

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

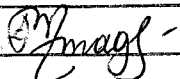
INSTITUTO DE BIOLOGIA



NÁDIA REGINA BORIM ZUIM

**“ESTUDO DAS REAÇÕES GRANULOMATOSAS NA
PATOGENIA DE DIFERENTES LINHAGENS
DE *Schistosoma mansoni*”**

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)


e aprovada pela Comissão Julgadora.

Tese apresentada ao Instituto de
Biologia para obtenção do Título de
Doutor na área de Parasitologia.

Orientadora: Profa. Dra. Eliana Maria Zanotti-Magalhães

Campinas, 2009

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP**

Z84e

Zuim, Nádia Regina Borim

Estudo das reações granulomatosas na patogenia de diferentes linhagens de *Schistosoma mansoni* / Nádia Regina Borim Zuim. – Campinas, SP: [s.n.], 2009.

Orientadora: Eliana Maria Zanotti-Magalhães.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. *Schistosoma mansoni*. 2. Esquistossomose. 3. Patogenia. I. Zanotti-Magalhães, Eliana Maria, 1953-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.

(rcdt/ib)

Título em inglês: Study of the granulomatous reactions in the pathogenesis of different strains of *Schistosoma mansoni*.

Palavras-chave em inglês: *Schistosoma mansoni*; Schistosomiasis; Pathogenesis.

Área de concentração: Parasitologia.

Titulação: Doutora em Parasitologia.

Banca examinadora: Eliana Maria Zanotti-Magalhães, Marlene Tiduko Ueta, Silmara Marques Allegretti, Maria Esther de Carvalho, Horacio Manuel Santana Teles.

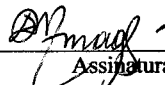
Data da defesa: 25/08/2009.

Programa de Pós-Graduação: Parasitologia.

Campinas, 25 de agosto de 2009

BANCA EXAMINADORA

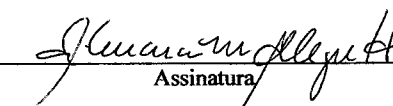
Profª. Dra. Eliana Maria Zanotti-Magalhães (Orientadora)


Assinatura

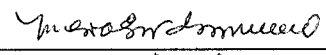
Profª. Dra. Marlene Tiduko Ueta


Assinatura

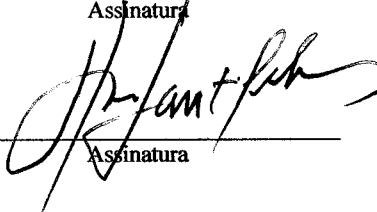
Profª. Dra. Silmara Marques Alegretti


Assinatura

Profª. Dra. Maria Esther de Carvalho


Assinatura

Prof. Dr. Horacio Manuel Santana Teles


Assinatura

Prof. Dr. Pedro Luiz Silva Pinto

Assinatura

Prof. Dr. Sérgio de Albuquerque

Assinatura

Profª. Dra. Selma Giorgio

Assinatura

*Ao meu marido João Batista,
por todo companheirismo, amor e compreensão
pelos momentos de ausência*

*Aos meus filhos Érika, Paula e Gustavo,
partes de mim, de quem fui e serei, antes de tudo e para sempre,
uma orgulhosa mãe!*

*Aos meus pais Pedro e Naide, que por uma vida de
dedicação, amor e trabalho, sempre possibilitaram a seus filhos a
oportunidade de realizar sonhos e conquistas.*

*A todos os meus familiares, aos meus genros,
que em vários momentos estiveram sempre ao meu lado,
apoiando, sofrendo, sorrindo e amando.*

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual de Campinas, pela oportunidade de participar de seu programa de doutorado e utilização de suas instalações.

Aos professores do Laboratório de Helminologia pelo conhecimento compartilhado, pelo apoio nas questões acadêmicas, pelo incentivo e principalmente pela amizade.

A minha orientadora Professora Doutora Eliana Maria Zanotti-Magalhães, pelo paradigma que a mim representa, pela orientação, amizade e apoio para a realização deste trabalho. Agradeço principalmente por me ensinar que não existem coisas difíceis, existe apenas o que conhecemos e não conhecemos.

Ao Professor Doutor Luiz Augusto Magalhães agradeço pela atenção, pelas implementações essenciais para esta tese, todas as críticas e sugestões.

Ao Professor Doutor Arício Xavier Linhares pela realização da análise estatística dos dados obtidos durante o experimento.

Aos estimados colegas do Laboratório de Helminologia pelo apoio durante toda a trajetória. Em especial João Batista e Ivo pela cooperação e suporte técnico.

Aos amigos principalmente a amiga Bianca Barassa e Flávia de Mello S. F. de Paula pela ajuda, carinho, apoio e estímulo nas horas difíceis.

Aos membros da banca examinadora, pela predisposição em analisar este trabalho e pelas sugestões recebidas.

Agradeço a todos que direta ou indiretamente ajudaram a seguir meu caminho acadêmico e pessoal, alcançando mais esta etapa.

“ Quando pessoas trabalham em equipe, o resultado que se obtém não é a soma do potencial de cada um, mas a potencialização de todos”.

**A mente que se abre a uma nova idéia
jamais voltará ao seu tamanho original.**

(Albert Einstein)

RESUMO

Na esquistossomose mansônica, a reação granulomatosa que ocorre em torno dos ovos de *S. mansoni* constitui a principal manifestação patogênica. A resposta granulomatosa mostrou ser específica para os ovos de cada uma das três principais espécies de *Schistosoma* que parasitam o homem (*S. mansoni*, *S. haematobium* e *S. japonicum*). A reação granulomatosa que se desenvolve ao redor dos ovos de *S. mansoni* é estágio específico. Os objetivos deste trabalho foram estudar a evolução das reações granulomatosas em torno dos ovos de *S. mansoni* das linhagens BH e SJ, verificar se a reação granulomatosa em torno do ovo de *S. mansoni* é linhagem específica e avaliar a patogenia do *S. mansoni* da linhagem isolada do Jardim São Domingos (Campinas, SP), realizando um estudo comparativo com as linhagens BH e SJ. Para o estudo da evolução das reações granulomatosas, dois grupos de camundongos foram inoculados pela veia caudal com ovos maduros das linhagens BH e SJ e mortos após 1, 8, 15 e 34 dias. Para o estudo da especificidade da reação granulomatosa dois grupos de camundongos foram infectados por cercárias de *S. mansoni* BH e na 8ª semana de infecção um grupo foi inoculado pela veia caudal com ovos BH e outro grupo com ovos SJ. Os camundongos foram mortos após 1, 8, 15 e 34 dias após a inoculação dos ovos. Os parâmetros analisados foram: número de granulomas por área de tecido pulmonar e hepático e tamanho das reações granulomatosas. Para avaliar a patogenia do *S. mansoni* da linhagem isolada no Jardim São Domingos (Campinas, SP) e realizar um estudo comparativo com as linhagens BH e SJ foram constituídos três grupos de camundongos infectados e na oitava semana de infecção, os camundongos sobreviventes foram sacrificados para recuperação de vermes. Os parâmetros verificados foram: número de cercárias penetrantes; número de ovos eliminados nas fezes; número de esquistossomos no sistema porta-mesentérico; número de granulomas presentes no fígado, baço, intestino (cólon ascendente), pâncreas e pulmão, área dos granulomas observados no fígado e intestino e tamanho

dos ovos de *S. mansoni*. Os resultados obtidos permitiram concluir que a reação granulomatosa em torno dos ovos de *S. mansoni* das linhagens BH e SJ, mostrou ser linhagem específica, indicando haver identidade parcial na resposta granulomatosa entre os ovos das duas linhagens. Os dados obtidos no estudo da linhagem SD de *S. mansoni* indicaram ser esta linhagem, a mais patogênica das linhagens já descritas, que tem *B. tenagophila* como hospedeira do trematódeo. Nos camundongos infectados com esta linhagem foi observada maior recuperação de vermes (48,62%) em relação ao número de cercárias penetrantes ($\bar{X}$ =64,50), maior número de granulomas na maioria das vísceras, maior reação granulomatosa em torno dos ovos do trematódeo e maior tamanho dos ovos (155,60 μ m x 64,63 μ m). De importância epidemiológica, foi a constatação de elevado número de ovos eliminados nas fezes, apresentando aspecto morfológico distinto, com um espículo lateral recurvado.

