



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
MESTRADO EM ANATOMIA PATOLÓGICA

Fibrose e outras lesões hepáticas em camundongos isogênicos
("inbred") desnutridos e eutróficos, infectados com
Schistosoma mansoni.

SANDRA LÚCIA CARVALHO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

RECIFE - PERNAMBUCO

2004



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

MESTRADO EM ANATOMIA PATOLÓGICA

**Fibrose e outras lesões hepáticas em camundongos isogênicos
("inbred") desnutridos e eutróficos, infectados com
*Schistosoma mansoni***

SANDRA LÚCIA CARVALHO

Dissertação de Mestrado apresentada ao Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco como requisito complementar para obtenção do grau de Mestre em Anatomia Patológica, área de concentração Patobiologia .

Orientadores: Prof^ª Eridan de Medeiros Coutinho
Prof^º Aggeu Magalhães Filho

**RECIFE – PERNAMBUCO- BRASIL
2004**

“A mente que se abre a uma idéia jamais voltará ao seu tamanho original”
Albert Einstein

Aos meus pais queridos *Ana* e *Djalma*, que me deram a vida e a oportunidade de crescer como ser humano e como profissional.

Ao meu esposo *Roberto*, sempre ao meu lado, em todos os momentos, me apoiando, me incentivando. Meu amor e carinho.



Universidade Federal de Pernambuco
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
CURSO DE MESTRADO EM ANATOMIA PATOLÓGICA

AUTOR: SANDRA LÚCIA CARVALHO

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: PATOBIOLOGIA

NOME DA TESE: "Fibrose e outras lesões hepáticas em camundogos isogênicos (inbred) desnutridos e eutróficos infectados com *Schistosoma mansoni*".

ORIENTADORA: PROFA. ERIDAN MEDEIROS COUTINHO

TESE DEFENDIDA PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM ANATOMIA PATOLÓGICA.

DATA: 19/05/2004

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Nicodemos Teles de Pontes Filho

Profª. Norma Thomé Jucá

Profª. Constança Clara Gayoso Simões Barbosa

AGRADECIMENTOS

À Dra. Eridan de Medeiros Coutinho, a que sempre me apoiou. A quem devo meus primeiros passos na área científica e até hoje. Agradeço pela confiança, oportunidade e ensinamentos.

Ao Dr. Aggeu Magalhães Filho, pela co-orientação na realização deste trabalho.

Ao Dr. Zilton de A. Andrade, pelo seu exemplo de profissionalismo e ajuda prestada no estudo da patologia hepática.

Ao Dr. Aryon Barbosa, pela ajuda na realização das análises morfológicas.

À Sheilla Andrade de Oliveira, pela amizade e precioso auxílio desde o início.

A Andréia Ferreira de Barros, pela colaboração e amizade.

Aos amigos do Laboratório de Imunopatologia do CPqAM/FIOCRUZ Roni Evêncio de Araújo, Cláudia Lopes, Fabiana Letícia, pelo apoio, amizade e colaboração.

A Simone Santos, Rosane Andrade e Solange Lacerda pelo apoio prestado na Secretaria de Pesquisa do CPqAM/FIOCRUZ.

Aos estatísticos Ulisses Montarroyos e Carlos Luna, do Núcleo de Informática do CPqAM/FIOCRUZ, pela colaboração nas análises estatísticas.

Aos que fazem o Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ/Recife), os quais, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

A todos, os meus sinceros agradecimentos.

RESUMO

FIBROSE E OUTRAS LESÕES HEPÁTICAS EM CAMUNDONGOS ISOGÊNICOS DESNUTRIDOS E EUTRÓFICOS, INFECTADOS COM *SCHISTOSOMA MANSONI*. **SANDRA LÚCIA CARVALHO**. Na esquistossomose mansônica crônica, os granulomas periovulares e a fibrose periportal são as lesões hepáticas mais importantes, além das alterações vasculares, que provocam a hipertensão dentro do sistema venoso portal. Camundongos eutróficos Swiss, “outbred”, infectados com *Schistosoma mansoni*, desenvolvem lesões que se assemelham às encontradas nas formas graves da esquistossomose intestinal do homem e por isso são usados como modelo experimental, em função, também, da facilidade de seu manuseio e do baixo custo. A desnutrição representa, em extensas regiões do mundo onde ocorre a esquistossomose, uma patologia frequentemente associada a essa parasitose, como acontece no nordeste brasileiro, sendo, pois, de interesse o estudo da patobiologia do hospedeiro vertebrado do *S. mansoni*, em relação ao seu estado nutricional. No que diz respeito à chamada fibrose de Symmers (clay pipestem fibrosis) encontrada no fígado de pacientes com esquistossomose mansônica avançada, a lesão foi reproduzida sobretudo em macacos e em camundongos Swiss eutróficos, mas não se desenvolve em camundongos desnutridos. Com o objetivo de verificar a importância do padrão genético do hospedeiro na patogênese dessa e de outras lesões hepáticas observadas em camundongos “outbred”, a presente investigação destinou-se a estudar em camundongos isogênicos desnutridos, as alterações hepáticas encontradas, comparando-as com as de camundongos eutróficos, isogênicos e “outbred”. Os animais foram infectados com 30 cercárias de *Schistosoma mansoni*, por via transcutânea, tendo sido sacrificados por deslocamento cervical, após 16 semanas. A desnutrição foi induzida pelo consumo da dieta básica regional (DBR), dieta hipoprotéica (7,87%) consumida por populações humanas residentes em áreas endêmicas de esquistossomose de Pernambuco e de outros Estados do nordeste brasileiro. A dieta comercial NUVILAB foi administrada aos animais controles e é considerada como dieta padrão (22% de proteína) para camundongos. O estado nutricional foi avaliado através da pesagem semanal e construção das curvas de peso dos diversos grupos sob experimentação. Os camundongos isogênicos pertenciam às cepas BALB/c e C57BL/10 e os animais “outbred” eram albinos Swiss. No momento da necropsia, após estudo macroscópico dos órgãos, amostras de fígado foram retiradas para estudo histológico, morfométrico e bioquímico (quantificação do colágeno através da dosagem de hidroxiprolina). Os animais também foram, após sacrifício, submetidos a perfusão para coleta de parasitos. Quanto à organomegalia, verificou-se que, em todos os grupos, as maiores médias de peso do fígado e do baço foram encontradas nos camundongos eutróficos, em comparação com animais desnutridos da mesma linhagem. Camundongos desnutridos em geral desenvolveram cargas parasitárias menores do que camundongos eutróficos. Em todas as linhagens, camundongos desnutridos produziram menor quantidade de ovos do que camundongos eutróficos, em relação ao fígado total. Os animais dos grupos eutróficos mostraram curvas ponderais com valores sempre significativamente mais elevados do que os animais desnutridos, tendo sido observada a melhor evolução ponderal no grupo dos “outbred” eutróficos e a pior no grupo dos isogênicos BALB/c desnutridos. A mortalidade espontânea foi sempre muito elevada nos grupos desnutridos particularmente da linhagem BALB/c, embora também tenha ocorrido nos

grupos eutróficos (dos 285 camundongos utilizados, apenas 106 concluíram a fase experimental), provavelmente por motivos ligados a mudanças na estrutura física de nosso Biotério de Experimentação, ocorridas durante a realização do experimento. Camundongos isogênicos da linhagem C57BL/10, segundo avaliação morfométrica, considerada mais sensível, desenvolveram maior quantidade de colágeno hepático (tanto desnutridos como eutróficos), em relação às outras linhagens. Pela avaliação bioquímica (espectrofotometria), as diferenças ocorreram, mas não foram estatisticamente significativas. Ao exame histológico, camundongos isogênicos desnutridos apresentaram granulomas menores. Pela morfometria, revelaram menor densidade volumétrica e maior densidade numérica, em relação aos animais eutróficos. Camundongos isogênicos BALB/c, desnutridos e/ou eutróficos, não desenvolveram a fibrose periportal do tipo murino. Todavia, camundongos isogênicos desnutridos, da linhagem C57BL/10, desenvolveram a fibrose “pipestem-like” em 4 dos 21 animais do grupo. Este achado talvez esteja relacionado com o tipo da cepa parasitária utilizada (cepa SLM), diferente da que foi empregada em investigações anteriores (BH), o que ocorreu devido a problemas técnicos no laboratório, à época da montagem do experimento. A hepatomegalia guardou relação com a presença de infiltrados celulares, aumento de teor de colágeno e teor protéico da dieta controle (22%). A esplenomegalia pode ser relacionada à hiperplasia do sistema fagocítico-mononuclear e à congestão decorrente de alterações hemodinâmicas no sistema venoso portal. Outras lesões hepáticas observadas, tais como metamorfose gordurosa periportal e eventuais focos de necrose coagulativa aguda por isquemia, tiveram importância secundária no quadro histopatológico da esquistossomose crônica, no modelo experimental estudado. Os resultados obtidos apontam para a necessidade de aprofundar os estudos sobre o papel de diferentes tipos de cepa parasitária no desenvolvimento da lesão “pipestem-like”, no modelo murino desnutrido.

ABSTRACT

FIBROSIS AND OTHER HEPATIC LESIONS IN UNDERNOURISHED AND WELL-NOURISHED INBRED MICE INFECTED WITH *Schistosoma mansoni*. **SANDRA LÚCIA CARVALHO**. In chronic schistosomiasis mansoni, periovular granulomas and periportal fibrosis are the most important hepatic lesions, besides vascular changes that lead to hypertension within the portal venous system. Well-nourished Swiss outbred mice infected with *Schistosoma mansoni* develop lesions that mimic those found in advanced clinical forms of human intestinal schistosomiasis. For this reason and due to their easy handle and cheap cost, they are widely used as experimental model. In extensive regions of the world where schistosomiasis is endemic, undernutrition appears frequently as an associated pathology and this is also the case in Northeast Brazil, the study of the pathobiology of the vertebrate host and its nutritional status becoming of deep interest. Concerning the so-called Symmer's fibrosis (clay pipestem fibrosis) seen in the liver of patients with advanced schistosomiasis, the lesion has been reproduced mainly in monkeys and in Swiss well-nourished mice, but it does not develop in undernourished animals. In order to study the importance of the host genetic background on the pathogenesis of this and other hepatic lesions observed in outbred mice, the present investigation aimed to characterize the hepatic changes in undernourished inbred mice in comparison with those detected in well-nourished inbred and outbred animals. Mice were infected with 30 cercariae of *Schistosoma mansoni* (SLM strain) by percutaneous route and sacrificed 16 weeks later by cervical dislocation. Undernutrition was induced by feeding mice with the regional basic diet (RBD) which is a low-protein diet (7,87%) ingested by human populations residing in endemic areas of schistosomiasis in Pernambuco and other States in Northeast Brazil. Control animals were fed with NUVILAB, a standard diet for mice (22% protein). Nutritional status was studied by weekly determinations of body weights and evaluation of growth curves for all the groups throughout the experiment. Inbred mice were of BALB/c and C57BL/10 strains and Swiss outbred albino mice were used as controls. After sacrifice, the portal system was perfused for worm recovering and gross examination was performed. Liver samples were taken for histological examination, morphometry and biochemical quantification of liver collagen through determination of the content of hydroxyproline. Regarding organomegaly, the highest means for liver and spleen weights belonged to well-nourished mice in comparison with undernourished animals of the same strain. Undernourished mice usually developed the lightest worm burdens when compared to well-nourished animals and also produced smaller amounts of eggs regarding the whole liver. Well-nourished groups had better growth curves than undernourished ones, the best weight gains for well-nourished outbred and the worst weight gains for undernourished inbred BALB/c mice. Spontaneous mortality was always higher for undernourished mice, mainly of the BALB/c strain, but it also happened among well-nourished animals (only 106 out of the total number of 285 mice were alive at the end of the experiment), probably due to environmental reasons and changes in the physical structure of the Animals Room of our Institution, which occurred during the experiment. According to morphometric measurements, both well-nourished and undernourished C57BL/10 inbred mice had greater amounts of hepatic collagen than the other mice strains. Biochemical differences, based upon spectrophotometry, were not statistically significant, but morphometry in this cases is considered to be a more sensitive method than spectrophotometry. Undernourished inbred mice developed smaller circumoval granulomas detected through histological examination and morphometric measurements. A lower

granuloma volume density and a higher granuloma numerical density were also morphometrically detected, in comparison to well-nourished inbred mice. Both undernourished and well-nourished inbred BALB/c mice did not develop the murine pipestem-like lesion. However, four out of 21 undernourished C57BL/10 mice developed this liver lesion. This finding may be related to the type of parasitic strain since due to technical problems in the laboratory mice infections were performed with a parasitic strain (SLM strain) different from the one that had been used in previous investigations (BH strain). The hepatomegaly was related to the inflammatory infiltrates, increase of collagen deposition and protein content of the control diet (22%). Splenomegaly may be caused by hyperplasia of the mononuclear phagocytic system and venous congestion due to hemodynamic alterations within the portal region. The remaining lesions, such as periportal fatty changes of hepatic cells and scattered foci of acute coagulative necrosis by ischemia were of secondary importance in the histopathologic picture found in chronic schistosomiasis of mice. Results collected so far point to the need of further studies on the role of different types of parasitic strains in the development of the pipestem-like liver lesion in the undernourished murine model.

SUMÁRIO

RESUMO	iv
ABSTRACT	vi
1. INTRODUÇÃO.....	01
1.1 Esquistossomose Mansônica: generalidades.....	01
1.2 Patogenia e patologia geral da esquistossomose.....	01
1.3 Características da esquistossomose mansônica crônica.....	03
1.4 Co-fatores envolvidos na patogenia da esquistossomose.....	06
1.5 Esquistossomose mansônica e resposta imune.....	07
1.6 Esquistossomose em modelos experimentais.....	09
1.6.1 Camundongos isogênicos.....	11
1.7 Esquistossomose no hospedeiro vertebrado desnutrido.....	13
2. OBJETIVOS.....	16
2.1 Geral.....	16
2.2 Específicos.....	16
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	17
3.1 Animais.....	17
3.2 Dietas e Estado Nutricional dos Animais.....	17
3.3 Infecção.....	18
3.4 Grupos Experimentais.....	19
3.5 Estudo Parasitológico.....	19
3.6 Estudo Bioquímico.....	20

3.7 Estudo Histológico e Morfométrico.....	20
3.8 Análise Estatística.....	21
4. RESULTADOS.....	22
4.1 Estudo morfológico do fígado.....	22
4.1.1 Dados macroscópicos.....	22
4.1.2 Histopatologia.....	23
4.1.3 Quantificação do colágeno hepático.....	38
4.1.4 Outras medidas morfométricas.....	39
4.2 Estudo parasitológico.....	41
4.2.1 Carga parasitária.....	41
4.2.2 Quantidade de ovos no fígado.....	42
4.3 Estado nutricional.....	43
4.4 Mortalidade espontânea.....	44
5 . DISCUSSÃO.....	45
5.1 Achados morfológicos (macro e microscópicos).....	46
5.2 Achados parasitológicos.....	48
5.3 Achados nutricionais.....	49
5.4 Mortalidade.....	50
6. CONCLUSÕES.....	52
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	54

INTRODUÇÃO

1.1 Esquistossomose mansônica: generalidades

A esquistossomose mansônica é uma doença causada pelo *Schistosoma mansoni*, parasita trematódeo digenético que necessita de caramujos de água doce para completar o seu ciclo de vida. O Egito parece ter sido o foco de origem dessa doença, pois nessa região estudos de múmias mostraram a presença de lesões causadas por esse helminto. No Continente Americano, a esquistossomose teve início, provavelmente, no século XVI, quando começaram a chegar ao nordeste do Brasil os primeiros escravos africanos para trabalhar na lavoura e no século XVII a São Paulo.

Nos dias atuais, a esquistossomose continua sendo um problema de saúde pública no Brasil, pois, segundo dados da FUNASA, nos anos de 1996 e 1997 e os dados de população de 18 estados da Federação no levantamento do IBGE, permitiram estimar em 7,1 milhões de portadores de esquistossomose em 1996 e 6,3 milhões em 1997 (KATZ & PEIXOTO, 2000). No mundo, o número de indivíduos infectados alcança a faixa de aproximadamente 200 milhões de pessoas que sofrem com severas consequências da infecção (WHO, 1998).

1.2 Patogenia e patologia geral da esquistossomose

O quadro reacional e a evolução do processo patológico provocado pelo *S. mansoni* no organismo do hospedeiro vertebrado varia consideravelmente, dependendo de circunstâncias que devem ser vistas como fatores importantes na determinação da gravidade da doença. Entre os fatores envolvidos, podemos citar a cepa do parasito, a carga cercariana e condições fisiológicas do material infectante, certas características do hospedeiro e seu meio, carga parasitária decorrente de infecções sucessivas ao longo dos

anos, duração da infecção e estágio evolutivo do parasita (ANDRADE et al, 1988; WYNN & CHEEVER, 1995).

