN MARCK, E. A.; JACOB, W.; DEELDER, A. M.; GIGASE, P. L. Experimental schistosomal glomerulopathy in mice and its relation to portosystemic collateral circulation. A light and electron microscope study. **Ann. Soc. Belg. Med. Trop.** 59: 33-47. 1979.

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

VON LICHTENBERG, F.; SADUN, E. H.; CHEEVER, A. W.; ERICK-SON, D. O.; JOHNSON, A. J.; BOYCE, H. W. Experimental infection with *Schistosoma japonicum* in chimpanzees: Parasitologic, clinical, sorologic and pathological observations. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 20:850-893, 1971.

VON LICHTENBERG, F.; SADUN, E. H.; BRUCE, I. I. Renal lesion in *Schistosoma japonicum* infected rabbits. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** 66:505-507, 1972.

WARREN, K. S.; PETERS, P. A. Comparison of penetration and maturation of *Schistosoma mansoni* in the hamster, mouse, guinea pig, rabbit and rat. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, 16:718-722. 1967.

WHO. Immunology of schistosomiasis. **Bull. Wld. Hlth. Org.**, 51:553-93. 1974.

WYNN, T. A.; CHEEVER, A. W.; WILLIAMS, M. E.; HIENY, S.; CASPAR, P.; KUHN R.; MULLER W.; SHER, A. IL-10 regulates liver pathology in acute murine Schistosomiasis mansoni but is not required for immune down-modulation of chronic disease. **J. Immunol.**, 160(9):4473-80, 1998.

ZANOTTI, E. M.; MAGALHÃES, L. A.; PIEDRABUENA, A. E. Localização de *Schistosoma mansoni* no plexo porta de *Mus musculus* experimentalmente infectados por um só sexo do trematódeo. **Rev. Saúde Pública**, Ago, vol.16, no.4, p.220-232. 1982.