Palavras chave: *Schistosoma mansoni*, esquistossomose, patogenia

ABSTRACT

In the schistosomiasis mansoni, the granulomatous reaction that happens around the *S. mansoni* eggs constitutes the principal pathogenic manifestation. The granulomatous answer showed to be specific for the eggs to each one of the three main of *Schistosoma* species that parasite the man (*S. mansoni*, *S. haematobium* and *S. japonicum*). The granulomatous reaction that grows around the *S. mansoni* eggs is specific stage. The objectives of this work were to study the evolution of the granulomatous reactions around the *S. mansoni* eggs of the BH and SJ strain, to check if the granulomatous reaction around the *S. mansoni* egg is specific strain and to evaluate the *S. mansoni* pathogenesis, of the isolated strain from Jardim São Domingos (Campinas, SP), carrying out a comparative study with the BH and SJ strains. To the study of the evolution of the granulomatous reactions, two groups of mice were inoculated by the vein tail with ripe eggs of the BH and SJ strain and sacrificed after 1, 8, 15 and 34 days. To the specific study of the granulomatous reaction, two groups of mice were infected by *S. mansoni* cercariae BH and in the 8th week of infection, a group was inoculated by the vein tail with BH eggs and other group with SJ eggs. The mice were killed after 1, 8, 15 and 34 days after the eggs inoculation. The analyzed parameters were: number of granulomas for area of lung tissue and hepatic and size of the granulomatous reactions. To evaluate the *S. mansoni* pathogenesis of the isolated strain in the Jardim São Domingos (Campinas, SP) and to accomplish a comparative study with the strains BH and SJ, three groups of infected mice were constituted and in the eighth week of infection, the surviving mice were sacrificed for recovery of the worms. The verified parameters were: number of penetrating cercariae; number of eliminated eggs in the feces; schistosome number in the system portal-mesenteric; number of granulomas present in the liver, spleen, intestine (ascending colon), pancreas and lung, area of the granulomas observed in the liver and intestine and the *S. mansoni* eggs size. The conclusions allowed that the granulomatous reaction around the *S. mansoni* eggs from

BH and SJ strains, showed to be specific strain, indicating there to be partial identity in the answer granulomatous among the eggs of the two strains. The informations obtained in the study of the SD strain of *S. mansoni* indicated to be this strain, the most pathogenic of the strains described already, that has *B. tenagophila* as trematode host. In the mice infected with this strain was observed a greatest recuperation of worms (48,62%) in relation to the number of cercariae penetrating ($\bar{x}$ = 64,50), a greatest number of granulomas in most of the innards a greatest granulomatous reaction around the trematode eggs and a greatest size of the eggs (155,60 μ m x 64,63 μ m). About epidemic importance, it was the established high number of eliminated eggs in the feces, presenting morphological different aspect, with a side recurved spine.

Key-words: *Schistosoma mansoni*, schistosomiasis, pathogenesis

CAPÍTULO I:	Pág.
Figura 1: Área dos granulomas no pulmão de camundongos inoculados com ovos de <i>Schistosoma mansoni</i> das linhagens BH (Grupo I) e SJ (Grupo II) e em camundongos infectados previamente com <i>S. mansoni</i> da linhagem BH e inoculados na 8ª semana de infecção com ovos de <i>S. mansoni</i> da linhagem BH (Grupo III) e da linhagem SJ (Grupo IV). A: Comparação dos grupos I, II, III e IV. B: Comparação dos períodos. C: Comparação dos grupos considerando os períodos.....	29
Figura 2: Número de granulomas no pulmão de camundongos inoculados com ovos de <i>Schistosoma mansoni</i> das linhagens BH (Grupo I) e SJ (Grupo II) e em camundongos infectados previamente com <i>S. mansoni</i> da linhagem BH e inoculados na 8ª semana de infecção com ovos de <i>S. mansoni</i> da linhagem BH (Grupo III) e da linhagem SJ (Grupo IV). A: Comparação dos grupos I, II, III e IV. B: Comparação dos períodos. C: Comparação dos grupos considerando os períodos.....	30
Figura 3: Área dos granulomas no fígado de camundongos infectados previamente com <i>Schistosoma mansoni</i> da linhagem BH e inoculados na 8ª semana de infecção com ovos de <i>S. mansoni</i> da linhagem BH (Grupo III) e da linhagem SJ (Grupo IV). A: Comparação dos grupos III e IV. B: Comparação dos períodos. C: Comparação dos grupos considerando os períodos.....	31
Figura 4: Número de granulomas no fígado de camundongos infectados previamente com <i>Schistosoma mansoni</i> da linhagem BH e inoculados na 8ª semana de infecção com ovos de <i>S. mansoni</i> da linhagem BH (Grupo III) e da linhagem SJ (Grupo IV). A: Comparação dos grupos III e IV. B: Comparação dos períodos. C: Comparação dos grupos considerando os períodos.....	32

CAPÍTULO II:

Figura 1:	Ovo de <i>S. mansoni</i> da linhagem SD observado nas fezes dos camundongos.....	55
------------------	--	----

CAPÍTULO I:	Pág.
Tabela 1: Comparação do número de cercárias infectantes e de vermes machos e fêmeos recuperados em camundongos infectados com <i>S. mansoni</i> das linhagens BH e SJ nos Grupos III e IV.....	28
CAPÍTULO II:	
Tabela 1: Comparação do número de cercárias penetrantes e número de vermes machos e de vermes fêmeos em camundongos infectados com <i>S. mansoni</i> das linhagens BH, SJ e SD.	48
Tabela 2: Comparação do número de vermes acasalados, de vermes totais e percentagem de recuperação de vermes em relação ao número de cercárias penetrantes em camundongos infectados com <i>S. mansoni</i> das linhagens BH, SJ e SD.....	49
Tabela 3: Comparação do número de granulomas por área de tecido (área tissular de 1,25 mm ²) em camundongos infectados com <i>S. mansoni</i> das linhagens BH, SJ e SD.....	50
Tabela 4: Comparação da área dos granulomas hepáticos e intestinais em camundongos infectados com as linhagens BH, SJ e SD de <i>S. mansoni</i>	51
Tabela 5: Comparação do número (log) de ovos de <i>S. mansoni</i> das linhagens BH, SJ e SD por grama de fezes.....	52
Tabela 6: Comparação do tamanho dos ovos de <i>S. mansoni</i> das linhagens BH, SJ e SD.....	53
Tabela 7: Proporção das medidas dos ovos de <i>S. mansoni</i> das linhagens BH, SJ e SD.....	54

	Pág.
1. INTRODUÇÃO.....	01
2. OBJETIVOS.....	10
3. PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL.....	11
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	13
4.1. ESTUDO DA EVOLUÇÃO E DA ESPECIFICIDADE DA REAÇÃO GRANULOMATOSA EM TORNO DOS OVOS BH E SJ DE <i>S.</i> <i>mansoni</i>	13
4.1.1. Infecção dos moluscos.....	13
4.1.2. Infecção dos camundongos.....	13
4.1.3. Obtenção de ovos de <i>S. mansoni</i> e inoculação pela veia caudal dos Camundongos.....	13
4.1.4. Inoculação dos ovos.....	14
4.1.5. Contagem do número de cercárias e obtenção de vermes.....	15
4.1.6. Número e tamanho dos granulomas no fígado e pulmão.....	15
4.1.7. Análise estatística.....	16
4.2. AVALIAÇÃO DA PATOGENIA DO <i>S. mansoni</i> DA LINHAGEM ISOLADA NO JARDIM SÃO DOMINGOS (CAMPINAS, SP).....	16
4.2.1. Infecção dos moluscos.....	16
4.2.2. Infecção dos camundongos.....	16
4. 2.3. Verificação das cercárias penetrantes.....	17
4.2.4. Verificação do número e medição de ovo de <i>S. mansoni</i> eliminados nas fezes.....	17
4.2.5. Obtenção e contagem dos vermes.....	17
4.2.6. Obtenção, número e tamanho dos granulomas nas vísceras.....	17
4.2.7. Análise estatística.....	18
5. RESULTADOS.....	19