A patologia da infecção pelo *S. mansoni* é predominantemente causada pela reação do hospedeiro aos ovos do parasita os quais, depositados pelas fêmeas nos vasos do intestino, são arrastados pela corrente sangüínea como êmbolos e ficam retidos nos finos ramos venosos dos espaços porta do fígado, principalmente. Nessas finas ramificações venosas portais, o ovo produz inflamação granulomatosa com destruição vascular. Após quatro dias, aumenta rapidamente o exsudato celular inicial, que passa a ser constituído por grande número de eosinófilos e macrófagos dispostos em torno do ovo, podendo conter, ainda, linfócitos e gigantócitos. Após algum tempo, os macrófagos começam a se organizar de modo concêntrico, ficam justapostos uns aos outros e formam interdigitações das membranas plasmáticas que favorecem o contato entre eles. O processo decorrente, que inicia-se pela proliferação de fibroblastos a partir da periferia do granuloma, com deposição de colágeno em sentido centrípeto em relação ao ovo, é a origem da fibrose periportal, podendo causar hipertensão portal, a maior causa de morbidade e mortalidade associadas com a esquistossomose (BOGLIOLO, 1957; ANDRADE, 1988; WYNN & CHEEVER 1995).

Quando vivo, o *Schistosoma mansoni* não parece induzir qualquer reação no hospedeiro, possuindo várias frações antigênicas que representam a eliminação de antígenos metabólicos. Em urina de hospedeiros maciçamente infectados com *S. mansoni*, aparece antígeno circulante com características que se assemelham às do antígeno polissacáride encontrado no tubo digestivo do parasito adulto. Provavelmente, quando esse antígeno é produzido em quantidade menor, ele é neutralizado por anticorpos ou digerido por células do sistema fagocítico mononuclear. Quando produzido em quantidades maiores, pode circular, ser excretado pela urina ou depositado nos glomérulos renais, causando uma

glomerulopatia. Após a morte do parasita, quase sempre este é levado ao interior do fígado, provocando reações inflamatórias extensas, determinando oclusão vascular focal, que pode ser reparada ou compensada rapidamente (ANDRADE, 1988), por não se tratar de lesão sistematizada e difusa, como aquela provocada pelos ovos.

O miracídio ou embrião existente no interior de ovos maduros, elimina secreções que têm ação lítica e irritante sobre os tecidos, favorecendo o aparecimento de granulomas periovulares, os quais, quando localizados na parede do intestino favorecem a abertura de passagem para eliminação dos ovos pelas fezes (ANDRADE, 1998).

1.3 Características da Esquistossomose mansônica crônica

A parasitose caracteriza-se pela presença de vermes adultos no sistema porta e veias mesentéricas do homem e de várias outras espécies de mamíferos. Nas formas mais graves, ocorre envolvimento hepatoesplênico, podendo desenvolver-se hipertensão porta, varizes esofágicas, hemorragia digestiva e morte (DE WITT & WARREN, 1959).

Na patologia hepática da esquistossomose mansônica crônica, os granulomas periovulares e a fibrose periportal são as lesões mais importantes. A primeira resposta do organismo animal às agressões sofridas pela presença dos vermes e deposição de seus ovos, é uma inflamação portal e difusa, podendo ocorrer necrose focal do parênquima (CHEEVER, 1986; QURASHI et al, 1999). O estágio exsudativo pré-granulomatoso é importante na patogênese da infecção esquistossomótica, causando histólise e microtromboses, especialmente no fígado, facilitando a disseminação metastática dos ovos de *S. mansoni* através das veias (LENZI et al., 1991; LENZI et al., 1998). A lesão granulomatosa da fase aguda difere da fase crônica, com granulomas volumosos, muito maiores, sendo predominantemente exsudativos, frequentemente exibindo zona central de necrose, em torno da qual as fibras colágenas são finas e frouxamente arranjadas em disposição concêntrica (RASO et al., 1978; SILVA et al., 2000).

Os granulomas que se formam em torno dos ovos do *Schistosoma mansoni* no tecido hepático são lesões essencialmente fibrosantes, compostas por vários tipos celulares como eosinófilos, macrófagos e linfócitos (RASO et al., 1983; ANDRADE, 1987; REIS et al., 2001). Os hepatócitos e células de Ito também assumem importante papel na fibrogênese. Citocinas fibrosantes são liberadas localmente pelas células e participam de vários processos, onde estimulam as células de Ito a se desfazerem de seus depósitos de gordura e se diferenciarem em miofibroblastos e fibroblastos (ANDRADE, 1998). O fenômeno dinâmico de síntese e degradação da matriz extracelular (MEC) ocorre em resposta ao estímulo produzido pelos ovos, resultando na síntese de fibras colágenas e proteínas estruturais (fibronectina, laminina, entactina), dispostas em abundante material amorfo formado, principalmente, por proteoglicanos (BURT, 1993).

A MEC é secretada por células que também são capazes de secretar enzimas que promovem sua degradação. Estas enzimas são chamadas de metaloproteinases e têm função de quebrar as moléculas de colágeno, proteoglicanos e elastina (ANDRADE, 1992). Quando ocorre uma síntese exagerada da matriz extracelular (durante processo inflamatório crônico ou de outra natureza), não acompanhada, na mesma intensidade, pela degradação, observa-se um acúmulo de MEC no tecido hepático, processo patológico ao qual se denomina de fibrose hepática (BURT, 1993).

A esquistossomose murina em linhagens isogênicas (camundongo “inbred”), proporciona um modelo útil para o estudo da influência do padrão genético no desenvolvimento da doença. As maiores manifestações da doença – formação de granulomas, hepatoesplenomegalia e hipertensão portal – podem ser medidas e

consideradas separadamente, no estudo da susceptibilidade à infecção (FANNING et al., 1981).

A forma avançada da esquistossomose é diagnosticada com segurança pela lesão hepática característica, consistindo no espessamento fibroso sistematizado dos espaços – porta, de onde se irradiam faixas de fibrose longas e finas, enquanto o parênquima hepático conserva sua aparência normal. A lesão macroscópica, em si, já é característica, porém assume maior significado microscopicamente, ao exibir vários graus de lesões inflamatórias destrutivas e obstrutivas dos ramos porta intra-hepáticos (ANDRADE & BINA, 1983).

LICHTENBERG E SADUN (1968) definiram as características anatômicas da fibrose periportal como sendo: fibrose estrelar sistematizada, macroscopicamente visível; parênquima hepático conservado, exceto pela área de fibrose portal central ou por cicatrizes pós-necróticas, preferencialmente ligadas ao parênquima subcapsular; função e estrutura dos hepatócitos aparentemente normais; no estágio ativo, infiltrado inflamatório periportal variável e de acordo com a área que contém ovos e granulomas, ou, no estágio tardio, tecido de reparação contendo cascas de ovos e pigmentos; radículas vasculares portais com lesões destrutivas.

1.4 Co-fatores envolvidos na patogenia da fibrose hepática da esquistossomose

Um dos principais fatores que levam à forma hepato-esplênica da esquistossomose no homem, é a alta carga parasitária. Contudo, outros co-fatores parecem estar envolvidos, pois estudos mostram que nem todos os indivíduos vivendo em áreas hiperendêmicas, aparentemente sob as mesmas condições epidemiológicas, desenvolvem esta forma da doença. Aspectos ligados à resistência as reinfecções, ao “background” genético do hospedeiro e ao equilíbrio hospedeiro-parasito no indivíduo, dentre outros fatores, certamente contribuem para o desenvolvimento dessa forma clínica (ANDRADE & BINA, 1983; ANDRADE et al, 1997).

Dentre os co-fatores provavelmente envolvidos na patogênese da esquistossomose hepato-esplênica no homem, atenção tem sido dada ao padrão genético do indivíduo, especialmente raça e fator HLA ou “Histocompatibility Leukocyte Antigen” (PRATA, 1992), com resultados até agora inconclusivos quanto à maior resistência da raça negra ao desenvolvimento da forma grave da parasitose. Além do padrão genético, a idade dos pacientes à época da primeira infecção, a frequência da exposição às águas contaminadas, a falha na produção de anticorpos anti-idiotípicos e o estado de desnutrição do hospedeiro, têm sido apontados como co-determinantes na evolução da infecção para as formas clínicas graves da parasitose. Os resultados têm sido tão variados, que a necessidade de obtenção de um bom modelo experimental é reconhecida de modo indiscutível.

A fibrose hepática observada na esquistossomose murina assemelha-se à fibrose de Symmers que ocorre no homem, caracterizando-se por ser uma fibrose primária típica, que envolve essencialmente os espaços-porta, sem lesões severas do parênquima hepático. Este modelo experimental foi desenvolvido por WARREN & DE WITT (1958) e posteriormente estudado com detalhes por ANDRADE & WARREN (1964) e ANDRADE & CHEEVER (1993).

No modelo murino, camundongos eutróficos “outbred” submetidos a reinfecções sucessivas pelo *S. mansoni* apresentam maior tendência ao desenvolvimento da fibrose periportal, em comparação com animais controles, submetidos a uma única infecção (SANTOS et al, 2000). Porém é preciso que a fibrose periportal tenha sido instalada, para que os ovos do parasita se concentrem em grandes espaços portais.

HENDERSON e colaboradores (1993), trabalhando com camundongos eutróficos, machos, da linhagem isogênica CBA/J, na fase crônica da infecção com *S. mansoni*, observaram fibrose periportal e acentuada esplenomegalia em 19 a 24% dos animais, detectando diferenças imunológicas entre os que desenvolveram a lesão e os que apenas apresentaram granulomas periovulares esparsos pelo parênquima hepático, com moderada esplenomegalia.

1.5 Esquistossomose mansônica e resposta imune

A reação em torno do ovo, descrita como manifestação de hipersensibilidade tardia (WARREN, 1966), é observada no homem e em outros hospedeiros susceptíveis, havendo porém, variações na sua morfologia, dependendo do tempo de infecção e da espécie animal estudada, parecendo guardar relação com o sistema imunológico e o estado de nutrição do hospedeiro considerado (WARREN, DOMINGO & COWAN, 1967).

As secreções liberadas pelos miracídios são compostas por enzimas proteolíticas e complexas frações de predominância glicoprotéica, altamente sensibilizantes, cujos

componentes induzem o aparecimento de variados anticorpos e células imunes sensibilizadas. O chamado "antígeno ovular solúvel" (SEA = serum egg antigen) é um estimulante direto da proliferação fibroblástica "in vitro", podendo, também, estimular linfócitos T sensibilizados, os quais por sua vez, estimulam macrófagos, levando-os a secretarem fatores indutores da proliferação fibroblástica com formação de colágeno (ANDRADE, 1999).

Os mecanismos imunológicos envolvidos na inflamação crônica esquistossomótica vêm sendo muito estudados nos últimos anos. A formação dos granulomas é decorrente da resposta imune mediada por células, processo este dependente de células T CD4+, que produzem linfocinas dos padrões Th1 e Th2 (BOROS & WHAITFIELD, 1999). Diversos estudos sobre a imunorregulação desta resposta têm procurado esclarecer a participação dessas citocinas na formação e controle das lesões (WYNN & CHEEVER, 1995). Os dados obtidos têm demonstrado que citocinas do padrão Th1, mediam, principalmente, o estágio associado à imunidade celular e hipersensibilidade do tipo tardio (SHER et al., 1991), enquanto que as citocinas do padrão Th2 relacionam-se à produção de anticorpos, desempenhando também, importante papel na formação do granuloma com grande concentração de células inflamatórias e maior deposição de componentes da matriz extracelular do que ocorre na resposta Th1 (CHEEVER et al., 1992; WYNN & CHEEVER, 1995). No modelo experimental murino, as funções das citocinas dos diferentes padrões encontram-se bem definidas, o mesmo não ocorrendo no homem, onde não se evidencia a polarização das respostas imunes (FALLON, 2000). Por inúmeras razões, torna-se difícil a análise do papel das citocinas na fibrose hepática do homem: 1º) porque esta análise deve ser feita em áreas onde os indivíduos estejam sob as mesmas condições de exposição ao parasito; e 2º) porque devem ser realizadas em pacientes com a forma ativa inicial da infecção, em lugar de pacientes com a forma tardia. Essas análises devem avaliar, também, covariáveis não imunológicas

que podem confundir os resultados (FRIEDMAN, 1999). Estudos mais aprofundados fazem-se necessários, com utilização de modelos experimentais, para que seja possível a obtenção de futuras vacinas, com base no conhecimento de atuação dessas citocinas, o que possibilitará controlar manifestações imunológicas relacionadas com a deposição de ovos nos tecidos de hospedeiros infectados.

1.6 Esquistossomose em modelos experimentais

Animais de laboratório vêm sendo bastante utilizados em estudos que necessitam da utilização de modelos experimentais, com o objetivo de avaliar alterações patológicas, imunopatológicas e patofisiológicas resultantes de infecções por diferentes agentes que agridem o homem. Esses estudos são realizados de forma ética e moral com relação ao uso do animal e são propostos visando esclarecer aspectos patogénéticos ou ensaiar novas drogas para tratamento e cura de doenças (LUCA et al., 1990).

Os trabalhos experimentais sobre a esquistossomose mansônica têm trazido grande contribuição ao conhecimento da patologia, patogenia e fisiopatologia da parasitose, nas suas fases aguda e crônica (CHEEVER et al., 2002).

Dentre os modelos experimentais utilizados, particularmente no que se refere à reprodução da fibrose hepática esquistossomótica destacam-se macacos (chimpanzé-SADUM et al., 1970; LICHTENBERG et al., 1971; babuíno-DAMIAN et al., 1976; FARAH et al., 2000), coelhos (CHEEVER et al., 1980), porcos (HURST et al., 2000) e camundongos (DE WITT & WARREN 1958; ANDRADE & WARREN, 1964; CHEEVER, 1965; WARREN, 1966; ANDRADE, 1987; ANDRADE & CHEEVER, 1993; HENDERSON et al., 1993; COUTINHO et al., 1997, 2002).

A reprodução experimental da fibrose periportal esquistossomótica foi obtida em macacos chimpanzés intensamente infectados com *S. mansoni* e *S. japonicum*, porém esse modelo apresenta muitas limitações, tais como: custo elevado, difícil manuseio, requerendo

elevadas cargas cercarianas (250 a 2000) e longos períodos de infecção (36 meses) para desenvolvimento da lesão (SADUN et al., 1970; LICHTENBERG et al., 1971). Coelhos infectados com *S. japonicum* produzem extensa fibrose portal e septal e também cirrose hepática, mas apresentam problemas quanto à reprodução da esquistossomose mansônica, pois neles a carga parasitária se reduz consideravelmente com o passar do tempo, os ovos não amadurecem nos tecidos (e por isso não têm ação patogênica), nem aparecem nas fezes, o que dificulta o acompanhamento da infecção (CHEEVER et al., 1980).

No estudo da esquistossomose mansônica, os animais classicamente utilizados têm sido os camundongos (CAPRON et al.; 1982), por serem animais de baixo custo, fácil reprodução e fácil manutenção no laboratório. Por outro lado, atendem ao pré-requisito de um bom modelo, por permitirem a reprodução da infecção de forma regular e característica (CRAM & BOZICEVICH, 1914; CRAM & FILES, 1917; LEIPER, 1918; CRAM & FIGGAT, 1947; SCHUBERT, 1948; MACHADO E SILVA et al., 1991).

Camundongos albinos Swiss eutróficos infectados pelo *S. mansoni* apresentam granulomas periovulares esparsamente distribuídos no parênquima hepático e lesões porto-venosas obstrutivas semelhantes às que são encontradas no homem. A infecção em modelo murino produz uma hipertensão portal relacionada à quantidade e tamanho dos granulomas (WARREN & DE WITT 1958), porém estes fatores, provavelmente, não são suficientes para a manutenção da hipertensão portal humana (CHEEVER, 1965). Outros fatores ainda mal conhecidos parecem influir na reatividade por parte de alguns hospedeiros, levando ao desenvolvimento dessa patologia (FLANNERY, 2003).

Em camundongos eutróficos, a formação de fibrose homóloga da fibrose de Symmers do homem ocorre em cerca de 30-50% dos animais “outbred”, em infecções prolongadas e de pequena intensidade (ANDRADE & WARREN, 1964; ANDRADE & CHEEVER, 1993).

1.6.1 Camundongos isogênicos

Visando estudar o papel do “background” genético em relação a aspectos da patologia e da resposta do hospedeiro vertebrado, FANNING e colaboradores (1981) compararam as alterações da doença que ocorrem na infecção crônica das linhagens de camundongos isogênicos C57BL/6 e BALB/c. Verificaram que a reação do hospedeiro aos ovos injetados na veia porta ocorre no primeiro dia de infecção, embora granulomas completamente formados só sejam encontrados a partir de 48 horas após sua injeção.