CAPÍTULO I: ESTUDO DAS REAÇÕES GRANULOMATOSAS EM TORNO DOS OVOS DE <i>Schistosoma mansoni</i> DAS LINHAGENS BH E SJ.....	20
RESUMO.....	21
Introdução.....	22
Material e Métodos.....	23
Resultados.....	25
Discussão.....	33
Referências Bibliográficas.....	34
CAPÍTULO II: REAÇÕES GRANULOMATOSAS E PATOGENIA DE LINHAGENS DE <i>Schistosoma mansoni</i>.....	39
RESUMO.....	40
Introdução.....	41
Material e Métodos.....	42
Resultados.....	44
Discussão.....	56
Referências Bibliográficas.....	57
6. CONCLUSÕES.....	60
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	62
8. ANEXOS.....	73

1. INTRODUÇÃO

A relação entre a *Biomphalaria* e o *Schistosoma mansoni* é aspecto de interesse para a epidemiologia da esquistossomose. São de interesse também, as relações do trematódeo com o hospedeiro definitivo, principalmente se forem considerados os fatores que determinam a patogenicidade do parasita.

Penetrando nos vasos cutâneos do hospedeiro definitivo e, através da circulação, os esquistossomulos chegam ao coração direito e aos pulmões, de onde vão para o coração esquerdo e são enviados pela circulação a todas as partes do organismo. Somente após o completo desenvolvimento dos vermes e seu acasalamento no sistema porta, os vermes migram para as veias mesentéricas para a oviposição (ZANOTTI *et al.*, 1982).

Na esquistossomose mansônica, ao ovo é atribuído o principal papel patogênico. A lesão típica e elemento anatomopatológico básico do processo esquistossomótico crônico é o granuloma que se forma em torno dos ovos do parasito. Esta reação demonstra a importância do ovo como agente patogênico, superando muito dos efeitos nocivos produzidos diretamente pelos vermes adultos. Apenas cerca da metade dos ovos produzidos pelos esquistossomos alcançam a luz intestinal e é eliminado pelas fezes (REY, 2008). Muitos dos ovos que não conseguem deixar o organismo do hospedeiro, mas evoluem até a formação de miracídio, encontram-se na parede do intestino, no fígado ou em vários outros órgãos (pâncreas, pulmões, baço), onde serão imobilizados e envolvidos por uma reação inflamatória granulomatosa (PESSÔA & MARTINS, 1982). Os ovos são imaturos quando ovipostos pelas fêmeas do *S. mansoni* e amadurecem nos tecidos do hospedeiro. A fase de maturação leva, no camundongo aproximadamente, seis dias e os ovos maduros podem permanecer viáveis nos tecidos pelo menos 11 a 12 dias (PRATA, 1957). As evidências indicam que a resposta granulomatosa em torno do ovo é de caráter imunológico, provocada por produtos antigênicos liberados pelo ovo maduro (SMITHERS & DOENHOFF, 1982). O processo granulomatoso é entendido como uma tentativa do hospedeiro para controlar a

dispersão de substâncias antigênicas eliminadas pelo ovo e restringí-las ao local de deposição, onde seriam desnaturadas e metabolizadas. A duração e o tamanho do granuloma são proporcionais à persistência do ovo na lesão e a capacidade de destruição dos antígenos por parte das células do hospedeiro (LICHTENBERG, 1962, 1964).

As lesões granulomatosas esquistossomóticas são constituídas por vários tipos de células. Inicialmente aparecem em torno do ovo numerosos macrófagos, seguidos de eosinófilos, linfócitos e alguns plasmócitos. Também mastócitos e fibroblastos fazem parte da constituição dos granulomas. Há um acúmulo local de polimorfonucleares neutrófilos, dando ao conjunto o aspecto de um micro abscesso. Assim que a larva morre no interior do ovo, os polimorfonucleares diminuem. Os macrófagos, com citoplasma abundante (macrófagos ativados), ficam em imediato contato com o ovo ou com os seus restos e, justapondo-se uns aos outros, lembram células de tipo epitelial. Da fusão desses macrófagos resultam massas sinciciais multinucleadas, que abarcam total ou parcialmente os ovos mortos e empreendem sua lenta digestão. A proporção de cada tipo de célula depende do tecido onde o granuloma está localizado e do tempo de infecção (DOENHOFF, 1997). Essa reação apresenta características especiais, até certo ponto específicas e sua intensidade, varia de acordo com os tecidos em que se localizam. A reação é mais intensa nos órgãos mais ricos em tecido conjuntivo e em vasos sanguíneos sendo, portanto, mais volumosos os granulomas localizados na serosa intestinal e no fígado, nos espaços porto-biliares. Reações menores são encontradas, por exemplo, nos tecidos nervosos (ANSWAAD, 1949; MENEZES, 1952; EL-MOFTY & CAHILL, 1964).

A resposta granulomatosa mostrou ser específica para os ovos de cada uma das três principais espécies de *Schistosoma* (*S. mansoni*, *S. haematobium* e *S. japonicum*). A demonstração que o granuloma formado ao redor dos ovos de *S. mansoni* nos tecidos dos mamíferos é uma forma de hipersensibilidade tardia mediada por células (WARREN *et al.*, 1967) levou ao estudo da especificidade dessa reação. Inicialmente foi descoberto que não há reação cruzada em termos de formação de granuloma entre *Ascaris suis* e ovos de *S. mansoni* (WARREN *et al.*, 1967). Em seguida, estudos revelaram que há relativamente pouca reação cruzada entre os ovos das três principais

espécies de *Schistosoma*, o que indicou certo grau de especificidade da reação granulomatosa (WARREN & DOMINGO, 1970a). DOMINGO & WARREN (1968) injetaram ovos de *S. mansoni* na veia caudal de camundongos infectados previamente pelo trematódeo e observaram reações em torno dos ovos localizados nos pulmões. As reações aumentaram rapidamente de tamanho somente nos animais em que os vermes já tinham iniciado a oviposição. Para elucidar esta questão, WARREN & DOMINGO (1970b), estudaram a formação do granuloma ao redor dos ovos de *S. mansoni*, em camundongos com infecção unissexual e naqueles expostos previamente a cercárias irradiadas ou a vermes mortos da mesma espécie. Nestes casos não houve sensibilização, verificando-se o desenvolvimento de reação granulomatosa semelhante àquela observada em animais não sensibilizados previamente. Nos camundongos infectados e nos sensibilizados com ovos homólogos injetados na veia caudal, a reação granulomatosa, foi marcadamente acelerada e mais intensa. Os autores concluíram que a reação granulomatosa que se desenvolve ao redor dos ovos de *S. mansoni* era estágio específico e a sensibilização poderia ser alcançada através de secreções do ovo, mas não por outros estágios evolutivos do *Schistosoma* (WARREN & DOMINGO, 1970b). A transferência passiva da resposta granulomatosa anamnética pelos ovos de *S. mansoni* poderia ser obtida com células linfóides, mas não com soro imune (WARREN *et al.*, 1967). Em uma série de estudos usando substâncias imunossupressoras foi confirmada essa observação (DOMINGO & WARREN, 1967; PERROTO & WARREN, 1969).

As conseqüências da reação granulomatosa devem ser consideradas em três níveis. Uma é a proteção contra danos para o hospedeiro provocados pelos ovos de *Schistosoma*, como sugerido por LICHTENBERG (1964). Uma segunda conseqüência da formação do granuloma é a destruição dos ovos. Entre as várias células recrutadas para a resposta anti-ovo, os eosinófilos interagem intimamente com a superfície dos ovos e apresentam capacidade para destruir ovos de *S. mansoni* depois da ativação destas células por anticorpos citofílicos ou por linfocinas (JAMES & COLLEY, 1976).