Infecções realizadas em diferentes linhagens de camundongos isogênicos de ambos os sexos, também relatam diferenças entre os animais no desenvolvimento da infecção e da doença. Em geral, é visto que camundongos fêmeas desenvolvem resposta celular e humoral maior do que os machos (ELOI-SANTOS et al., 1992), possuindo altos níveis de imunoglobulinas, particularmente IgM (AHMED et al., 1985) e apresentando elevada sensibilidade ao desenvolvimento de vermes adultos. Em infecções subcutâneas de 45 cercárias em camundongos machos e fêmeas, ocorre maior mortalidade das fêmeas, as quais desenvolvem quantidade maior de parasitos adultos e infecções patentes. Infecções com características semelhantes ocorrem não só em camundongos CBA/J como também nas linhagens C57BL/10 e em camundongos outbred CF1 (ELOI-SANTOS et al, 1992).

COLLEY & FREEMAN (1980) examinaram a variação da resistência individual de camundongos CBA/J e C57BL/6, sem considerar os mecanismos imunológicos básicos como sendo a base de proteção induzida por uma infecção primária. Os autores verificaram que a carga de vermes adultos abrigados nesses camundongos correlaciona-se com o grau de resistência a novas infecções. Contudo, esta correlação variou com o tempo de infecção e entre cada uma das linhagens, além do que o tamanho do granuloma hepático formado variou inversamente à carga parasitária detectada em cada linhagem. CHEEVER et al (1983),

examinando as mesmas linhagens de camundongos, verificaram que o número de ovos por pares de vermes, nos tecidos, aumentava regularmente com o tempo da infecção, não havendo diferença entre as linhagens estudadas, exceto nas 52ª semana de infecção, quando maior quantidade de ovos foi encontrada em camundongos C57BL/6.

Linhagens distintas de camundongos também diferem na resposta do tecido hepático aos ovos do *S. mansoni*. CHEEVER e colaboradores (1987) encontraram acentuadas diferenças quanto à extensão da fibrose hepática entre linhagens diferentes de camundongos como é o caso dos camundongos C57BL/6, que apresentaram uma resposta fibrótica pelo menos cinco vezes mais baixa do que camundongos outbred ICR.

1.7 Esquistossomose no hospedeiro vertebrado desnutrido

Desnutrição e esquistossomose são problemas de Saúde Pública que ocorrem simultaneamente em muitas regiões endêmicas do Brasil e do mundo. Apesar das sucessivas tentativas de controle e das conquistas até agora obtidas no combate à doença, o controle da esquistossomose ainda representa um desafio, mantendo-se a endemia com elevadas taxas de prevalência em nosso país e em outras regiões do mundo (ANDRADE, 1998; FERREIRA, 1991). No Nordeste do Brasil, o emprego em larga escala de quimioterapia tem sido apontado como um dos fatores responsáveis pela redução das formas graves, letais, da doença (WHO, 1993). Paralelamente, as prevalências humanas e o estabelecimento de novos focos de transmissão ativa da parasitose continuam em expansão fazendo com que a endemia assuma uma expressão cada vez mais cruel: menos letal, porém incapacitante (BARBOSA, SILVA & BARBOSA, 1996).

A deficiência proteica é o principal problema nutricional do Brasil e de vários países do mundo, principalmente nas regiões mais pobres (COUTINHO et al., 1992), onde mais de dois terços dessas populações são vítimas de desnutrição, sendo grande parte das mesmas representada por crianças em idade pré-escolar (BERG, 1976; BATISTA FILHO, 1976;

MARCONDES, 1976). Uma desnutrição severa é definida por altura e peso abaixo de 70%, de acordo com padrões internacionais, ou pela presença de edema em crianças clinicamente desnutridas, caracterizando a forma clínica de “kwashiorkor” (BEAUFRERE et al, 1998) da desnutrição protéico-energética.

Indivíduos com má nutrição protéico-energética são geralmente infectados por parasitas e acometidos por vários tipos de infecção gastrointestinal. (ROSENBERG & BOWMAN, 1984; HALL, 1985; LUNN & NORTHROP-CLEWES, 1993). Sabe-se que as infecções são acompanhadas de ampla variedade de sintomas gerais e específicos, muitos dos quais têm relação com o estado nutricional do indivíduo. Manifestações clínicas, tais como náuseas, vômitos e diarreia podem influenciar, de modo sensível, a ingestão alimentar, alterando o estado nutricional, pois as infecções pioram as deficiências dietéticas e, por sua vez, a má nutrição afeta as defesas corporais (COUTINHO, 1980)

A literatura médica registra numerosos estudos que indicam que o déficit de crescimento médio é frequentemente devido a doenças infecciosas causadas por parasitas, principalmente por *S. mansoni* (COUTINHO, 1979; STEPHENSON, 1993) e vem se agravando como decorrência de vários fatores determinantes da exclusão social dessas populações (COUTINHO et al., 1997), tais como falta de disponibilidade e baixo grau de consumo dos alimentos. A esquistossomose, nas regiões endêmicas, assume papel importante, restringindo a utilização biológica dos alimentos, especialmente pelas lesões hepáticas e intestinais que provoca nos indivíduos infectados (BATISTA FILHO & BARBOSA, 1985).

Estudos em animais com depleção protéica têm revelado uma reação diminuta à presença de microorganismos patógenos e reduzida capacidade de se recuperarem ou desenvolverem imunidade contra agentes infecciosos (COUTINHO-ABATH et al., 1962).

A reprodução experimental da desnutrição proteico-energética do tipo marasmático foi obtida em camundongos infectados com *S. mansoni*, após administração de

dieta baseada em inquéritos alimentares de populações residentes em áreas endêmicas de esquistossomose mansônica no Nordeste brasileiro (COUTINHO, 1980; COUTINHO et al., 1997). Camundongos albinos Swiss "outbred", mantidos em dieta multideficiente, essencialmente hipoprotéica e submetidos a infecções de pequena intensidade com *S. mansoni*, após 16 semanas, não desenvolvem a lesão equivalente à fibrose humana de Symmers, verificada em 30 a 50% dos controles eutróficos (ANDRADE & WARREN, 1964; ANDRADE & CHEEVER, 1993).

Estudos publicados por COUTINHO (1976, 1980), baseados tanto em pesquisas em animais de laboratório como em populações humanas, sugerem que a simples melhoria do estado nutricional das populações pode representar recurso eficaz, na profilaxia e tratamento dessa e de outras parasitoses (COUTINHO et al., 1997; FERREIRA & COUTINHO, 1999).

O estudo do desenvolvimento das lesões hepáticas em linhagens diferentes de camundongos isogênicos desnutridos e infectados pelo *S. mansoni*, é importante na busca de novos fatores que levem ao entendimento dos mecanismos envolvidos na formação das lesões no hospedeiro humano desnutrido. A utilização de animais isogênicos, possuidores de "background" genético mais homogêneo e mais sensíveis que os animais "outbred", pode representar instrumento adequado para estudos sobre morfologia e morfogênese das lesões hepáticas, sobretudo em relação ao componente fibroso das mesmas.

2. OBJETIVOS

2.1. GERAL - Estudar a morfologia das lesões hepáticas em camundongos de linhagens isogênicas (BALB/c; C57BL/10) desnutridos e eutróficos, infectados com *S. mansoni*, em comparação com camundongos “outbred” submetidos às mesmas condições.

2.2. ESPECÍFICOS

- Estudar o aspecto, dimensão e composição dos granulomas periovulares à microscopia óptica, em camundongos isogênicos e “outbred”, desnutridos e eutróficos, infectados pelo *S. mansoni*.
- Caracterizar a fibrose periportal, à microscopia óptica, nos animais acima mencionados.
- Determinar o teor hepático de colágeno em camundongos isogênicos desnutridos, comparando-o com o de camundongos “outbred” também desnutridos, infectados pelo *S. mansoni*.
- Quantificar o número de vermes que se desenvolvem em camundongos isogênicos desnutridos, comparados com camundongos “outbred” desnutridos e eutróficos.
- Correlacionar os pesos do fígado e do baço com a quantidade de tecido fibroso e de ovos encontrados no fígado, nos diferentes grupos.
- Correlacionar peso corporal e quantidade de tecido fibroso no fígado, em camundongos isogênicos e “outbred”, desnutridos e eutróficos, infectados pelo *S. mansoni*.
- Caracterizar a evolução ponderal, dos animais, em função da linhagem do camundongo, do seu estado nutricional e da infecção pelo *S. mansoni*.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. ANIMAIS - Camundongos isogênicos (C57BL/10, BALB/c) de sexo feminino, pesando entre 13 e 15g, desmamados aos 21 dias e mantidos em gaiolas individuais, em condições padronizadas de temperatura e luminosidade. Como controles, foram usados camundongos albinos Swiss "outbred" (Fig. 1C) do mesmo sexo, idade e peso, submetidos a idênticas condições.

As linhagens isogênicas (Fig. 1 A,B) foram oriundas do Centro de Criação de Animais de Laboratório (CECAL) da Fundação Oswaldo Cruz / M.S (Rio de Janeiro) e mantidas em Biotério Experimental da FIOCRUZ-Recife (Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães), onde todo o experimento foi realizado, com o apoio do Laboratório de Imunopatologia do Departamento de Imunologia do mesmo Centro.

3.2. DIETAS E ESTADO NUTRICIONAL DOS ANIMAIS - A desnutrição foi induzida pela administração de dieta multideficiente, essencialmente hipoprotéica (DBR- 7,87% de proteína), baseada no padrão dietético de populações humanas de áreas endêmicas de esquistossomose do Nordeste do Brasil (COUTINHO, 1976; TEODÓSIO et al., 1990; COUTINHO, FREITAS & ABATH,1992). Como dieta controle foi usada a ração comercial NUVILAB (Nuvital Nutrientes Ltda, Colombo, Paraná, Brasil), contendo 22% de proteína (Tabela I).

O estado nutricional foi avaliado através da determinação semanal do peso corporal e da observação do comportamento e aspecto clínico dos animais (pelos amarelados, rarefeitos, inapetência, etc.).

TABELA I

COMPOSIÇÃO CENTESIMAL DA DIETA BÁSICA REGIONAL (*)

Ingredientes	G%	COMPOSIÇÃO CENTESIMAL					
		Proteínas	Carboidratos	Gordura	Minerais	Fibras	Kcal%
Feijão mulatinho	18,34	3,99	10,66	0,24	0,57	1,09	60,76
Farinha de mandioca	64,81	0,84	48,59	0,12	0,43	5,64	198,80
Charque	3,74	2,74	0,43	0,06	0,06	-	14,57
Gordura de charque	0,35	-	-	0,35	-	-	3,15
Batata doce	12,76	0,30	9,99	0,03	0,20	0,48	58,87
Total	100,00	7,87	69,24	0,80	1,26	7,21	336,15

NDpCal% 5,64

(*) COUTINHO, E.M.; SOUZA, M.M.; SILVA, L.M.; CAVALCANTI, C.L.; ARAÚJO, R.E.; BARBOSA JR., A. A.; CHEEVER, A. W & ANDRADE, Z. A. – Int. J. Exp. Path., 78: 337-342, 1997.

3.3. INFECÇÃO – A infecção foi realizada por via percutânea, com 30 cercárias de *S. mansoni* recentemente emitidas e obtidas de exemplares de *Biomphalaria glabrata* criados em laboratório e infectados com a cepa SLM (São Lourenço da Mata- Pernambuco) de *Schistosoma mansoni*. A infecção foi realizada 4 semanas após o início da respectiva dieta, em cada grupo. Após 40 dias, exame parasitológico das fezes dos camundongos era realizado (método de HOFFMAN, PONS & JANER, 1934) para confirmação da positividade da infecção. O período total de infecção foi de 20 semanas.

3.4. GRUPOS EXPERIMENTAIS - Incluíram de 11 a 20 animais por grupo**, assim distribuídos:

GRUPO A – Desnutridos isogênicos infectados:

- A1 - BALB /c – 19 camundongos
- A2 - C57 BL /10 – 22 camundongos

GRUPO B – Eutróficos isogênicos infectados:

- B1 - BALB /c – 21 camundongos
- B2 - C57 BL /10 – 21 camundongos

GRUPO C1 – Desnutridos outbred infectados – 11 camundongos

GRUPO C2 – Eutróficos outbred infectados – 12 camundongos

** Os grupos isogênicos compunham-se, inicialmente, de 25 camundongos, enquanto que os grupos controles “outbred” eram compostos de 15 animais, não tendo todos sobrevivido até o final do experimento.

3.5. ESTUDO PARASITOLÓGICO

Após vinte semanas de infecção, os animais foram pesados e sacrificados por deslocamento cervical. Os camundongos foram perfundidos pela técnica de DUVALL & DE WITT (1967), para coleta de parasitos e sua separação por sexo, nos diferentes grupos. Fígado e baço foram removidos e pesados. Amostras de fígado foram colocadas em KOH a 4% para contagem de ovos após digestão cáustica (CHEEVER, 1970).

3.6. ESTUDO BIOQUÍMICO

Outra amostra de fígado foi usada para dosagem espectrofotométrica da hidroxiprolina e quantificação do colágeno hepático (BERGMAN & LOXLEY, 1963). Estes fragmentos, pesando entre 100 e 250mg, foram fixados em formol e colocados em 5ml de ácido clorídrico 6N, a uma temperatura de 110°C em estufa por 18 horas, para serem hidrolisados. Após hidrólise, acrescentou-se 5 ml de água destilada e, em seguida, procedeu-se à filtração. Foram coletados 2ml do sobrenadante de cada amostra para posterior neutralização, colocando-se 1 gota de fenolftaleína a 1%, adicionando-se solução de hidróxido de sódio (NaOH-10N) e ácido clorídrico (HCl-3N), sendo o volume ajustado para 4ml. A etapa seguinte baseou-se em ensaio colorimétrico, onde alíquotas (200 µl) das amostras foram acrescidas de álcool isopropanol (400 µl), procedendo-se, em seguida, à oxidação com a solução A (Cloramina T+ tampão citrato acetato). As amostras foram incubadas com o reagente de Erlich em banho-maria a 60°C por 25 minutos, realizando-se a leitura da densidade óptica com o comprimento de onda a 558nm. Os dados coletados foram aplicados a um programa computadorizado, que fornece a quantidade de hidroxiprolina em micromol por grama de fígado.

3.7. ESTUDO HISTOLÓGICO E MORFOMÉTRICO – Outra amostra de fígado (lobo esquerdo) foi fixada em Bouin para estudo histológico e mensuração dos granulomas e da área ocupada pelo tecido fibroso, após colorações pela hematoxilina - eosina e pelo picro-sírius red para evidenciação do colágeno (JUNQUEIRA et al., 1979), usando-se para estudo morfométrico um computador com Sistema semi-computadorizado utilizando “software” para Processamento e Análise de Imagens (Windows Country ,LEICA Qwin Standard 2.6), acoplado a câmara digital DC300F da Leica Microsystems Imaging Solutions Ltd, Cambridge, UK e esta a um Microscópio Óptico Leica. O Sistema foi calibrado para

vermelho de 0-255, verde de 0-208, azul de 0-240, ampliação de 100x. Dez animais foram aleatoriamente escolhidos para avaliação morfométrica, em cada grupo. Para cada caso foram examinados cinco campos também escolhidos aleatoriamente ($885.303 \mu\text{m}^2$), num total de $4.426.515 \mu\text{m}^2$. Os seguintes parâmetros morfométricos foram considerados: volume, densidade de volume e densidade numérica dos granulomas, área percentual de fibrose hepática.

O volume dos granulomas foi calculado usando a fórmula para cálculo do volume da esfera ($V_e = \pi.R^3$, onde R= raio do granuloma e $\pi = 3,1416$). A densidade de volume é o quociente da área total ocupada pelos granulomas, dividido pelo somatório total da área seccional medida por animal de cada grupo. A densidade numérica é representada pelo número de granulomas por unidade de volume do fígado, sendo obtida através da fórmula de Weibel (WEIBEL, 1969), onde:

$$N_n = 0,77 \times \frac{\sqrt{N}^{1,5}}{V_v^{0,5}}$$

Sendo: N = nº de granulomas no compartimento estudado

V_v = densidade de volume

3.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA – Foi realizada com o auxílio dos programas SSP e EXCEL (Microsoft- USA) . As diferenças entre os grupos foram determinadas por análise de variância (ANOVA), complementada pelos testes de Tukey e Tamhane, Qui-Quadrado de Person do programa EPI-INFO 6.04. Foram considerados estatisticamente significativos valores de $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1. ESTUDO MORFOLÓGICO DO FÍGADO

4.1.1- Dados macroscópicos

A tabela 2 mostra a relação percentual entre o peso do fígado e do baço e o peso corporal dos animais de cada grupo, no momento do sacrifício. Verificou-se que os animais dos grupos eutróficos apresentaram as maiores médias, tanto em relação ao fígado como ao baço, quando comparados aos animais desnutridos de mesma linhagem.