Uma terceira conseqüência da resposta granulomatosa está diretamente relacionada com a patogênese do *S. mansoni*. Ovos impactados nas vênulas podem não impedir completamente a circulação, mas a presença de granulomas pode bloquear

o fluxo sanguíneo e levar ao desenvolvimento de fibrose pré capilar sinusóide, denominada de fibrose de Symmers (BLOCH *et al.*, 1972). A maior deposição de tecido fibroso está intimamente ligada com a presença de granulomas. A síntese de colágeno é notadamente aumentada, proporcional a intensidade e duração da resposta granulomatosa (VAN MARK *et al.*, 1983).

Estudos realizados referem aspectos importantes a serem considerados: a) experimentos usando camundongos desprovidos de células T, mostraram a presença de granulomas pequenos com ausência de eosinófilos (PHILLIPS *et al.*, 1977); b) antígenos de ovos de *S. mansoni* hepatotóxicos foram caracterizados (DUNNE *et al.*, 1981); c) a participação de anticorpos com ação de neutralizar os produtos hepatotóxicos do ovo foi sugerido por vários autores (BUCHANAN *et al.*, 1973; BOROS *et al.*, 1975; BRITO *et al.*, 1983).

Em consequência de inúmeras reações granulomatosas no fígado, o funcionamento desse órgão é alterado (JANKOVIC *et al.*, 1998), podendo levar a grave insuficiência hepática. As varizes localizadas no tubo digestivo, como consequência da hipertensão portal e da deposição de colágeno, são consideradas por alguns a mais grave manifestação da infecção esquistossomótica (BENNETT, 1997). Embora o mecanismo de depósito de colágeno tenha sido demonstrado por CHEEVER *et al.* (1994) e WYNN *et al.* (1995) envolvendo citocinas Th₂ (IL-4, IL-5, IL-10 e TGF β), além de IgE, IgG₄ e eosinófilos (PEARCE *et al.*, 1991), a identidade dos antígenos do ovo do parasito e o mecanismo pelo qual fibroblastos são induzidos a secretar colágeno necessitam ser esclarecidos (WYLER, 1992). Estudos mostraram que o granuloma e a fibrose hepática dependem marcadamente da regulação de citocinas (STAVITSKY, 2004; WYNN *et al.*, 2004).

No camundongo, os granulomas ao redor dos ovos alcançam o tamanho máximo 4 a 6 semanas depois do início da deposição dos ovos e depois vão se tornando menores com a progressão para a fase crônica da doença (ANDRADE & WARREN, 1964). Esta mudança na intensidade da resposta granulomatosa na fase crônica da doença não é devida a alterações na imunogenicidade do ovo (DOMINGO & WARREN, 1968). A modulação está associada com um aumento da resposta de anticorpos aos antígenos do ovo (PELLEY *et al.*, 1976).

Há evidências de que as células T CD4 são fundamentais para a formação do granuloma ao redor dos ovos (MATHEW & BOROS, 1986; WYNN *et al.*, 2004) e que células T CD8 parecem importantes para a regulação do tamanho do granuloma nas infecções crônicas (CHENSUE & BOROS, 1979; HENDERSON *et al.*, 1992), embora anticorpos também participem da imunorregulação (JANKOVIC *et al.*, 1998; PEARCE & MACDONALD, 2002; WILSON *et al.*, 2007).

SILVA *et al.* (2000) referiram que a modulação do granuloma esquistossomótico é um fenômeno exclusivamente hepático, e que os granulomas intestinais e pulmonares, formados ao redor dos ovos, não mudaram de tamanho e aparência com o tempo. Os componentes matriciais que foram pesquisados (colágenos I, III e IV, elastina, fibronectina), foram encontrados nos granulomas do fígado, intestino e pulmões, estando mais presentes no fígado. A grande quantidade de componentes extracelulares achados nos granulomas hepáticos foi a principal responsável pelas mudanças do aspecto morfológico do granuloma. No pulmão os granulomas apresentaram a mesma morfologia independentemente do tempo de infecção (SOUZA VIDAL *et al.*, 1993; ELTOUM *et al.*, 1995).

Segundo SOUZA VIDAL *et al.* (1993) e SILVA *et al.* (2000) a modulação é bem evidente para os granulomas localizados no fígado e menos evidente naqueles que se formam no intestino e não ocorre nos que se desenvolvem nos pulmões. Portanto, a localização do granuloma no hospedeiro tem uma forte influência na presença da modulação do granuloma, bem maior do que os fatores humorais e celulares circulantes. Para CONLON (2005) a reação granulomatosa é um processo dinâmico em que o tamanho e a composição celular das lesões variam com o tempo e é coordenado pela influência de uma rede de mediadores inflamatórios.

A evolução da resposta do hospedeiro à presença de ovos de *S. mansoni* em animais experimentais tem sido dividida pelos estudiosos em vários estágios. Segundo RASO & BOGLIOLO (1970) os granulomas apresentam os seguintes estágios: fase necrótica-exsudativa, fase exsudativa, fase produtiva e fase de cura por fibrose. Recentemente, LINS *et al.* (2008) sugeriram uma modificação na classificação para a evolução do granuloma hepático elaborada a partir de fases descritas por outros pesquisadores (LENZI *et al.*, 1998; CONLON, 2005): fase pré-granulomatosa de reação

inicial; fase pré-granulomatosa exsudativa; fase necrótico-exsudativa; fase produtiva; fase de cura por fibrose, acrescidos então, dos dados referentes à dinâmica de distribuição dos eosinófilos.

Em 1965, CHEEVER realizou um estudo comparativo sobre a evolução da infecção esquistossomótica em camundongos, macacos, ratos e hamsters. Apesar da alta suscetibilidade apresentada, esses animais mostraram considerável diferença em suas respostas durante a infecção aguda e crônica. A obstrução portal funcional foi maior no camundongo do que nas outras espécies de hospedeiros observados, o mesmo acontecendo com a intensidade da reação granulomatosa no fígado. Os resultados desse estudo sugeriram que a maior hipertensão portal nos camundongos estaria relacionada com o tamanho maior dos granulomas hepáticos.

A patogenia da doença pode ser relacionada com a infectividade da linhagem em relação aos hospedeiros intermediário e definitivo, a distribuição dos ovos nos tecidos e o tamanho das reações granulomatosas (ROLLINSON & SOUTHGATE, 1987).

De acordo com trabalhos na literatura, observa-se uma diversidade intra-específica relacionada ao comportamento do *S. mansoni* de regiões geográficas diferentes (PARAENSE & CORRÊA, 1963b; SAUD, 1966; MAGALHÃES, 1969a; MAGALHÃES & CARVALHO, 1969, 1973a, 1976; PARAENSE & CORRÊA, 1978; ZANOTTI-MAGALHÃES *et al.*, 1993a, 1997). A diversidade intra-específica pode ser a base da variação regional observada na aparência clínica da esquistossomose (COELHO *et al.*, 1989). O grau de morbidade da esquistossomose mansônica humana varia nas diferentes regiões, possivelmente porque a infectividade e a fecundidade do parasita é variável (HIGGINS-OPITIZ & DETTMAN, 1991).

Estudando o desenvolvimento das linhagens BH e SJ de *S. mansoni*, descritas por PARAENSE & CORRÊA (1963a), MAGALHÃES & CARVALHO (1969, 1973b, 1976), MAGALHÃES *et al.* (1975a) e BRUNET *et al.* (1998) observaram diferenças de comportamento dessas linhagens no hospedeiro definitivo. Em camundongos infectados por *S. mansoni* da linhagem BH foi observado maior número de granulomas hepáticos por parasitos em relação aos camundongos infectados por *S. mansoni* da linhagem SJ. Foi verificado também que, dentro de certos limites, existe um percentual significativamente menor de sobrevivência de camundongos infectados pela linhagem

BH. Um número bem menor de parasitas da linhagem BH provocou nos camundongos níveis de nocividade equivalentes aos provocados por maior número de vermes da linhagem SJ (MAGALHÃES & CARVALHO, 1976). Esses experimentos mostraram a maior patogenicidade da linhagem BH (MAGALHÃES & CARVALHO, 1976; MAGALHÃES *et al.*, 1975a; ZANOTTI-MAGALHÃES *et al.*, 1993a, 1995).