TABELA 2: Relação entre peso corporal e peso do fígado/ baço de camundongos isogênicos desnutridos e eutróficos (BALB/c e C57BL/10) infectados com *Schistosoma mansoni*, em comparação com seus respectivos controles “outbred”

Grupos experimentais	N.º de camundongos	Peso fígado/peso corporal (%) (X ±EPM)	Peso baço/peso corporal (%) (X ± EPM)	Sig p<0,05
A-1 Desnutridos BALB/c	19	4,58 ± 0,28	0,89±0,15	A1 X B1 ^a A1 X B2 ^a
B-1 Eutróficos BALB/c	21	5,80 ± 0,14	1,21±0,06	A1 X C1 ^{a b} A2 X B1 ^{a b} A2 X B2 ^a
A-2 Desnutridos C57BL/10	22	4,81 ± 0,16	0,67±0,05	A2 X C2 ^a B1 X C1 ^{a b} B2 X C1 ^{a b}
B-2 Eutróficos C57BL/10	21	6,94 ± 0,25	0,98 ± 0,09	C1 X C2 ^{a b} B2 X C1 ^b C1 X C2 ^b
C-1 Desnutridos SWISS (outbred)	11	3,77 ± 0,3	0,4 ± 0,03	
C-2 Eutróficos SWISS (outbred)	12	7,19 ± 0,45	1,06 ± 0,15	

a Diferenças significantes para fígado/ peso corporal

b Diferenças significantes para baço/peso corporal/ EPM= Erro Padrão da Média

4.1.2 HISTOPATOLOGIA

Camundongos isogênicos desnutridos – Os camundongos de linhagem BALB/c desenvolveram numerosos granulomas periovulares isolados, de pequenas dimensões, às vezes coalescentes, predominando de modo absoluto aqueles em fase de involução fibro-colágena, centralizados por ovos de *S. mansoni* contendo miracídio em desintegração ou apenas fragmentos de cascas de ovos. Dependendo do estágio de degradação do embrião existente no interior do ovo, células de inflamação aguda (polimorfonucleares) e macrófagos podiam ser observados na periferia da reação granulomatosa. Em alguns casos, finos tratos fibrosos eram vistos conectando entre si granulomas colagenizados ou espaços-porta (Fig.13). Hepatite esquistossomótica residual não foi detectada nesse grupo. Mini-focos de necrose coagulativa aguda do parênquima e esteatose periportal (Fig.12) foram lesões também observadas.

Nos camundongos de linhagem C57BL/10, os granulomas além de serem de tamanho reduzido, exibiam estrutura mais celular (Figs. 19, 20) e menos colagenizada do que os animais da linhagem anterior. Era freqüente a presença de intensa infiltração inflamatória aguda, não apenas nos espaço-porta, como também no parênquima hepático, formada por polimorfonucleares neutrófilos e numerosos eosinófilos. O colágeno depositado era menos abundante, tendo aspecto fibrilar, pouco denso. Em dois animais, desenvolveram-se conexões fibrosas entre os espaço-porta e os granulomas, sugerindo lesão evolutiva (Figs. 21, 22, 23) para fibrose esquistossomótica murina típica, além da formação de granulomas isolados; em dois outros, foram detectadas imagens características da fibrose “pipestem-like” do camundongo (Fig. 18). Os mini-focos de necrose coagulativa do parênquima foram mais raros do que nos camundongos da linhagem BALB/c.

A metamorfose gordurosa (esteatose) de células hepáticas apresentava-se com distribuição ora periportal, ora difusa, sendo bastante acentuada em alguns casos.

Camundongos isogênicos eutróficos – Os camundongos da linhagem BALB/c desenvolveram granulomas isolados, geralmente do tipo fibro-colágeno (Fig. 8), centralizados por restos de miracídios ou cascas de ovos, às vezes coalescentes ou apresentando conexões fibrosas entre si ou com espaços-porta, causando alargamento dos mesmos (Fig.9,10). Focos de necrose coagulativa aguda (Fig.11) também foram observados. Endoflebite granulomatosa polipoide foi outro achado histológico nesse grupo.

Nos animais da linhagem C57BL/10, as conexões fibrosas entre os granulomas pareciam mais freqüentes (Figs. 16, 17) e a infiltração inflamatória mais intensa (Fig. 15) do que nos camundongos da linhagem BALB/c, observando-se, inclusive, a presença de maior número de granulomas periovulares com estrutura mais exsudativa (Fig. 14) do que produtiva. Mini-focos de necrose coagulativa aguda do parênquima eram eventualmente observados.

Camundongos Swiss outbred (controles) – Os camundongos eutróficos exibiam, com certa freqüência, áreas de necrose parenquimatosa isquêmica, com reação inflamatória aguda. Os granulomas encontravam-se em fase de modulação imunológica, estando a maioria colagenizada (Fig. 5), depositando-se o colágeno, principalmente, em torno do ovo. Espaços-porta infiltrados por linfócitos, plasmócitos, macrófagos e alguns polimorfonucleares. Presença de gigantócitos na estrutura de vários granulomas periovulares, invadindo o ovo e digerindo o miracídio em desintegração. Alguns desses animais mostraram espaços-porta espessados, às vezes com prolongamentos fibrosos, vasos neoformados e hiperplasia biliar, com concentração de granulomas (Figs. 3,4).

No grupo dos desnutridos, os granulomas apareciam isolados, de tamanho reduzido, muitos ainda em fase exsudativa (Fig.7); a infiltração inflamatória aguda (polimorfonucleares, inclusive eosinófilos) ocorria em vários espaços-porta; o colágeno depositado era de aspecto fibrilar e menos abundante (Fig. 6) e imagens de endoflebite podiam ser observadas

em vênulas portais, em relação com a formação de granulomas em torno de ovos em involução.

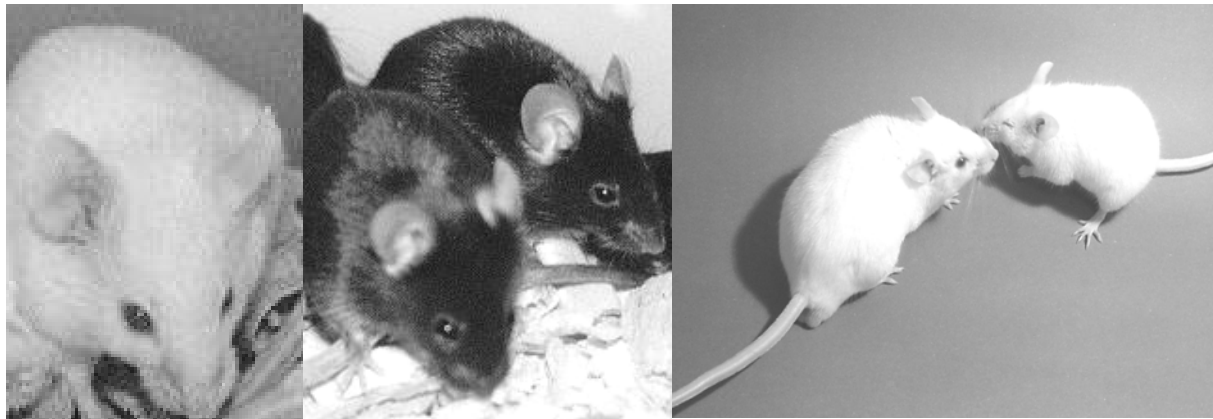


Fig. 1 – Camundongos isogênicos das linhagens BALB/c (A), C57BL/10 (B) e seus controles Swiss (C).

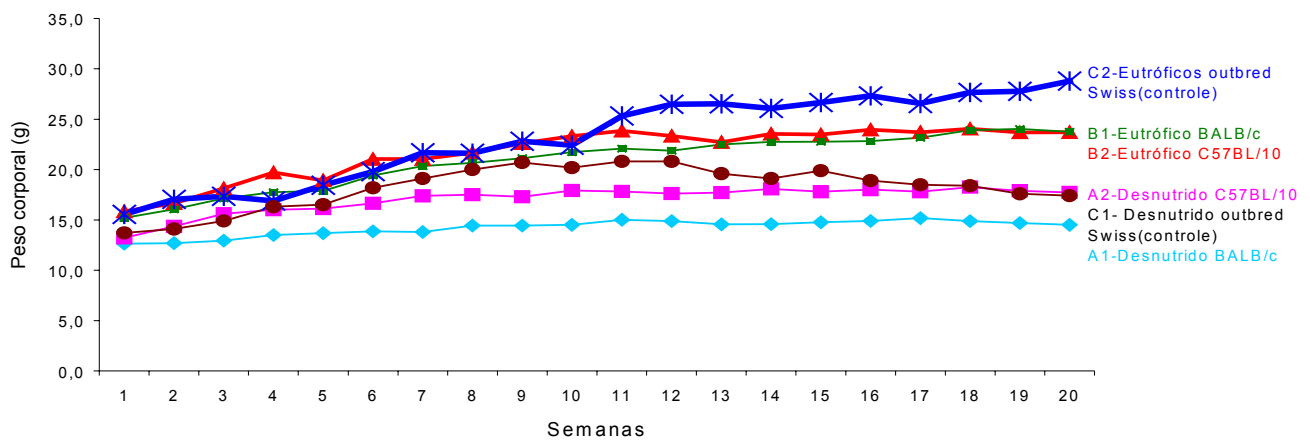


Fig. 2 - Curvas ponderais de camundongos isogênicos desnutridos e eutróficos (BALB/c e C57 BL/10) infectados com *Schistosoma mansoni*, comparados aos seus respectivos controles “outbred” Swiss.



Fig. 3 – Aspecto macroscópico da fibrose “clay pipestem” (fibrose de Symmers) do homem (superfície de corte).

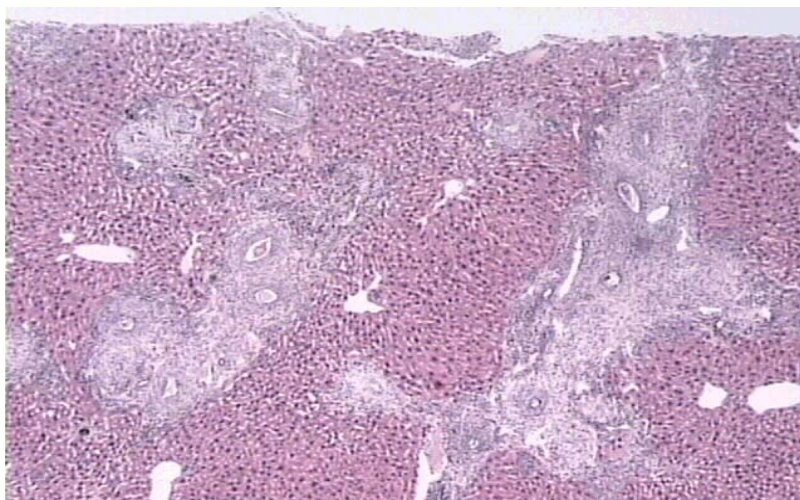


Fig. 4 –Aspecto geral da fibrose “pipestem – like” no camundongo bem nutrido. 50x -HE. Camundongo Swiss “outbred”.

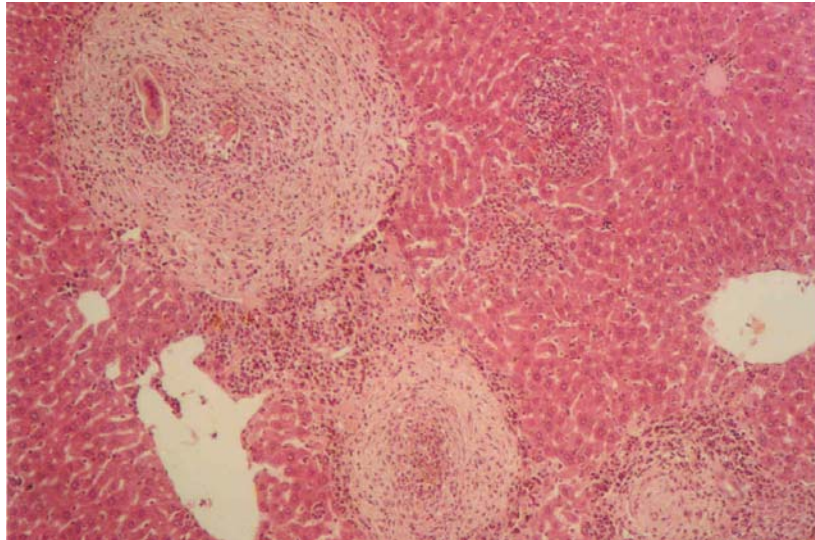


Fig. 5 –Granulomas isolados, de tamanho diferentes, com acentuada colagenização, em torno de cascas de ovos de *S. mansoni* contendo restos de miracídio em desintegração. Alguns polimorfonucleares ainda podem ser vistos na porção mais central do granuloma. 100x – HE. Camundongo Swiss “outbred” (eutrófico).

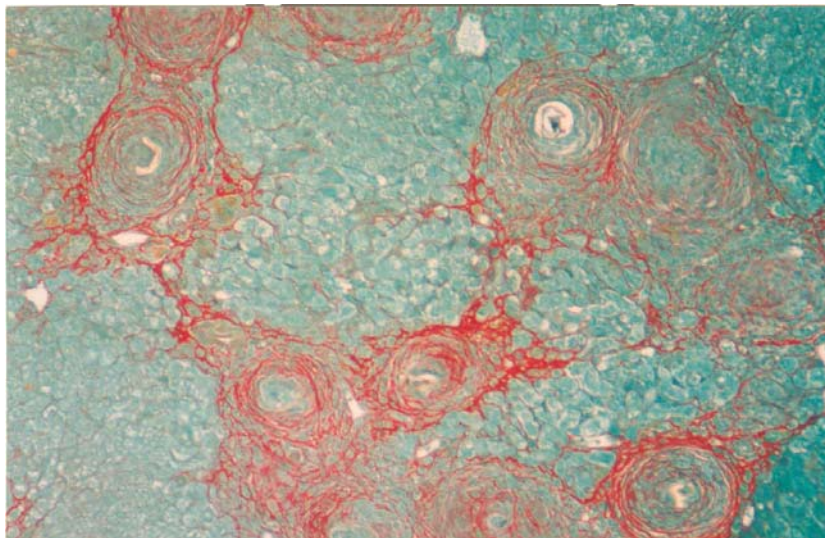


Fig. 6 - Granulomas periovulares de pequeno tamanho, com fraca deposição de colágeno na periferia dos mesmos. Apenas discretas conexões fibrosas são vistas entre os granulomas. 100x – Picrosirius-red. Camundongo Swiss “outbred” (desnutrido).

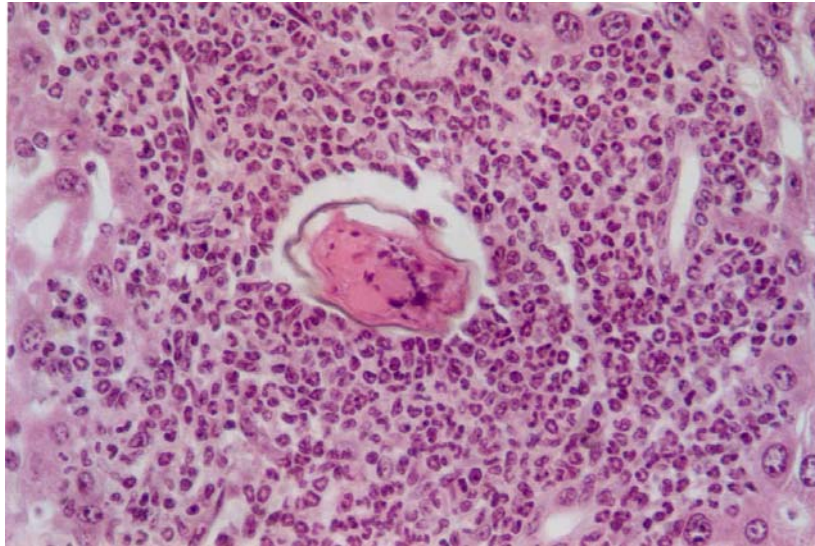


Fig. 7– Granuloma periovular com intensa reação exsudativa e presença de polimorfonucleares (eosinófilos). 400x HE. Camundongo Swiss “outbred” (desnutrido).