LEMOS NETO *et al.* (1978) verificaram nas linhagens BH e SJ que quanto maior o número de vermes por camundongo, menor o número de granulomas hepáticos por verme, isto é, quanto maior a densidade populacional de *S. mansoni*, menor a formação de granulomas hepáticos por verme. ZANOTTI-MAGALHÃES *et al.* (1991, 1993a, 1995, 1997), utilizando cercárias oriundas de moluscos selecionados para a suscetibilidade, verificaram maior patogenicidade do trematódeo em camundongos, determinada por maior número de granulomas esquistossomóticos por área de tecido hepático. Estes autores verificaram ainda que o *S. mansoni* originado em moluscos mais suscetíveis produziu maior número de ovos eliminados nas fezes e que as reações granulomatosas em torno dos ovos depositados no fígado, intestino, baço e pulmão eram menores. Segundo DOENHOFF *et al.* (1986), existe uma significativa correlação entre o diâmetro dos granulomas hepáticos e o número de ovos eliminados com as fezes.

YOSHIOKA *et al.* (2002) estudando a patogenia do *S. mansoni* das linhagens BH, SJ e SR (Santa Rosa -Campinas, SP) observaram que, embora as diferenças nem sempre tenham sido significativas, nos camundongos infectados com a linhagem BH o número de reações granulomatosas em todos os órgãos estudados foi maior, quando comparado com o número de granulomas verificados nas linhagens SJ e SR. Vermes adultos e ovos da linhagem BH se mostraram maiores do que aqueles da linhagem SJ (MAGALHÃES & CARVALHO, 1973b; KASTNER *et al.*, 1975; PARAENSE & CORRÊA, 1981; ZANOTTI-MAGALHÃES *et al.*, 1993b; MACHADO-SILVA *et al.*, 1994, 1995, 1997, 1998; NEVES *et al.*, 1998, 2002; ZUIM, 2003).

Nas áreas endêmicas dominadas pela linhagem BH são encontrados indivíduos com esquistossomose hepatoesplênica descompensada, o que não ocorre nas áreas abrangidas pela linhagem SJ, onde os casos, quase totalmente, são assintomáticos

sendo raros os casos de hepatoesplenomegalia compensada (SANTOS, 1967; DIAS *et al.*, 1988; LIMA, 1991).

Têm sido relatados desde 1998 casos autóctones de esquistossomose mansônica no Jardim São Domingos (Campinas, SP). De exemplares de *B. tenagophila* coletados na Lagoa Boa União, localizada no Jardim São Domingos, foi possível o isolamento da linhagem do trematódeo em laboratório (linhagem SD). FREITAS & OLIVEIRA (2002) e FREITAS *et al.* (2002) verificaram sinais de hipertensão portal e neuroesquistossomose medular em pacientes com esquistossomose autóctone atendidos no centro de saúde no Jardim São Domingos (Campinas). O envolvimento do sistema nervoso central por *Schistosoma* pode ou não determinar manifestações clínicas. A neuroesquistossomose é uma das manifestações mais graves da infecção. A patogenia da mielopatia esquistossomótica permanece desconhecida, porém, admite-se que a resposta inflamatória do hospedeiro aos ovos presentes no tecido nervoso constitua o principal determinante das lesões do SNC (PITTELLA, 1997). A resposta inflamatória pode variar de intensa originando quadros graves, até a uma reação mínima sem manifestação clínica. QUEIROS (1974) observou vermes adultos nos vasos subaracnóides da medula espinhal e lesões medulares granulomatosas foram encontradas em torno de ovos depositados. A deposição de ovos do *S. mansoni* no cérebro e meninges é mais freqüente nos pacientes com esquistossomose hepatoesplênica. A migração para o cérebro se faz através dos “shunts” arteriovenosos pulmonares ou portopulmonares e ocorre sem manifestações clínicas. Em 1981, PITTELLA & LANA-PEIXOTO encontraram ovos de *S. mansoni* em 26% dos 46 cérebros de pacientes esquistossomóticos hepatoesplênicos necropsiados.

Segundo CHEEVER *et al.* (2002) a infecção por *S. mansoni* em modelos experimentais contribui fortemente para o entendimento da patologia e da patogenia e mais amplamente para o entendimento das reações granulomatosas. O primeiro experimento descrito em que os ovos foram inoculados pela veia caudal para o estudo das reações granulomatosas foi realizado por COKER & LICHTENBERG (1956). Existem diversas técnicas, baseadas fundamentalmente no mesmo princípio; os ovos são obtidos a partir dos tecidos de animais infectados experimentalmente e, a seguir, concentrados. Considerando que o ovo amadurece nos tecidos do hospedeiro durante

seu caminho até a luz intestinal, na suspensão de ovos encontramos ovos em diferentes estádios de desenvolvimento (PELLEGRINO *et al.*, 1962).

O pulmão do camundongo representa um modelo conhecido, no qual a injeção intravenosa de ovos na veia caudal tem como conseqüência, sua localização nos pequenos vasos da circulação pulmonar, onde vão dar origem às lesões inflamatórias.

Devido à importância das reações granulomatosas na patogenia do *S. mansoni* realizamos duas pesquisas:

a) estudamos comparativamente as reações granulomatosas em torno dos ovos de *S. mansoni* das linhagens BH e SJ, inoculados através da veia caudal de camundongos infectados ou não com *S. mansoni* BH;

b) realizamos um estudo comparativo da patogenicidade do *S. mansoni* da linhagem isolada no Jardim São Domingos (Campinas, SP) e das linhagens BH (Belo Horizonte, MG) e SJ (Vale do Paraíba do Sul, SP).

2. OBJETIVOS

⇒ Estudar a evolução no desenvolvimento das reações granulomatosas em torno dos ovos de *S. mansoni* das linhagens BH e SJ. Verificar também se a reação granulomatosa em torno do ovo de *S. mansoni* é linhagem específica.

Os parâmetros verificados foram:

- Tamanho dos granulomas pulmonares em torno dos ovos de *S. mansoni* das linhagens BH e SJ.
- Número de granulomas por área de tecido pulmonar.
- Tamanho dos granulomas hepáticos.
- Número dos granulomas no fígado.
- Número de esquistossomos machos e fêmeos.

⇒ Avaliar a patogenia do *S. mansoni* da linhagem isolada do Jardim São Domingos (Campinas, SP) realizando um estudo comparativo com as linhagens BH e SJ.

Os parâmetros verificados foram:

- Número e tamanho dos ovos.
- Cercárias e sua capacidade de penetração.
- Número de vermes no sistema porta-mesentérico.
- Número de reações granulomatosas presentes no fígado, baço, intestino (cólon ascendente), pâncreas e pulmão.
- Área dos granulomas observados no fígado e intestino.
- Dimensões dos ovos.

3. PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

Foram utilizados moluscos *B. glabrata* e *B. tenagophila*, criados no moluscário do Laboratório de Helmintologia do Instituto de Biologia da UNICAMP, descendentes de caramujos provenientes respectivamente de Belo Horizonte, MG, de São José dos Campos, SP e de Campinas, SP (Lagoa Boa União, Jardim São Domingos).

Foram utilizadas três linhagens do trematódeo: a linhagem SJ oriunda de São José dos Campos (SP) mantida com *B. tenagophila* simpátrica, linhagem BH originada de Belo Horizonte (BH), mantida com *B. glabrata* simpátrica e a linhagem SD proveniente do Jardim São Domingos mantida com *B. tenagophila* simpátrica.

Para o estudo da evolução das reações granulomatosas em torno dos ovos de *S. mansoni*, das linhagens BH e SJ, camundongos foram inoculados pela veia caudal com ovos maduros do trematódeo de ambas as linhagens. Decorridos 1, 8, 15 e 34 dias após a inoculação os animais foram mortos e os granulomas presentes no pulmão foram contados e a área da lesão em torno do ovo foi medida.