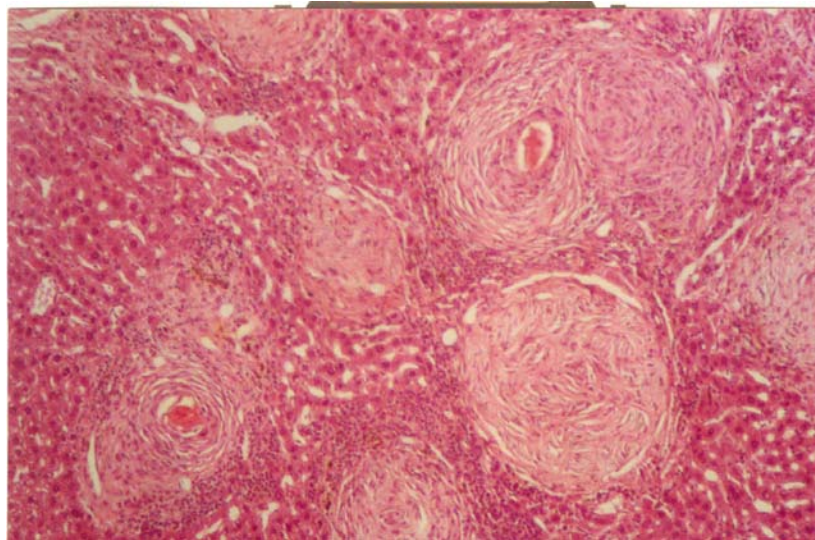


Fig. 8 –Granulomas periovulares isolados, bem collagenizados. 100x HE. Camundongo isogênico BALB/c (eutrófico).



Fig. 9 — Conexões fibrosas unindo granulomas periovulares e espaço-porta entre si. 50x Picrosirius-red. Camundongo isogênico BALB/c (eutrófico).

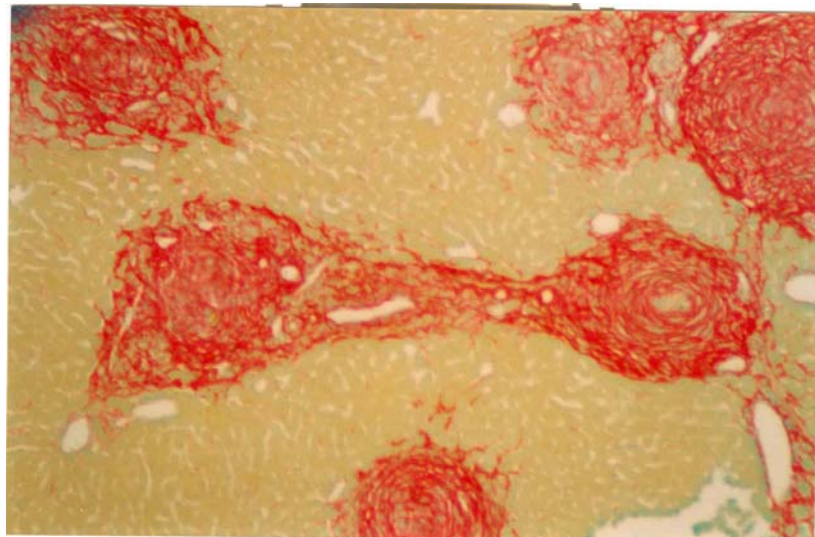


Fig. 10 - Conexão fibrosa entre espaços-porta vizinhos, espessados pela presença de granulomas periovulares. 100x Picrosirius-red. Camundongo isogênico BALB/c (eutrófico).

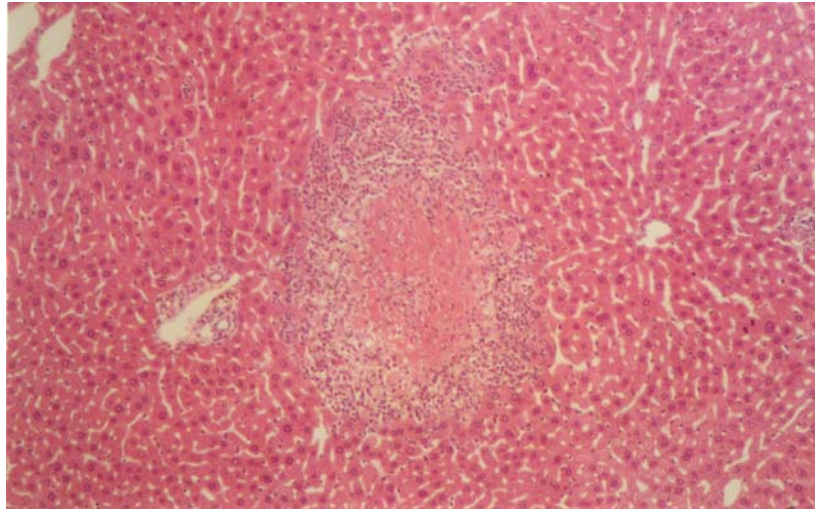


Fig. 11 - Foco de necrose coagulativa aguda, no parênquima hepático. 100x HE. Camundongo isogênico BALB/c (eutrófico).

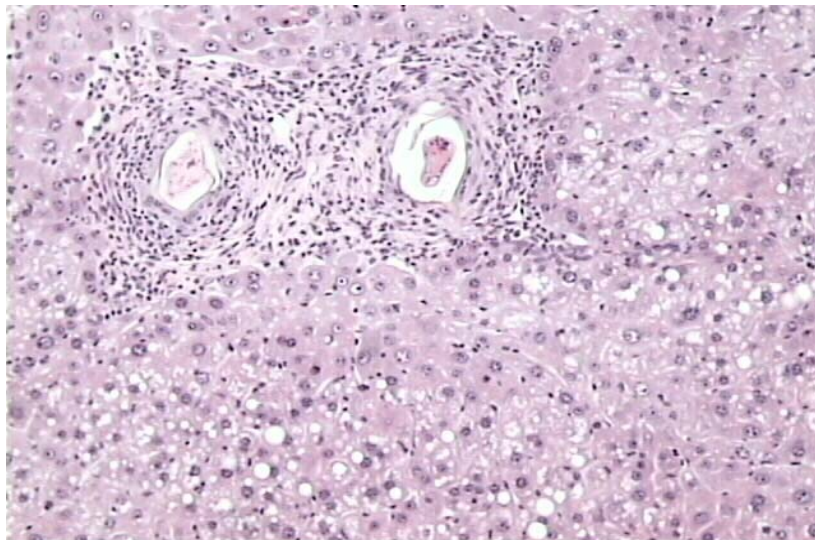


Fig. 12 - Esteatose periportal, observando – se a presença de dois granulomas esquistossomóticos periovulares pouco colagenizados. 100x HE. Camundongo isogênico BALB/c (desnutrido).

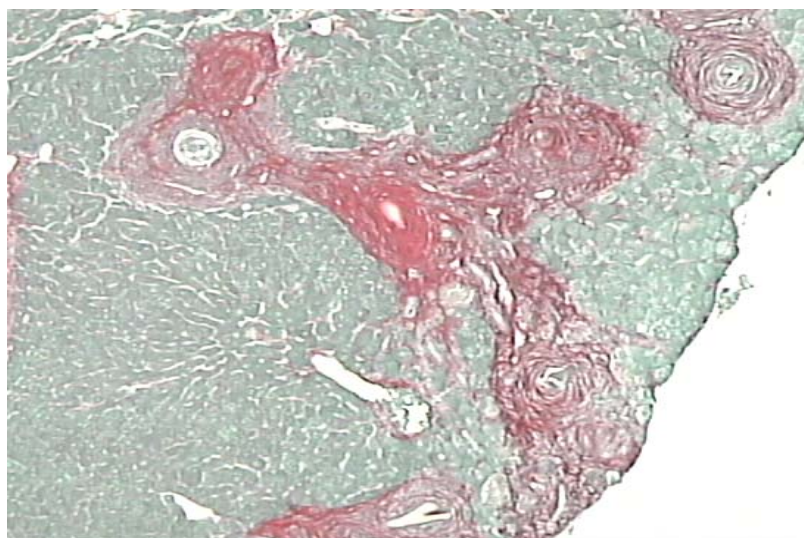


Fig. 13 - Granulomas periovulares interligados por tratos fibrosos. 100x Picrosirius-red. Camundongo isogênico BALB/c (desnutrido).

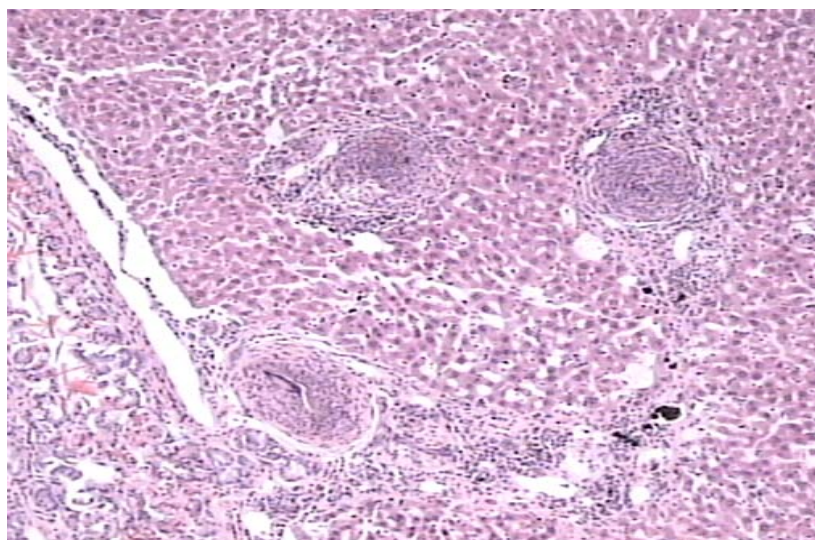


Fig. 14 - Granulomas periovulares pequenos do tipo exsudativo, além de infiltração inflamatória aguda de pequenos espaços-porta. 100x HE. Camundongo isogênico C57BL/10 (eutrófico).

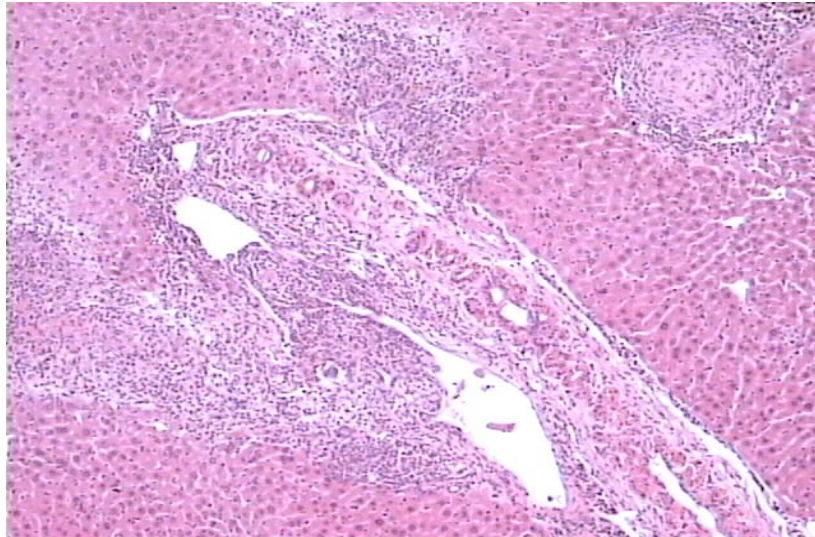


Fig. 15 - Intensa infiltração inflamatória aguda, além de acentuada hiperplasia de ductos biliares. Observa-se, ainda, presença de granulomas periovulares no parênquima e na subíntima de ramo portal, em espaço-porta calibroso. 100x HE. Camundongo isogênico C57BL/10 (eutrófico).



Fig. 16 - Espessamento fibroso de espaço-porta calibroso, com presença de vários granulomas periovulares. 100x Picrosirius-red. Camundongo isogênico C57BL/10 (eutrófico).

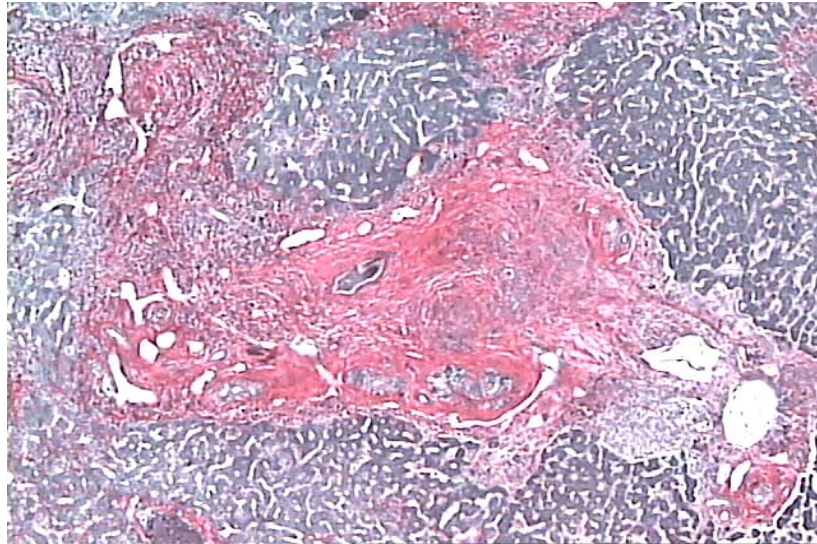


Fig. 17 - Placa de fibrose com deposição de colágeno denso, observando-se granulomas periovulares coalescentes e acentuada neof ormação vascular. 100x Picrosirius-red. Camundongo isogênico C57BL/10 (eutrófico).

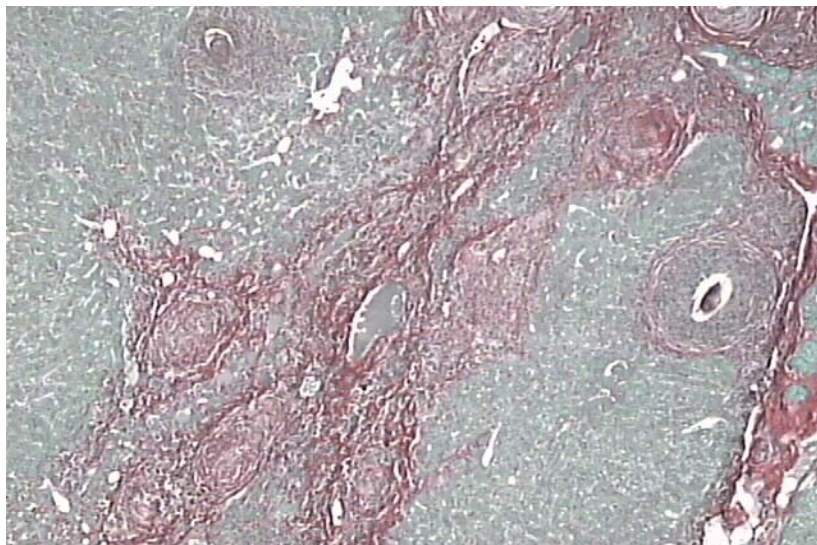


Fig. 18 - Aspecto geral da fibrose “pipestem-like” do camundongo. Delgadas conexões fibrosas podem ser vistas entre espaços-porta e entre estes e veias centrolobulares, apesar do aspecto pouco denso e fibrilar do colágeno depositado. 100x Picrosirius-red. Camundongo isogênico C57BL/10 (desnutrido).

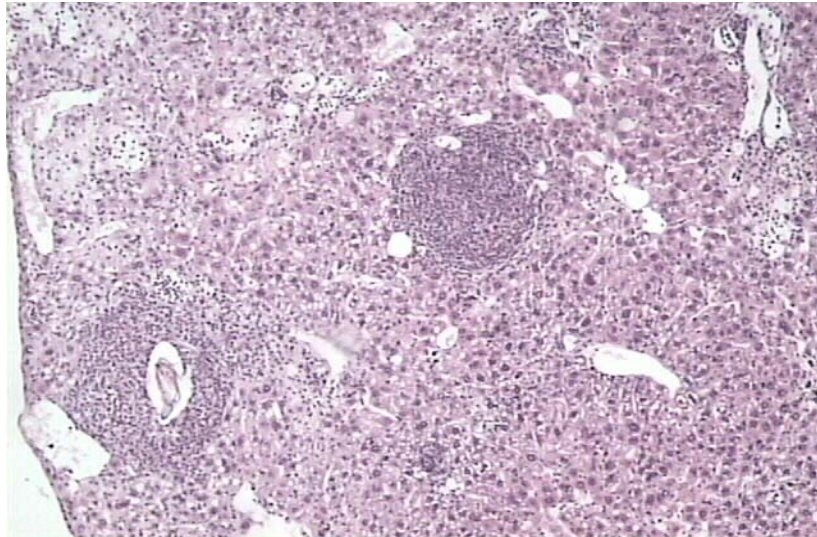


Fig. 19 - Granulomas periovulares isolados, de pequena dimensão e intensa exsudação. 100x HE. Camundongo isogênico C57BL/10 (desnutrido).

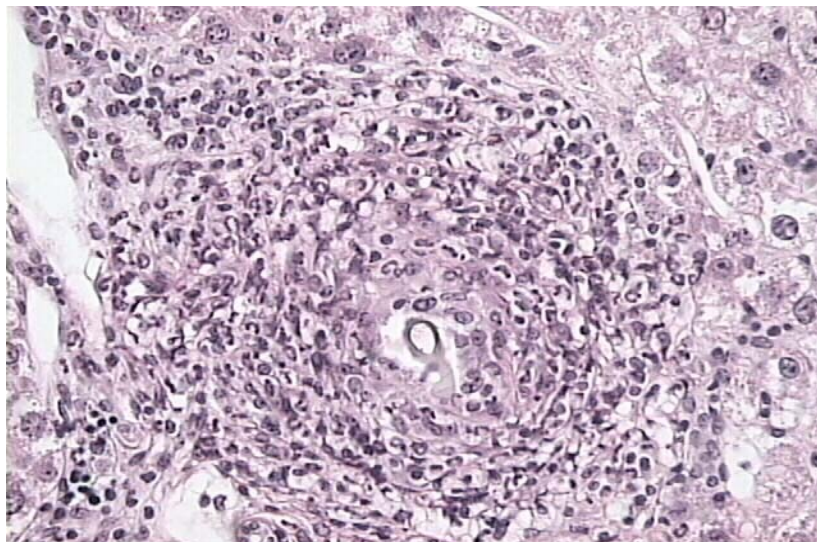


Fig. 20 - Granuloma periovular com pequena deposição de colágeno e grande quantidade de polimorfonucleares, apesar de centralizado apenas por fragmento de casca de ovo de *S. mansoni*. 40x HE. Camundongo isogênico C57BL/10 (desnutrido).

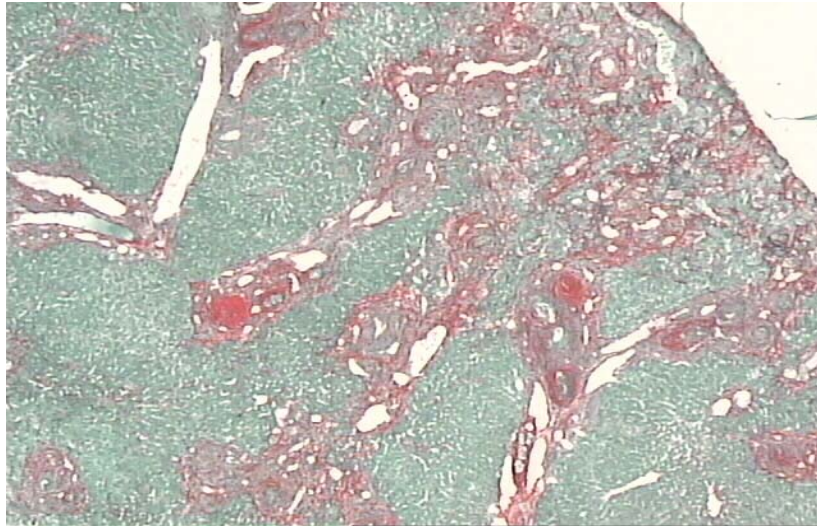


Fig. 21 - Aspecto geral do fígado, observando-se espaços-porta com início de espessamento fibroso e acentuada telangiectasia. 50x Picrosirius-red. Camundongo isogênico C57BL/10 (desnutrido).

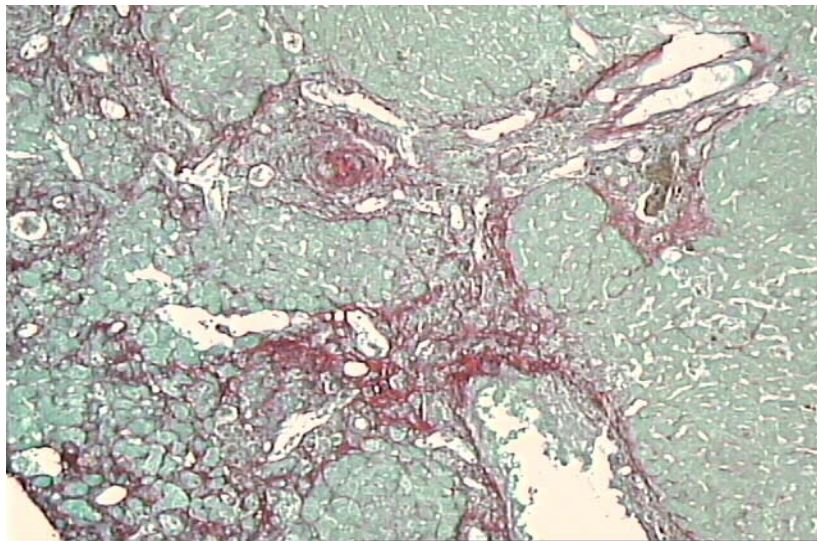


Fig. 22 - Fibrose septal representada por delgadas fibrilas colágenas interligando espaços-porta e granulomas entre si. 100x Picrosirius-red. Camundongo isogênico C57BL/10 (desnutrido).

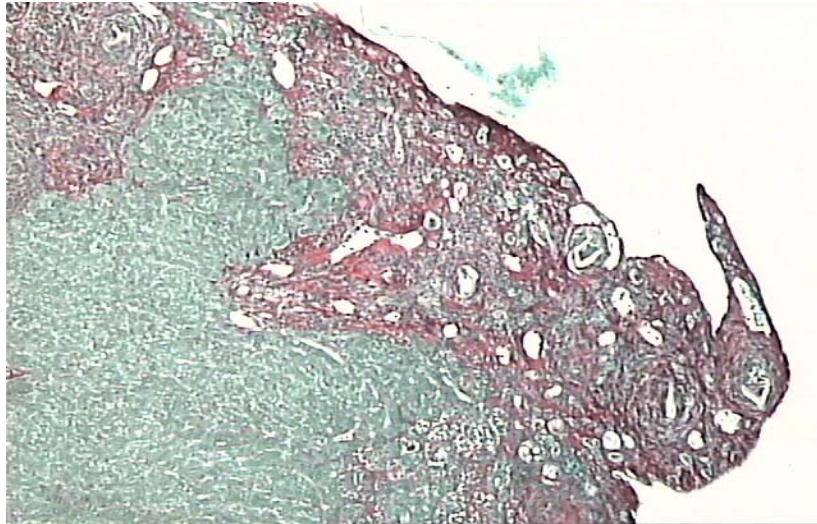


Fig. 23 - Placa de fibrose na porção subcapsular do fígado, com acentuada neoformação vascular, assemelhando-se ao que se observa na fibrose de Symmers humana. 100x Picrosirius-red. Camundongo isogênico C57BL/10 (desnutrido).

4.1.3 Quantidade de colágeno hepático

A tabela 3 mostra a quantidade de colágeno hepático determinado pelos métodos bioquímico e morfométrico. A análise dos valores obtidos, mostrou diferenças estatisticamente significativas apenas na avaliação pelo método morfométrico, entre os grupos A1x B1, B1xC1, A2 x C1, B2 x C1.

TABELA 3: Avaliação morfométrica e bioquímica da quantidade de tecido fibroso (colágeno) presente no fígado de camundongos isogênicos desnutridos e eutróficos (BALB/c e C57BL/10) infectados com *Schistosoma mansoni*, em comparação com seus respectivos controles “outbred”.

Grupos Experimentais	Nº de camundongos	Percentual de tecido fibroso (morfometria) $\bar{X} \pm \text{EPM}$	Nº de camundongos	Hidroxirolina corrigida por número de ovos (10.000) $\bar{X} \pm \text{EPM}$	Sig p<0,05
A-1 Desnutridos BALB/c	10	9,15 $\pm$ 1,0	19	7,58 $\pm$ 1,15	
B-1 Eutróficos BALB/c	10	15,18 $\pm$ 1,5	20	9,98 $\pm$ 1,42	A1 X B1 ^a B1 X C1 ^a
A-2 Desnutridos C57BL/10	10	12,50 $\pm$ 0,9	22	8,20 $\pm$ 1,28	A2 X C1 ^a
B-2 Eutróficos C57BL/10	10	11,8 $\pm$ 0,9	21	11,15 $\pm$ 1,77	B2 X C1 ^a
C-1 Desnutridos SWISS	10	7,04 $\pm$ 0,6	11	16,12 $\pm$ 3,12	
C-2 Eutróficos SWISS	09	11,61 $\pm$ 1,5	12	33,25 $\pm$ 9,58	

a Diferença significativa pela morfometria
EPM= Erro Padrão da Média

4.1.4 Outras medidas morfométricas

Além da área ocupada pelo tecido conjuntivo colágeno (corada em vermelho pelo método do picrossirius- red), foram, também, avaliados morfometricamente o volume (V), a densidade volumétrica (Vv) densidade numérica (Nn) dos granulomas hepáticos.

(A) Volume (V) – Embora os valores mais baixos tenham sido encontrados no grupo dos camundongos BALB/C desnutridos, a análise estatística não detectou diferenças entre as diversas linhagens de camundongos (Tabela 4).

(B) Densidade de Volume(Vv) - A densidade de volume, em todas as linhagens, foi sempre inferior nos animais desnutridos, com diferenças significativas entre os grupos A1xB1, A1xB2, B1xA2, B1xC1 e A2xB2 (Tabela 4).

(C) Densidade numérica(Nn) – Os valores mais altos em relação à densidade numérica dos granulomas foram encontrados no grupo A1 (camundongos isogênicos desnutridos, linhagem BALB/c). Diferença estatisticamente significativa foi detectada entre os grupos A1xB1, A1xC1, A1xC2, A2xC2 e B2x C2 (Tabela 4).

TABELA 4: Parâmetros morfométricos (percentual de tecido fibroso hepático, volume dos granulomas, volume e densidade numérica dos granulomas) no fígado de camundongos isogênicos desnutridos e eutróficos (BALB/c e C57BL/10) infectados com *Schistosoma mansoni*, em comparação com seus controles “outbred”.

Grupos Exper.	N.ºde camund.	Percentual de fibrose no fígado		Volume do granuloma (V) $\mu\text{m}^3 \times 10^6$	Densidade volumétrica dos granulomas (Vv)		Densidade numérica dos granulomas (Nn) nm/mm ⁴	
		$\bar{X} \pm \text{EPM}$	Sig. p< 0,05		$\bar{X} \pm \text{EPM}$	Sig. p< 0,05	$\bar{X} \pm \text{EPM}$	Sig. p< 0,05
A-1 Desnutridos BALB/c	10	9,15 $\pm$ 1,06		2,49 $\pm$ 0,24	0,06 $\pm$ 0,005		641,5 $\pm$ 44,06	
			A1 X B1			A1XB1		A1XB1
B-1 Eutróficos BALB/c	10	15,18 $\pm$ 1,55	B1X C1	5,09 $\pm$ 0,73	0,12 $\pm$ 0,01	A1XB2	439,80 $\pm$ 41,37	A1 XC1
			A2XC1			B1XA2		A1XC2
A-2 Desnutridos C57BL/10	10	12,50 $\pm$ 0,98		3,33 $\pm$ 0,54	0,06 $\pm$ 0,006	B1XC1	528,60 $\pm$ 28,12	A2XC2
			B2XC1			A2XB2		B2XC2
B-2 Eutróficos C57BL/10	10	11,8 $\pm$ 0,90		3,96 $\pm$ 0,47	0,10 $\pm$ 0,008		509,20 $\pm$ 58,27	
C-1 Desnutridos SWISS	10	7,04 $\pm$ 0,61		4,76 $\pm$ 0,61	0,07 $\pm$ 0,008		433,60 $\pm$ 29,16	
C-2 Eutróficos SWISS	09	11,61 $\pm$ 1,58		8,03 $\pm$ 1,50	0,11 $\pm$ 0,015		286,66 $\pm$ 38,40	

EMP= Erro Padrão da Média

4.2. Estudo parasitológico

4.2.1 Carga parasitária - A quantidade média de parasitos recolhidos em cada grupo, após perfusão do sistema porto-mesentérico, acha-se explicitada na tabela 5. Observa-se que, de modo geral, camundongos desnutridos desenvolveram cargas parasitárias menores que camundongos eutróficos. Diferenças estatisticamente significativas foram encontradas entre os grupos A1xC2, B1xA2, A2xC2, B2xC2 e C1xC2.

TABELA 5: Parasitos recolhidos por perfusão do sistema porto-mesentérico de camundongos isogênicos desnutridos e eutróficos (BALB/c e C57BL/10) infectados com *Schistosoma mansoni*, em comparação com seus controles “outbred”.

Grupos experimentais	Nº de camundongos	Parasitos machos $\bar{X} \pm \text{EPM}$	Parasitos fêmeas $\bar{X} \pm \text{EPM}$	Total $\bar{X} \pm \text{EPM}$	Sig. p< 0,05
A-1 Desnutridos BALB/c	19	2,42±0,34	2,11±0,30	4,53±0,49	A1 X C2
B-1 Eutróficos BALB/c	20	3,10±0,38	3,20±0,30	6,30±0,55	B1 X A2
A-2 Desnutridos C57BL/10	22	1,32±0,14	1,64±0,24	2,95 ± 0,30	A2 X C2
B-2 Eutróficos C57BL/10	21	2,43±0,32	1,62±0,23	4,05 ± 0,48	B2 X C2
C-1 Desnutridos SWISS	11	1,73±0,60	1,64 ±0,54	3,36 ± 1,13	C1 X C2
C-2 Eutróficos SWISS	12	4,75±0,45	4,50± 0,48	9,25 ± 0,76	

EPM = Erro Padrão da Média

4.2.2. Quantidade de ovos no fígado – a quantidade média de ovos encontrados por grama de tecido hepático e no fígado total, pode ser apreciada na Tabela 6. Em todas as linhagens, os camundongos desnutridos produziram menor quantidade de ovos do que os camundongos eutróficos, considerando-se o fígado total; porém o inverso ocorreu quando o número de ovos foi calculado por grama de tecido hepático.

TABELA 6: Ovos no fígado de camundongos isogênicos desnutridos e eutróficos (BALB/c e C57BL/10) infectados com *Schistosoma mansoni*, em comparação com seus respectivos controles “outbred”

Grupos Experimentais	N.º de camundongos	Ovos no fígado/g X 10 ³ X± EPM	Sig p<0,05	Ovos no fígado/totalX10 ³ X± EPM	Sig p<0,05
A-1 Desnutridos BALB/ c	19	13,47±1,42		9,87±1,50	
B-1 Eutróficos BALB/c	20	11,87±1,56	A1XC2 B1XC2	16,95±2,59	A2 X B2
A-2 Desnutridos C57BL/10	22	11,11±1,40	C1XC2	8,97±0,85	B2 X C1
B-2 Eutróficos C57BL/10	21	8,69±0,81		14,57±1,45	
C-1 Desnutridos Swiss	11	13,64±1,65		8,34±2,48	
C-2 Eutróficos Swiss	13	4,02±1,00		11,81±3,59	

EPM = Erro padrão da média

4.3. Estado nutricional

Os dados referentes à evolução do peso corporal estão demonstrados na figura 1. Observou-se que os animais dos grupos eutróficos mostraram curvas com valores sempre mais elevados e significativos estatisticamente ($p < 0,05$), quando comparados aos grupos desnutridos. O grupo com melhor evolução ponderal foi o C2 (eutróficos “outbred” Swiss=controles). Os animais que receberam dieta hipoprotéica (DBR) mostraram desenvolvimento ponderal discreto, divergindo dos animais do grupo C1 (desnutridos “outbred” Swiss=controles), que exibiram curva ascendente da 5ª à 9ª semana de experimentação, com valores decrescentes a partir de então.

Os grupos foram infectados com 30 cercárias de *S.mansoni* por via transcutânea. O peso corporal dos animais foi obtido semanalmente, do início ao fim do experimento. Os camundongos foram sacrificados com 24 semanas de dieta e 20 semanas de infecção. Os pontos das curvas correspondem à média $\pm$ erro padrão da média dos animais do respectivo grupo, ao longo do experimento.

4. Mortalidade espontânea - Foram utilizados 285 animais. Destes, 106 sobreviveram e foram sacrificados, enquanto 179 morreram espontaneamente antes do final do experimento (Tabela 7).

Tabela 7: Percentual de mortalidade espontânea observado nas diversas linhagens de camundongos infectados com *S. mansoni*, em relação ao estado nutricional.

Grupos experimentais	N.º de animais sacrificados	Morte espontânea	Total	Mortalidade(%)	Significância p<0,05
A-1 Desnutridos BALB/c	19	31	50	62,0	A1x B2
B-1 Eutróficos BALB/c	21	30	51	60,7	
A-2 Desnutridos C57BL/10	22	26	48	54,1	A2x C1
B-2 Eutróficos C57BL/10	21	14	35	40,0	A2xC2
C-1 Desnutridos Swiss	11	43	54	79,6	B1xC1
C-2 Eutróficos Swiss	12	35	47	74,6	B2xC1
TOTAL	106	179	285	62,8	B2xC2

5. DISCUSSÃO

A esquistossomose mansônica atinge, principalmente, o fígado de hospedeiros cronicamente infectados, mas repercute em vários outros órgãos, através de uma patologia variada e complexa (ANDRADE & BINA, 1983). Inúmeros trabalhos tem abordado o estudo da esquistossomose mansônica avançada, procurando aprofundar o conhecimento sobre a patogenia das formas graves da doença (BOGLIOLO, 1957; ANDRADE, 1998).