Para o estudo da especificidade da reação granulomatosa em torno dos ovos das linhagens BH e SJ de *S. mansoni*, camundongos foram infectados por cercárias de *S. mansoni* BH e na 8ª semana de infecção um grupo foi inoculado pela veia caudal com ovos BH e outro grupo com ovos SJ. Após 1, 8, 15, 34 dias da inoculação dos ovos, foram verificadas as reações granulomatosas presentes nos pulmões e fígado, observando-se a quantidade de lesões por área de tecido e o tamanho das reações granulomatosas.

Para avaliar a patogenia do *S. mansoni* da linhagem isolada no Jardim São Domingos (Campinas, SP) e realizar um estudo comparativo com as linhagens BH e SJ foram constituídos três grupos de camundongos infectados e na oitava semana de infecção os camundongos sobreviventes foram mortos para recuperação de vermes. Os parâmetros verificados foram: número de cercárias penetrantes; número de ovos eliminados nas fezes; número de esquistossomos no sistema porta-mesentérico; número de granulomas presentes no fígado, baço, intestino (cólon ascendente),

pâncreas e pulmão, área dos granulomas observados no fígado e intestino e tamanho dos ovos de *S. mansoni*.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. ESTUDO DA EVOLUÇÃO E DA ESPECIFICIDADE DA REAÇÃO GRANULOMATOSA EM TORNO DOS OVOS BH E SJ DE *S. mansoni*.

4.1.1. Infecção dos moluscos

Para a infecção de camundongos com cercárias das linhagens BH e SJ exemplares de *B. glabrata* foram expostos a 10 miracídios de *S. mansoni* da linhagem BH e exemplares de *B. tenagophila* foram expostos a 10 miracídios de *S. mansoni* da linhagem SJ. Os moluscos foram mantidos em contato com os miracídios por 2 horas, sob a ação da luz e a temperatura de aproximadamente 28 °C. Decorridos 30 dias, os moluscos foram examinados para verificação da eliminação de cercárias. As cercárias eliminadas foram utilizadas na infecção dos camundongos.

4.1.2. Infecção dos camundongos

Utilizando-se cercárias das linhagens BH e SJ eliminadas pelos moluscos *B. glabrata* e *B. tenagophila*, respectivamente, camundongos albinos Swiss, SPF (Specific Pathogen Free), com 30 dias de idade, fêmeos, oriundos do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica da Unicamp, foram infectados imergindo suas caudas em tubo de ensaio contendo 100 cercárias durante 2 horas de exposição à luz e a temperatura de aproximadamente 28 °C.

4.1.3. Obtenção de ovos de *S. mansoni* e inoculação pela veia caudal dos camundongos

Camundongos infectados percutaneamente com 100 cercárias da linhagem BH e SJ, após 8 semanas da infecção, foram mortos e submetidos ao seguinte processamento:

- a) Retirada do intestino, que foi aberto em toda sua extensão e limpo do seu conteúdo.

- b) O intestino foi seccionado, em pequenas porções que foram fragmentadas em liquidificador, com salina fria a 0,85%, para evitar a eclosão dos miracídios.
- c) O material resultante da liquidificação foi peneirado em uma sucessão de peneiras progressivamente mais finas (0,150mm, 0,075mm, 0,045mm e 0,038mm), sempre se adicionando salina fria a 0,85%, para se conseguir a eliminação do tecido fragmentado.
- d) O conteúdo da peneira da malha mais fina (0,038mm), foi lavado várias vezes, transferido para uma placa de Petri e por meio de movimentos rotatórios, os ovos foram levados para a zona central e daí retirados com pipeta Pasteur.
- e) Pipetados, esses ovos foram passados por duas peneiras de malha de nylon (0,045mm e 0,038mm), realizando-se novas lavagens.
- f) Finalmente os ovos, retidos na peneira de malha mais fina, ficaram prontos para serem utilizados nos experimentos.

Esta suspensão continha ovos em diferentes estádios de desenvolvimento, sendo que para efeitos de contagem do número de ovos a serem inoculados, somente foram contabilizados aqueles ovos com miracídios ativos. Foram inoculados na veia caudal dos camundongos aproximadamente 1000 ovos, individualmente, em 0,3 ml de solução salina, quantidade apropriada para o desenvolvimento da pesquisa (WARREN & DOMINGO, 1970a).

4.1.4. Inoculação dos ovos

Foram formados 4 grupos de experimentação:

- Grupo I: 12 camundongos inoculados individualmente com ovos de *S. mansoni* da linhagem BH pela veia caudal.
- Grupo II: 12 camundongos inoculados individualmente com ovos de *S. mansoni* da linhagem SJ pela veia caudal.
- Grupo III: 12 camundongos infectados percutaneamente com 100 cercárias de *S. mansoni* da linhagem BH e posteriormente inoculados individualmente com 1000 ovos de *S. mansoni* da linhagem BH pela veia caudal.

Grupo IV: 12 camundongos infectados percutaneamente com 100 cercárias de *S. mansoni* da linhagem BH e posteriormente inoculados individualmente com 1000 ovos de *S. mansoni* da linhagem SJ pela veia caudal.

Nos grupos III e IV, na 8ª semana de infecção, os camundongos foram inoculados com ovos de *S. mansoni* pela veia caudal.

Os camundongos de cada grupo foram mortos, por deslocamento cervical, nos dias 1, 8, 15, 34 dias depois da inoculação dos ovos. Nestes dias pré-estabelecidos foram mortos 3 camundongos, perfazendo os 12 de cada grupo.

4.1.5. Contagem do número de cercárias e obtenção de vermes

Nos grupos III e IV, após o período de exposição da cauda dos roedores às cercárias de *S. mansoni* determinou-se o número de cercárias infectantes pela contagem do número de cercárias sobrantes observadas nos tubos de ensaio nos quais estavam depositadas as caudas dos roedores (MAGALHÃES, 1969b).

Os camundongos foram sacrificados nos dias estabelecidos e os vermes foram coletados através da perfusão do sistema porta-hepático (YOLLES *et al.*, 1947) e foram separados conforme o sexo.

4.1.6. Número e tamanho dos granulomas no fígado e pulmão

Por ocasião do sacrifício, fragmentos do fígado (Grupo III e IV) e do pulmão (Grupos I, II, III e IV) foram fixados em Bouin aquoso, com a finalidade da realização de cortes histológicos de 5 µm de espessura para contagem e medição dos granulomas esquistossomóticos. Os cortes histológicos foram corados com tricrômico de Masson (ZANOTTI-MAGALHÃES *et al.*, 1993a).

Em seguida, foram analisados sob microscópio óptico a fim de se calcular o número de granulomas por área tissular (0,98 mm²), a qual foi determinada através da técnica de MAGALHÃES *et al.* (1975b) e o tamanho das reações granulomatosas, tomando-se sua área. As medições foram realizadas utilizando o programa "Image Pro Lite", version 4,0 para Windows 95/NT/98.

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Estadual de Campinas (Protocolo nº 870-1).

4.1.7. Análise estatística

Para a comparação da análise dos dados da evolução e especificidade das reações granulomatosas nas linhagens BH e SJ, foi utilizado o Programa (Statistical Analysis System, SAS, Inc. 2006), através do PROC GLM (General Linear Procedure).

4.2. AVALIAÇÃO DA PATOGENIA DO *S. mansoni* DA LINHAGEM ISOLADA NO JARDIM SÃO DOMINGOS (CAMPINAS, SP).

4.2.1. Infecção dos moluscos

Para a infecção de camundongos com as cercárias das linhagens BH, SJ e SD, exemplares (simpátricas às linhagens de *S. mansoni*) de *B. glabrata* foram submetidos a infecção com 10 miracídios de *S. mansoni* da linhagem BH, e exemplares de *B. tenagophila* foram expostos a 10 miracídios de *S. mansoni* da linhagem SJ simpátrica e exemplares *B. tenagophila* expostos a 10 miracídios da linhagem SD simpátrica. Os moluscos foram expostos à infecção por 2 horas, sob a ação da luz e a temperatura de 28 °C. Decorridos 30 dias, os moluscos foram examinados para verificação da eliminação de cercárias. As cercárias eliminadas foram utilizadas na infecção dos camundongos.