Na patologia das formas graves da esquistossomose mansônica, o fígado, como já foi dito, é o órgão mais comprometido. Dentre as lesões observadas nessas formas clínicas, a fibrose se destaca como a mais importante, pelas repercussões sobre a circulação portal e alterações hemodinâmicas decorrentes.

Por razões éticas, estudos visando esclarecer aspectos patogênicos de lesões graves requerem a utilização de modelos experimentais.

No caso da esquistossomose, o camundongo se destaca como modelo experimental de escolha, inclusive para estudo da forma crônica, em razão das semelhanças que apresenta com a patologia observada no homem (espessamento fibroso dos espaços-porta, acúmulo de granulomas periovulares em diferentes fases de evolução, obstrução vascular, telangiectasia, ligação entre espaços de Kiernan por formação de tratos fibrosos, lesões parenquimatosas ausentes ou mínimas, desenvolvimento de hipertensão portal e suas conseqüências), além do baixo custo e facilidade de manipulação. Em que pesem algumas diferenças, tais como dinâmica de formação e degradação do colágeno e menor freqüência de fibrose septal, o modelo pode ser considerado como miniatura da fibrose

humana tipo “pipestem” (CHEEVER et al., 2002), embora autores como FARAH et al. (2000) considerem que o macaco babuíno desenvolve uma fibrose hepática patogeneticamente mais semelhante à observada no homem.

As lesões hepáticas que se desenvolvem em diferentes linhagens de camundongos isogênicos foram relatadas sucintamente em algumas investigações prévias (COLLEY & FREEMAN., 1980; FANNING et al., 1981; DEAN et al., 1981; CHEEVER et al., 1983; CHEEVER, 1986; CHEEVER et al., 1987; CHEEVER et al., 1993; FARAH et al., 2000; CHEEVER et al., 2002), todas elas utilizando animais eutróficos. Camundongos desnutridos, todavia, têm comportamento diferente em relação a alguns aspectos da patologia da esquistossomose crônica, não sendo capazes de desenvolverem a lesão equivalente à fibrose humana tipo “pipestem” (COUTINHO et al,1997), obtida em 30 a 50% dos camundongos eutróficos (ANDRADE & CHEEVER, 1993).

5.1. ACHADOS MORFOLÓGICOS (macro e microscópicos)

No presente experimento, em camundongos isogênicos da linhagem C57BL/10, observou-se pela avaliação morfométrica, maior quantidade de colágeno sintetizado no fígado, tanto em animais desnutridos como eutróficos, em relação às outras linhagens. A dosagem bioquímica da hidroxiprolina, aminoácido mais abundante e representativo do tecido colágeno, não mostrou, todavia, diferenças significativas entre os grupos. A avaliação morfométrica, contudo, é considerada como método mais sensível para interpretação dos resultados (BARBOSA JR., 2001).

Camundongos isogênicos desnutridos apresentaram granulomas menores, menor densidade volumétrica e maior densidade numérica em relação aos animais eutróficos. A redução do volume total do fígado, provocada pela desnutrição, provavelmente explica o

comportamento deste último parâmetro, enquanto que a reduzida ingestão de proteína na dieta guarda relação com os dois primeiros (COUTINHO et al., 1997).

Quanto a aspectos relacionados com a organomegalia (fígado e baço) verificou-se que nos camundongos desnutridos de todas as linhagens, o peso relativo do fígado foi menor, com diferença estatisticamente significativa em relação aos animais eutróficos. O mesmo ocorreu quanto ao peso relativo do baço, embora os resultados não tenham tido significância estatística em todos os grupos. A hepatomegalia guarda provavelmente relação com a infecção pelo *S. mansoni* e com o teor da ingestão dietética de proteína, enquanto que a esplenomegalia é consequência direta da hiperplasia do sistema fagocítico-mononuclear e dos distúrbios hemodinâmicos que se instalam na fase crônica da parasitose.

As lesões hepáticas na esquistossomose experimental consistem primariamente em granulomas em torno dos ovos do esquistossoma, inflamação portal e difusa, necrose parenquimatosa focal e fibrose, esta última principalmente associada com os granulomas na maioria dos hospedeiros vertebrados desse parasito (CHEEVER, 1986). A fibrose nos granulomas periovulares é uma característica proeminente da infecção murina pelo *S. mansoni* (WARREN, 1966; Dunn et al., 1977; CHEEVER, et al, 1983; Dunn et al., 1983). A maior quantidade de tecido fibroso hepático detectado na linhagem ICR “outbred”, em contraposição ao que é observado em linhagens isogênicas (C57BL/6, C3H/HeN) está relacionada a uma síntese do colágeno mais rápida “in vitro”, nos animais “outbred” (CHEEVER et al., 1983). Em camundongos infectados com *S. mansoni*, a fibrose hepática acha-se principalmente associada com os granulomas periovulares (DUNN et al., 1977), embora também ocorra certo grau de fibrose portal (CHEEVER, 1965; DUNN et al., 1983).

Camundongos desnutridos “outbred” e “inbred” desenvolveram granulomas periovulares menores do que os observados em camundongos eutróficos. Nas condições do presente experimento, apenas animais “outbred” eutróficos e alguns “inbred” desnutridos da cepa C57BL/10 foram capazes de desenvolver lesões de fibrose periportal tipo murino. Ainda não temos uma explicação definitiva para este achado inesperado, mas é possível que a cepa do parasito utilizada (no caso, a cepa SLM de Pernambuco) possa ter induzido resultados diferentes daqueles obtidos por outros autores com cepas de outras procedências, particularmente a ausência de fibrose “pipestem-like” em camundongos BALB/c eutróficos, ao contrário do que se acha registrado na literatura pertinente (Flannery, 2003).

5.2. ACHADOS PARASITOLÓGICOS

As menores cargas parasitárias detectadas nos grupos desnutridos estão de acordo com achados anteriores de diversos autores (DE WITT, 1957; MAGALHÃES et al., 1986). No presente estudo a inversão na quantidade de ovos detectada no fígado, quando considerado o órgão como um todo ou por grama de tecido hepático, provavelmente decorre da irregular distribuição dos mesmos nos vários lobos que formam essa glândula.

Diversos estudos sugerem a contribuição de fatores genéticos à expressão e severidade da doença hepato-esplênica em indivíduos infectados com *S. mansoni*. CAMUS et al., (1977), encontraram correlação entre tipo sanguíneo do grupo A e grau de hepatoesplenomegalia. Diferenças entre raças também têm sido referidas (BINA et al., 1978) na esquistossomose humana. Todavia, o papel do “background” genético em relação às reações patológicas que se desenvolvem no hospedeiro não se acha ainda esclarecido, embora já se saiba que os antígenos leucocitários de histocompatibilidade (HLA no

homem, H-2 em camundongos) regulam em diversas funções imunológicas, tais como a produção de anticorpos (SHREFFLER & DAVID, 1975). Sabe-se que a patogênese da esquistossomose em camundongos depende de fenômenos imunológicos, como é o caso da formação dos granulomas periovulares no fígado, definida como reação de hipersensibilidade do tipo retardado (WARREN et al., 1967).

A influência do “background” genético do hospedeiro camundongo sobre o curso de diversas infecções bacterianas e parasitárias, tem sido relatada por vários autores (FANNING et al., 1981).

Na esquistossomose, estudos sobre a biologia e patologia da infecção com *S. mansoni* e *S. japonicum* em camundongos isogênicos timentomizados (“nude mice”), revelaram que os mesmos, em todas as linhagens estudadas, inclusive BALB/c, desenvolveram granulomas periovulares pequenos e fibrose hepática mínima, eliminando menor quantidade de ovos pelas fezes, em comparação com camundongos intactos, além de apresentarem alterações microvesiculares e necrotizantes dos hepatócitos e mortalidade elevada (CHEEVER et al., 1993). Diferentes linhagens de camundongos isogênicos diferem na reação tissular aos ovos do *S. mansoni*. Acentuadas diferenças quanto ao volume dos granulomas periovulares e fibrose hepática foram encontradas entre camundongos de linhagens diversas, sendo que aquelas que formavam granulomas maiores também desenvolviam maior grau de fibrose hepática (camundongos ICR “outbred”), ao passo que camundongos isogênicos C57BL/6 desenvolveram reação fibrótica 5 vezes menor que os anteriores (CHEEVER et al., 1987).

5.3. ACHADOS NUTRICIONAIS

A avaliação do estado nutricional, feita através do estudo da evolução da curva ponderal, revelou a presença de curvas ascendentes para os animais eutróficos,

camundongos “outbred” (controles) tendo estes melhor “performance” do que os isogênicos. Entre os desnutridos, o pior resultado foi observado entre os isogênicos BALB/c, os quais se mostraram particularmente sensíveis aos efeitos da restrição protéica.

5.4. MORTALIDADE

A mortalidade espontânea foi sempre maior nos grupos desnutridos, nas três linhagens estudadas. Nas cepas isogênicas, os camundongos BALB/c mostraram-se menos resistentes à infecção pelo *S. mansoni* do que os camundongos C57BL/10, com elevadas taxas de mortalidade (62% para desnutridos e 60% para eutróficos). A maior susceptibilidade encontrada em camundongos BALB/c, no nosso trabalho, corrobora achados de outros autores (SACKS & NOBEN-TRAUTH, 2002).

A elevada mortalidade registrada entre camundongos “outbred”, porém, guardou relação com problemas ambientais ligados à estrutura e mudanças ocorridas no nosso Biotério de Experimentação à época da realização do experimento, não devendo ser relacionada apenas à quantidade da proteína ingerida, uma vez que atingiu, também, o grupo dos animais eutróficos. É preciso, ainda, considerar que foram utilizados camundongos fêmeas, reconhecidamente menos resistentes à infecção que os machos (ELOI-SANTOS et al., 1992). A elevada mortalidade observada em camundongos fêmeas parece estar ligada à capacidade de desenvolverem maior quantidade de parasitos, resposta humoral mais elevada e resposta imune celular mais intensa (EIDINGERAND & GARRET, 1972).

O achado mais importante da presente investigação diz respeito ao desenvolvimento da fibrose portal murina equivalente à fibrose humana de Symmers, em 4 dos 21 camundongos C57BL/10 desnutridos, valorizando, assim, a influência do “background” genético do hospedeiro como co-fator na patogênese da fibrose hepática tipo “pipestem”

descrita na esquistossomose murina. Entre os camundongos BALB/c, todavia, nenhum caso de fibrose murina tipo “pipestem” foi observado, mesmo em animais eutróficos, observação esta em desacordo com os achados de FLANNERY (2003), que refere 60% de ocorrência dessa lesão em camundongos eutróficos daquela linhagem isogênica.

6. CONCLUSÕES

1. Camundongos isogênicos da linhagem BALB/c C57BL/10 são susceptíveis à infecção pelo *S. mansoni*.

2. Camundongos da linhagem BALB/c infectados pelo *S. mansoni* apresentaram resultado inferior ao dos camundongos C57BL/10, em termos de evolução ponderal.

3. A mortalidade espontânea foi maior nos grupos desnutridos do que nos grupos eutróficos. Dentre as cepas isogênicas estudadas, os camundongos BALB/c apresentaram as mais elevadas taxas de mortalidade.

4. Em todas as linhagens de camundongos, a hepato-esplenomegalia provocada pela infecção esquistossomótica foi maior nos grupos eutróficos.

5. Nos animais eutróficos, independentemente da linhagem dos camundongos, o fígado apresentou maior quantidade de tecido fibroso pela avaliação morfométrica.

6. Nas três linhagens, o volume e a densidade de volume dos granulomas periovulares mostraram-se diminuídos nos grupos desnutridos, enquanto que a densidade numérica dos granulomas mostrou-se aumentada nos mesmos grupos.

7. Camundongos isogênicos BALB/c, desnutridos e/ou eutróficos, não desenvolveram a fibrose periportal tipo murino.

- 8.** Camundongos isogênicos C57BL/10 desenvolveram granulomas periovulares predominantemente do tipo exsudativo, ao contrário dos camundongos isogênicos BALB/c, que apresentaram predominância de granulomas do tipo produtivo.
- 9.** Camundongos desnutridos da linhagem C57BL/10 desenvolveram o equivalente murino da fibrose esquistossomótica humana tipo “pipestem” em 19% dos animais.
- 10.** Em todas as linhagens estudadas, os grupos desnutridos exibiram menor carga parasitária e menor quantidade de ovos no fígado total.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMED, S.A.; DAUPHINÉE, M.J. & TALAL, N. Effects of short-term administration of sex hormones on normal and autoimmune mice. **The Journal Immunology**, 34 (1): 204-210, 1985.

ANDRADE, Z.A. Patogenia do granuloma esquistossomótico . In : Lopes de Faria , J . - **PATOLOGIA ESPECIAL** com Aplicações Clínicas - Guanabara - Koogan S. A . (Rio de Janeiro) - 2ª edição , 687 pp. , 1998.

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

ANDRADE, Z.A - Pathology of human schistosomiasis. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** 82: 17-23, 1987,(Suppl. IV).

ANDRADE, Z.A. Patologia geral da esquistossomose . In : De Paola, D.– **MECANISMOS BÁSICOS DE DOENÇA** – Introdução ao estudo da patologia dos processos gerais – Livraria Atheneu (Rio de Janeiro) - 1ª edição , 134-136 , 1988.

ANDRADE, Z.A. & BINA, J.C. A patologia da forma hépato-esplênica da esquistossomose mansoni em sua forma avançada. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, 78(3): 285-305, 1983.

ANDRADE, Z.A. Morphological features of collagen degradation in advanced hepatic schistosomiasis of man. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** . 87:129-138,1992.

ANDRADE, Z.A. & CHEEVER, A.W. Characterization of the murine model of schistosomal hepatic periportal fibrosis ("pipestem"fibrosis). **Inst. G. Exp. Path.** 74: 195-202 , 1993.

ANDRADE, Z.A.; RAMOS, E.G.; REIS, M.G. A patologia da esquistossomose mansoni no coelho. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** , 83(3): 323-333, 1988.

ANDRADE, Z.A.; SILVA, L.M. & SOUZA, M.M. An experimental approach to the pathogenesis of "pipestem " fibrosis (Symmer's fibrosis of the liver). **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** , 92 (5): 699 - 706 , 1997.

ANDRADE, Z. A. & WARREN, K.S. Mild prolonged Schistosomiasis in mice: alterations in host response with time and the development of portal fibrosis. **Trans. Roy. Soc. Med. Hyg.**, 58: 53-57, 1964.

BATISTA FILHO, M. Prevalência de estágios da desnutrição protéico-calórica em crianças da cidade de São Paulo. São Paulo, **Tese (Doutorado)**. Universidade de São Paulo, 1976.

BATISTA FILHO, M. & BARBOSA, N. de P. Pró- memória: alimentação e nutrição no Brasil, 1974-1984. Brasília. Ministério da Saúde. **Instituto Nacional de Alimentação e Nutrição**, 1985.

BARBOSA, C.S.; da SILVA, C.B.; BARBOSA, F.S. Esquistossomose: reprodução e expansão da endemia no Estado de Pernambuco, Brasil. **Rev. Saúde Pública**, 30(6): 609-616, 1996.

BARBOSA JR, A.A. Morphological computer-assisted quantitative estimation of stained fibrous tissue in liver sections: applications in diagnosis and experimental research. **J. Bras Patol**, 37: 197-200. 2001.

BERG, A. The nutrition factor. Its role in national development. Washington: **The Brooking Institution**, p 290. 1973.

BERGMAN, J. & LOXLEY, R. - Two improved and simplified methods for the spectrophotometric determination of hydroxyproline . **Anal Chem.** , 35: 1961-1962, 1963.

BINA, J.C.; TAVARES NETO, J.; PRATA, A. & AZEVEDO, E.S. Greater resistance to development of severe schistosomiasis in brazilian Negroes. **Human Biology**, 50: 41-49, 1978.

BOGLIOLO, L. The anatomical picture of the liver in hepatosplenic schistosomiasis mansoni. **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, 51: 1-14, 1957.

BOROS, D.L.; WHITFIELD, J.R. Enhanced Th1 and dampened Th2 responses synergize to inhibit acute granulomatous and fibrotic responses in murine Schistosomiasis mansoni. **Infect. Immun.** , 67(3):1187-1193, 1999.

BURT, A.D. Cellular and molecular aspects of hepatic fibrosis. **J. Pathol.**, 170: 105-114, 1993.

CAMUS, D.; BINA, J.C.; CARLIER, Y.; SANTORO, F. ABO blood groups and clinical forms of schistosomiasis mansoni. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** 71: 182, 1977.