4.2.2. Infecção dos camundongos

Camundongos albinos Swiss, SPF, com 30 dias de idade, fêmeos, oriundos do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica da Unicamp, foram infectados imergindo suas caudas em tubo de ensaio contendo 70 cercárias durante 2 horas de exposição à luz e a temperatura de 28 °C. Foram expostos à infecção por cercárias de *S. mansoni* das linhagens BH, SJ e SD constituindo três grupos de experimentação: Grupo 1: 15 camundongos infectados com cercárias de *S. mansoni* da linhagem BH. Grupo 2: 10 camundongos infectados com cercárias de *S. mansoni* da linhagem SJ.

Grupo 3: 10 camundongos infectados com cercárias de *S. mansoni* da linhagem SD.

4.2.3. Verificação das cercárias penetrantes

O número de cercárias penetrantes foi obtido pela diferença entre o número de cercárias a que o camundongo foi exposto e o número de cercárias sobrantes e que não penetraram pela cauda do roedor (MAGALHÃES, 1969b).

4.2.4. Verificação do número e medição de ovos de *S. mansoni* eliminados nas fezes.

O número de ovos eliminados nas fezes dos camundongos infectados foi verificado a partir da 3ª semana de infecção dos animais, através do método quantitativo de Kato-Katz (KOMYIA & KOBAYASHI, 1966; KATZ *et al.*, 1972). Foram preparadas três lâminas para cada grupo de cinco animais, de modo que o resultado final correspondeu a uma média aritmética dessas lâminas.

Para as medidas, os ovos foram concentrados pelo método de HOFFMAN *et al.* (1934). Lâminas contendo ovos foram montadas em glicerina. Foram medidos o comprimento, a largura e também o comprimento do espículo lateral. As medidas foram tomadas utilizando o programa “Image Pro Lite”, versão 4.0, para Windows 95/NT/98.

4.2.5. Obtenção e contagem dos vermes

Os animais sobreviventes ao final da 8ª semana foram mortos por deslocamento cervical. A coleta dos vermes foi realizada por meio de perfusão do sistema porta-mesentérico. Após esse procedimento, foi anotado o número de vermes machos e fêmeos, tanto isolados, como em casais.

4.2.6. Obtenção, número e tamanho dos granulomas nas vísceras

Após a perfusão, foram retirados fragmentos do fígado, baço, cólon ascendente, pulmão e pâncreas dos animais sacrificados para a contagem e medição dos granulomas. Os fragmentos foram fixados em Bouin aquoso e cortes histológicos de 5 µm de espessura foram corados com tricrômico de Masson (ZANOTTI-MAGALHÃES *et al.*, 1993a). Em seguida, foram analisados sob microscópio óptico a fim de se calcular o

número de granulomas por área tissular ($1,25 \text{ mm}^2$), a qual foi determinada através da técnica de MAGALHÃES *et al.* (1975b) e o tamanho das reações granulomatosas, tomando-se sua área. As medições foram realizadas utilizando o programa "Image Pro Lite", version 4,0 para Windows 95/NT/98.

4.2.7. Análise estatística

Para análise dos parâmetros referentes ao estudo da patogenia do *S. mansoni* das linhagens BH, SJ e SD, foi utilizado o Programa SAS (Statistical Analysis System, SAS, Inc. 2006), através do PROC GLM (General Linear Procedure).

5. RESULTADOS

CAPÍTULO I

**ESTUDO DAS REAÇÕES GRANULOMATOSAS EM TORNO DOS
OVOS DE *Schistosoma manson* DAS LINHAGENS BH E SJ**

CAPÍTULO II

**REAÇÕES GRANULOMATOSAS E PATOGENIA DE
LINHAGENS DE *Schistosoma manson***

CAPÍTULO I

ESTUDO DAS REAÇÕES GRANULOMATOSAS EM TORNO DOS OVOS DE *Schistosoma mansoni* DAS LINHAGENS BH E SJ

RESUMO: Diferenças morfológicas e biológicas entre linhagens de *Schistosoma mansoni* têm sido relatadas. A maior patogenia da linhagem BH em comparação com a linhagem SJ tem sido atribuída a grande quantidade de granulomas na linhagem BH observada em infecções experimentais, o que determinou a maior mortalidade dos hospedeiros definitivos. O objetivo deste trabalho foi estudar a evolução da reação granulomatosa em torno dos ovos de *S. mansoni* das linhagens BH e SJ e verificar se esta reação é linhagem específica. Para o estudo da evolução das reações granulomatosas, dois grupos de camundongos foram inoculados pela veia caudal com ovos maduros de *S. mansoni* das linhagens BH e SJ e sacrificados após 1, 8, 15 e 34 dias. Para o estudo da especificidade da reação granulomatosa dois grupos de camundongos foram infectados por cercárias de *S. mansoni* BH e na 8ª semana de infecção um grupo foi inoculado pela veia caudal com ovos BH e outro grupo com ovos SJ. Os camundongos foram sacrificados após 1, 8, 15 e 34 dias após a inoculação dos ovos. Os parâmetros analisados foram: número de granulomas por área de tecido pulmonar e hepático e tamanho das reações granulomatosas. Nos camundongos apenas inoculados com ovos, a reação granulomatosa no pulmão foi semelhante para os ovos BH e SJ. Comparando-se as linhagens estudadas, constatou-se que no grupo de camundongos infectados previamente por cercárias e inoculados com ovos da linhagem BH a reação granulomatosa no pulmão foi marcadamente de maior tamanho ($32499 \mu\text{m}^2$). Neste grupo também foi encontrado maior número de reações granulomatosas (2,61 por área tissular de $0,98\text{mm}^2$). Os resultados indicaram haver certa especificidade na resposta granulomatosa em torno dos ovos das linhagens BH e SJ de *S. mansoni* no pulmão.

Palavras chave: *Schistosoma mansoni*, esquistossomose, patogenia, linhagens.

INTRODUÇÃO

Na esquistossomose mansônica, ao ovo do trematódeo é atribuído o principal papel patogênico. A lesão característica é o granuloma esquistossomótico, que se forma em torno dos ovos maduros depositados nos tecidos do hospedeiro definitivo. A distribuição dos ovos nos tecidos, o tamanho das reações granulomatosas e o grau de infectividade da linhagem do parasito são fatores importantes na patogenia (ROLLINSON & SOUTHGATE, 1987).

A diversidade intra-específica relacionada ao comportamento do *Schistosoma mansoni* de linhagens diferentes (SAOUD, 1966; PARAENSE & CORRÊA, 1963, 1978; MAGALHÃES & CARVALHO, 1969, 1973, 1976; ZANOTTI-MAGALHÃES *et al.*, 1993, 1997), pode ser a base da variação regional observada na aparência clínica da esquistossomose (COELHO *et al.*, 1989). O grau de morbidade da esquistossomose mansônica humana varia nas diferentes regiões, possivelmente porque a infectividade e a fecundidade do parasita é variável (HIGGINS-OPITIZ & DETTMAN, 1991).

Estudos realizados (YOSHIOKA *et al.*, 2002) comparando a patogenia de diferentes linhagens brasileiras de *S. mansoni* (linhagens BH, SJ e SR) mostraram que nos camundongos infectados com a linhagem BH (Belo Horizonte), o número de reações granulomatosas em todos os órgãos estudados foi maior, quando comparado com o número de granulomas verificados nas linhagens SJ (São José dos Campos) e SR (Santa Rosa). Vermes adultos e ovos da linhagem BH se apresentaram maiores do que aqueles da linhagem SJ (MAGALHÃES & CARVALHO, 1973; KASTNER *et al.*, 1975; PARAENSE & CORRÊA, 1981; ZANOTTI-MAGALHÃES *et al.*, 1993; MACHADO-SILVA *et al.*, 1994, 1995, 1997, 1998; NEVES *et al.*, 1998, 2002; ZUIM, 2003).