CAPRON, A.; DESSAINT, J.P.; CAPRON, M.; JOSEPH, M. & TORPIER, G. Effector mechanisms of immunity to Schistosomes and their regulation. **Immunological Rev.**, 61: 41-66, 1982.

CHEEVER, A.W. A comparative study of *Schistosoma mansoni* infections in mice, gerbils, multimammate rats and hamster. II-Qualitative pathological differences. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, 14: 227-238, 1965.

CHEEVER, A.W. - Relative resistance of the eggs of human schistosomes to digestion in potassium hydroxide. **Bull. WHO** , 43: 601-603 , 1970.

CHEEVER, A.W. The intensity of experimental schistosome infections modulates hepatic pathology. **Am. J. Med. Hyg**, 35(1): 124-133, 1986.

CHEEVER, A.W.; DUNN, M.A.; DEAN, D.A. & DUVALL, R.H. Differences in hepatic fibrosis in ICR, CH3 and C57BL/6 mice infected with *Schistosoma mansoni*. **Am. J. Trop. Med. Hyg** . 32(6): 1364-1369, 1983.

CHEEVER , A.W. ; DUVALL, R.H.; HALLACK-JR, T.A.; MINKER, R.G.; MALLEY, J.D. and MALLEY, K.G. Variation of hepatic fibrosis and granuloma size among mouse strains infected with *Schistosoma mansoni* . **Am. J. Trop. Med. Hyg** . 37(1): 85-97, 1987.

CHEEVER, A. W.; DUVALL, R.H.; MINKER, R.G. & NASH, T.E. – Hepatic fibrosis in rabbits infected with Japanese and Philippine strains of *Schistosoma japonicum*. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** , 29(6): 1327-1339, 1980.

CHEEVER , A.W. ; ELTOUM, I.A.; ANDRADE, Z.A. and COX, T. M. Biology and pathology of *Schistosoma japonicum* infections in several strains of nude mice. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 48(4): 496-503, 1993.

CHEEVER , A.W. ; LENZI, J. A.; LENZI, H. L.; ANDRADE, Z. A. Experimental models of *Schistosoma mansoni* infection. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** , 97 (7): 917-940 , 2002.

CHEEVER , A.W. ; XU, Y.; MACEDONIA, J.G.; COX, T.; HIENY, S.; SHER, A. The role of cytokines in the pathogenesis of hepatic granulomatous disease in *Schistosoma mansoni* infected mice. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** 87: 81-5, 1992.

COLLEY, D.G. & FREEMAN, JR. G.L. – Differences in adult *Schistosoma mansoni* worm burden requirements for the establishment of resistance to reinfection in inbred mice I. CBA/J and C57 BL/6 mice. **Am. J. Med. Hyg**, 29(6): 1279- 1285, 1980.

COUTINHO, A. Fatores relacionados com o desenvolvimento das formas clínicas da esquistossomose mansônica. **Rev. Ass. Med. Brasil**. 25(5), 185-188,1979.

COUTINHO, E.M. Relações hospedeiro-parasito na esquistossomose mansônica, em função da Dieta Básica Regional (Estudo Epidemiológico e Anatomopatológico). **Tese de Doutorado**, Universidade Federal de Pernambuco, Recife- Pe, 1976.

COUTINHO, E.M. Patobiologia da desnutrição nas doenças parasitárias. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** , 75: 63-76, 1980.

COUTINHO, E.M.; BARBOSA, F.S.; BARBOSA, J.M.; PESSOA, D.; PINTO, R.F.; OLIVEIRA, P.A.; RODRIGUES, B.A. Inquérito clínico-nutricional e antropométrico preliminar, em áreas endêmicas de esquistossomose mansônica, no nordeste do Brasil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, 6:211-236, 1972.

COUTINHO, E.M.; FERREIRA, H.S.; ASSUNÇÃO, M.L.; CARVALHO, S.L.; OLIVEIRA, S.A .; FRANCELINO, A.A. The use of protein hydrolysate improves the protein intestinal absorption in undernourished mice infected with *Schistosoma mansoni*. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** 35(6): 585-590, 2002.

COUTINHO, E.M.; FREITAS, L.P.C.G. & ABATH, F.G.C.- The influence of the Regional Basic diet from northest Brazil on health and nutritional conditions of mice infected with *Schistosoma mansoni*. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** 25(1): 13-20,1992.

COUTINHO-ABATH, E.; MAGALHÃES FILHO, A. & BARBOSA, J.M. Lesões hepáticas no camundongo albino experimentalmente infestado por *Schistosoma mansoni* e submetido a dietas de diferente teor protéico. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo** 4: 311-22, 1962.

COUTINHO, E.M.; SOUZA, M.M.; SILVA, L.M.; CAVALCANTI, C.L.; ARAUJO, R.E.; BARBOSA JR., A.A.; CHEEVER, A. W & ANDRADE, Z.A. Pathogenesis of schistosome "pipestem" fibrosis : a low-protein diet inhibits the development of "pipestem" fibrosis in mice . **Int. J. Exp. Path.** 78 : 337-342 , 1997.

CRAM, E.B. and BOZICEVICH, J. Experimental schistosomiasis mansoni infection by intraperitoneal injection. **Trop. Med. News** 1: 16-17, 1914.

CRAM, E.B. and FIGGAT, W.B. Experimental mammalian infection with the schistosomes of man. II. Comparative study of *Schistosoma mansoni* and *Schistosoma japonicum* infections produced by immersion and intraperitoneal injection. **Nat. Inst. Health Bull.** 189: 106-108. 1947.

CRAM, E.B. and FILES, V.S. Experimental mammalian infection with the schistosomes of man. I. Laboratory animals as a source of supply of adult schistosomes and their ova. **Nat. Inst. Health Bull.** 189: 101-105, 1917.

DEAN, D.A.; BUKOWSKI, M.A. and CHEEVER, A. Relationship between acquired resistance portal hypertension and lung granulomas in ten strains of mice infected with *Schistosoma mansoni* . **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 30: 806-814, 1981.

DE WITT, W.B. Experimental schistosomiasis mansoni in mice maintained on nutritionally deficient diet. II. Survival and development of *Schistosoma mansoni* in mice maintained on a Torula yeast diet deficient in factor 3, vitamine E and cystine. **Journal of Parasitology**, 42(2): 129-135, 1957.

DE WITT, W.B. & WARREN, K.S. Hepato-splenic schistosomiasis in mice. **Am. J. Trop. Med. & Hyg.** 8: 440-446, 1959.

DUNN, M.A.; ROJKIND, M.; WARREN, K.S.; HAIT, P.K.; RIFAS, L. and SEIFFER, S. Liver collagen synthesis in murine schistosomiasis. **J. Clin. Invest.** 59: 666-674, 1977.

DUVALL, R.H. & DE WITT, W.B. - An improved perfusion technique for recovering adult schistosomes from laboratory animals. **Am. J. Trop. Med. & Hyg.** 16: 483-486, 1967.

EIDINGER, D. and GARRET, T.J. Studies of the regulatory effects of the sex hormones on antibody formation and stem cell differentiation. **Journal of Experimental Medicine**, 136: 1098-1116, 1972.

ELOI-SANTOS, S.; OLSEN, N.J; CORREA-OLIVEIRA, R. & COLLEY, D.G. *Schistosoma mansoni* : Mortality, pathophysiology, and susceptibility differences in male and female mice. **Experimental Parasitology** , 75: 168-175, 1992.

FALLON, P.G. Immunopatology of shistosomiasis: a cautionary tale of mice and men. **Immunology Today**, 21(1):29-34, 2000.

FANNING, M. M.; PETERS, P.A.; DAVIS, R.S.; KAZURA, J.W. & MAHMOUD, A F. Immunopathology of murine infection with *Schistosoma mansoni*: Relationship of genetic

background to hepatosplenic disease and modulation. **The Journal of Infectious Diseases.** 144(2): 148-153, 1981.

FARAH, I. O .; MOLA, P.W.; KARIUKI, T.M.; NYINDO, M.; BLANTON, R.E.; KING, C.L. Repeated exposure induces periportal fibrosis in *Schistosoma mansoni* – infected baboons: role of TGF-beta and IL-4. **J. Immunol.**, 164: 5337-5343, 2000.

FERREIRA, H.S. Utilização de Proteínas na Desnutrição Induzida pela Dieta Básica Regional, Associada à Esquistossomose Mansônica em Camundongos. **Tese (Mestrado).** Universidade Federal de Pernambuco, 1991.

FLANNERY, L.M.S. Estudo sobre a patogenia da fibrose hepática periportal na esquistossomose do camundongo. **Tese (Doutorado).** Universidade Federal da Bahia, 12-103, 2003.

FRIEDMAN, S.L. Cytokines and fibrogenesis. **Sem.Liver Dis.**,19: 129,1999.

FUNASA -Esquistossomose Mansônica - Guia de Vigilância Epidemiológica. Cap. 05 (Vigilância Epidemiológica de Doenças e Agravos Específicos)-online. **Disponível: www.funasa.gov.br(2001).**

GRYZCH, J.M.; PEARCE, E.J.; CHEEVER, A.W.; CAULADA, Z.A.; CASPAR, P.; HIENY, S.; LEWIS, A.; SHER, A. Egg deposition is a major stimulus for the production of Th2 cytokines in murine schistosomiasis mansoni. **J. Immunol.**, 146 : 1322-1327, 1991.

HALL, A. Nutritional aspects of parasitic infection. **Prog-Food-Nutri-Sci.** 9: 227-56.1985.

HENDERSON, G.S.; NIX, N.A.; MOUTESANO, M.A.; GOLD, D.; FREEMAN JR., G.L.; McCURLAY, T.L. & COLLEY, D.G. - Two distinct pathological syndromes in male CBA/ J inbred mice with chronic *Schistosoma mansoni* infections. **Am. J. Pathol.** 142 : 703-714, 1993.

HOFFMAN, W.A.; PONS, J.A .& JANER, J.L. The sedimentation-concentration method in Schistosomiasis mansoni. **Puerto Rico. J. Publ. Health.** 9: 281-298,1934.

HURST, M.H.; WILLINGHAM III, A.L.; LINDBERG, L. Tissue responses in experimental schistosomiasis japonica in the pig: a histopathologic study of different stages of single low-or-high-dose infections. **Am. Journal. Trop. Med. Hyg.** 62: 45-56, 2000.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Contagem de população 1996, (mimeo)/IBGE, 1996.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Estimativa de população 1997, (mimeo)/IBGE, 1997.

JUNQUEIRA, L.C.U.; BIGNOLAS, G.; BRENTANI, R. Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. **Histochemistry**, 1: 447-455, 1979.

KATZ, N. & PEIXOTO, S.V. Análise crítica da estimativa do número de portadores de esquistossomose mansoni no Brasil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** 33(3): 303-308, 2000.

LEIPER, R.T. Report on the results of bilharzia mission in Egypt ,1915. **J. Roy. Army Med. Corps.** 30: 235-260,1918.

LENZI, H.L.; KIMMEL, E.; SCHECHTMAN, H.; MACHADO-PELAJO, M.; ROMANHA, W.S.; PACHECO, R.G.; MARIANO, M.; LENZI, J.A - Histoarchitecture of Schistosomal granuloma development and involution: Morphogenetic and biomechanical approaches. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** 93: 141-151, 1998, (Suppl I).

LENZI, H.L.; LENZI, J.A; KERR, I.L.; ANTUNES, S.L.G.; MOTA, E.M.; OLIVEIRA, D.N. Extracellular matrix in parasitic and infectious diseases. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** 86: 77-90, 1991, (Suppl III).

LICHTENBERG, F. V. & SADUN, E.H. Experimental production of bilharzial pipe-stem fibrosis the chimpanzee. **Exp. Parasitol.** , 22: 264-278, 1968.

LICHTENBERG, F.V.; SADUN, E.H.; CHEEVER, A.W.; ERICKSON, D.G.; JOHNSON, A.J. & WORTH, H.B. Experimental infection with *Schistosoma japonicum* in chimpanzees. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene** , 20(6): 850-893, 1971.

LUNN, P.G. & NORTHROP-CLEWES, C.A . The impact of gastrointestinal parasites on protein energy malnutrition in man. **Proc. Nutr. Soc.** 52(1): 102-11, 1993.

MACHADO-SILVA, J.R.; OLIVEIRA, R.M.F. de; RODRIGUES E SILVA, R.; MALDONADO JUNIOR, A.; REY, L. Roedores silvestres como modelos experimentais da esquistossomose mansônica : *Akodon arviculoides* (Rodentia: Cricetidae). **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, 33:257-261, 1991.

MAGALHÃES, L.A.; GUARALDO, A.M.A.; ZANOTTI-MAGALHÃES, E.M.; CARVALHO, J.F.; SGARBIERI, V.C.; ALCÂNTARA, F.G. Esquistossomose mansônica em camundongos experimentalmente subnutridos. **Rev. Saúde Públ. São Paulo**, 20(5): 362-368, 1986.

MARCONDES, E. Desnutrição. Edit. Sarvier (São Paulo), 1976.

PRATA, A. Influence of the host related factors in the development of the hepatosplenic form of schistosomiasis mansoni. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, 87: 39-44, 1992. (Suplemento IV).

QURASHI, M.A; ELWALLI, N.E.M.A; ABDELHAMEED, A.A; MERGANI, A; RAHOUD, S.; ELAGIB, K.E.; SAEED, O.K.; ABEL, L.; MAGZOUN, M.M.A.; DESSEIN, A.J. Susceptibility to periportal (Symmers) fibrosis in human *Schistosoma mansoni* infections: evidence that intensity and duration of infection, gender, and inherited factors are critical in disease progression. **The Journal of Infectious Diseases**. 180: 1298-306, 1999.

RASO, P.; BERNARDES, R.C.; TAFURI, W.L.; BOGLIOLO, L.; NEVES, J. As dimensões do granuloma causado pelos ovos do *Schistosoma mansoni* no fígado humano. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** 12: 45 , 1978.

RASO, P.; MELLO R.T.; BRASILEIRO-FILHO, G.; ROCHA, M.O.; COELHO, P.M.Z. Lesões hepáticas provocadas pela injeção de ovos de *Schistosoma mansoni* na veia porta de camundongos sensibilizados. **Rev. Inst. Med. Trop.** São Paulo, 25(5):236-245, 1983.

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

ROSENBERG, I.H. & BOWMAN, B.B. Impact of intestinal parasites on digestive function in humans. **Fed-Proc.** 43(2): 246-50, 1984.

SACKS, D. & NOBEN-TRAUTH, N. The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. **Nat. Rev. Immunol.**, 2: 845-58, 2002.

SADUN, E.H.; LITCHENBERG, F.VON.; CHEEVER, A.W. & ERICKSON, D.G. Schistosomiasis mansoni in the chimpanzee(The natural history of chronic infections after single and multiple exposures). **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene.** 19(02): 258-277 , 1970.

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.

SHER, A; FIORENTINO, D.; CASPAR, P.; PEARCE, E.; MOSMANN, T. Production of IL-10 by CD4⁺ T lymphocytes correlates with downregulation of Th1 cytokine synthesis in helminth infection. **J. Immunol.**, 147: 2713-2716, 1991.

SHREFFER, D. C.; DAVID, C. S. The H-2 major histocompatibility complex and the I immune response region: genetic variation, function and organization. **Adv. Immunol.** 20: 125-195, 1975.

SHUBERT, M. Conditions for drug testing in experimental schistosomiasis mansoni in mice. **Am. J. Trop. Med.** 28: 121-136.1948.

SILVA, L.M.; FERNANDES, A.L.M.; BARBOSA JR, A.; OLIVEIRA, I.R.; ANDRADE, Z.A. Significance of schistosomal granuloma modulation. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** 95(3): 353-361, 2000.

STEPHENSON, L.S. The impact of schistosomiasis on human nutrition. **Parasitology**, 107: 107-123, 1993.

TEODÓSIO, N.R.; LAGO, E.S.; ROMANI, S.A.M. & GUEDES, R.C.A. A regional basic diet from Northeast Brasil as a dietary model of experimental malnutrition. **Arch. Lat. Amer. Nutr.** 40: 533-547, 1990.

WARREN, K.S. The pathogenesis of clay-pipe stem cirrhosis in mice with chronic Schistosomiasis mansoni, with a note on the longevity of the schistosomes. **Am.J. Pathol.** 49: 477-489, 1966.

WARREN, K.S.; DOMINGO, E.O. & COWAN, R.B.T. Granuloma formation around schistosome egg as a manifestation of delayed hypersensitivity. **Amer. J. Path.** 51:735-756, 1967.

WEIBEL, E.R. Stereological principles for morphometry in electron microscopic cytology. **Int. Rev. Cytol.**, 26 : 235-302, 1969.

WHO (1998) Intestinal Parasites Control . 25,1996.

WYNN, T.A. & CHEEVER, A.W. Cytokine regulation of granuloma formation in schistosomiasis. **Curr. Op. Immunol.** 7: 505-511,1995.