Considerando a importância do ovo do *S. mansoni* na patogenicidade da esquistossomose e que a resposta imune granulomatosa por ele induzida é estágio específica (WARREN *et al.*, 1967) resolvemos estudar o desenvolvimento da reação inflamatória, em tecido pulmonar de camundongos através da inoculação de ovos de *S.*

mansoni das linhagens BH e SJ pela veia caudal dos animais. Evoluíram de forma distinta as reações granulomatosas em torno do ovo do *S. mansoni* das linhagens BH e SJ? Seria a reação granulomatosa em torno do ovo de *S. mansoni* linhagem específica?

MATERIAL E MÉTODOS

Linhagens de *S. mansoni* e obtenção de ovos do trematódeo.

Foram utilizadas duas linhagens do trematódeo: a linhagem SJ oriunda de São José dos Campos (SP) e mantida em populações de *Biomphalaria tenagophila* simpátricas e a linhagem BH, originada de Belo Horizonte (BH) e mantida em populações de *B. glabrata* simpátricas. As cercárias obtidas dos moluscos infectados foram utilizadas para infecção de camundongos Swiss, SPF (Specific Pathogen Free) (MAGALHÃES, 1969).

Os ovos de *S. mansoni* das linhagens BH e SJ foram obtidos da parede intestinal de camundongos previamente infectados com as respectivas linhagens do trematódeo. Cerca de 1000 ovos maduros em 0,3 ml de solução fisiológica foram inoculados na veia caudal dos camundongos (WARREN & DOMINGO, 1970).

Grupos Experimentais.

Foram formados 4 grupos de experimentação:

Grupo I: 12 camundongos inoculados individualmente com ovos de *S. mansoni* da linhagem BH.

Grupo II: 12 camundongos inoculados individualmente com ovos de *S. mansoni* da linhagem SJ.

Grupo III: 12 camundongos infectados percutaneamente com 100 cercárias de *S. mansoni* da linhagem BH e na 8ª semana de infecção foram inoculados individualmente com ovos de *S. mansoni* da linhagem BH pela veia caudal.

Grupo IV: 12 camundongos infectados percutaneamente com 100 cercárias de *S. mansoni* da linhagem BH e na 8ª semana de infecção foram inoculados individualmente com ovos de *S. mansoni* da linhagem SJ pela veia caudal.

Os camundongos de cada grupo foram mortos, por deslocamento cervical, nos dias 1, 8, 15, 34 dias depois da inoculação dos ovos. Nestes dias pré-estabelecidos foram sacrificados 3 camundongos, perfazendo os 12 de cada grupo. Nos grupos III e IV por ocasião do sacrifício os vermes foram coletados através da perfusão do sistema porta-mesentérico (YOLLES *et al.*, 1947) e foram separados conforme o sexo.

Número e tamanho dos granulomas no fígado e pulmão.

Por ocasião do sacrifício, fragmentos do fígado (Grupos III e IV) e pulmão (Grupos I, II, III e IV) foram fixados em solução Bouin aquoso, com a finalidade de realização de cortes histológicos de 5 μ m de espessura para contagem e medição dos granulomas esquistossomóticos. Os cortes histológicos foram corados com tricrômico de Masson (ZANOTTI-MAGALHÃES *et al.*, 1993).

As preparações histológicas foram analisadas sob microscópio óptico a fim de se calcular o número de granulomas por área tissular (0,98 mm²), a qual foi determinada através da técnica de MAGALHÃES *et al.* (1975) e o tamanho das reações granulomatosas, tomando-se sua área. Somente foram medidos os granulomas que continham em seu centro um ovo de *S. mansoni*. As medições foram realizadas utilizando o programa "Image Pro Lite", version 4,0 para Windows 95/NT/98.

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Estadual de Campinas (Protocolo nº 870-1).

Análise estatística.

Os parâmetros utilizados foram: tamanho dos granulomas pulmonares em torno dos ovos de *S. mansoni* das linhagens BH e SJ; número de granulomas por área de tecido pulmonar; tamanho dos granulomas hepáticos; número dos granulomas no fígado e número de esquistossomos machos e fêmeos.

Para a análise utilizou-se o programa SAS (Statistical Analysis System, SAS, Inc. 2006), através do PROC GLM (General Linear Procedure).

RESULTADOS

Na Tabela 1 estão apresentados os dados obtidos nos Grupos III e IV referentes ao número de cercárias penetrantes e o número de vermes recuperados. Não se observou diferença significativa no número de cercárias penetrantes nos dois grupos ($p=0,4667$).

Comparando-se os Grupos, III e IV, verificou-se que o número de vermes machos, o número de vermes fêmeos e o número de vermes totais foram significativamente maiores no Grupo III ($p=0,0012$, $p=0,0036$, $p=0,0019$, respectivamente).

Área dos granulomas no pulmão (Figura 1). Os dados obtidos resultaram das medidas de um total de 91 granulomas no Grupo I, 69 no Grupo II, 115 no Grupo III e 105 granulomas no Grupo IV. Nos primeiros períodos de observação (1º e 8º dias) a reação granulomatosa se caracterizou por infiltrado leucocitário circunscrito por poucos fibroblastos no 8º dia. Aos quinze dias após a inoculação dos ovos foram observadas células gigantes e fibroblastos e nos 34 dias a reação granulomatosa estava circunscrita por fibrose. Independentemente do período de inoculação dos ovos, houve diferença significativa ($p<0,0001$) entre os grupos em relação a área dos granulomas (Figura 1B). Os maiores granulomas foram observados nos Grupos III ($32499 \mu\text{m}^2$) e IV ($27305 \mu\text{m}^2$) (infectados previamente com *S. mansoni* BH) e os menores nos Grupos I ($17636 \mu\text{m}^2$) e II ($13543 \mu\text{m}^2$) (apenas inoculados com ovos BH e SJ, respectivamente)(Figura 1A). A área dos granulomas variou conforme o período ($p<0,0001$), sendo que os maiores granulomas foram observados aos 15 dias e os menores um dia após a inoculação dos ovos (Figura 1B). Considerando a área dos granulomas em torno dos ovos BH e SJ (Grupos I e II), verificou-se que, à exceção do período de 15 dias, houve semelhança no tamanho da reação granulomatosa em torno dos ovos das duas linhagens (Figura 1C). Os ovos BH induziram reação granulomatosa significativamente maior em relação aos ovos SJ, aos 15 dias após a inoculação (Figura 1C). Analisando os resultados referentes à infecção prévia por *S. mansoni* BH (Grupos III e IV) e comparando-os aos dos Grupos I e II, notou-se que a infecção induziu granulomas maiores nos pulmões em torno dos ovos BH e SJ, sendo que a diferença

foi significativa aos 8 ($p < 0,0001$) e 34 dias ($p < 0,0001$) após a inoculação dos ovos (Figura 1C). Na comparação dos resultados obtidos nos camundongos infectados com *S. mansoni* BH e posteriormente inoculados com ovos BH (Grupo III) e com ovos SJ (Grupo IV) a área dos granulomas em torno dos ovos BH foi significativamente maior após 8 e 15 dias da inoculação (Figura 1C).

Número de granulomas no pulmão (Figura 2). Os dados obtidos resultaram de $n=60$ no Grupo I, $n=42$ no Grupo II, $n=54$ no Grupo III e $n=60$ no Grupo IV. Número significativamente maior ($p < 0,0001$) de granulomas foi observado no Grupo III (2,61 granulomas por área tissular de $0,98 \text{ mm}^2$) (animais infectados e inoculados com ovos BH). Os valores encontrados, considerando a mesma área tissular, nos grupos I, II e IV não diferiram significativamente entre si (1,96, 1,71 e 1,78 respectivamente, Figura 2A). Considerando o período após a inoculação dos ovos, maior número de granulomas foi observado aos 34 e 8 dias da inoculação e menor número um dia após o inóculo (Figura 2B). Na análise conjunta de todos os grupos, aos 15 dias após a inoculação não se observou diferença significativa no número de granulomas entre os quatros grupos (Figura 2C). Maior número de granulomas no pulmão nos animais que receberam infecção prévia foi constatado um dia após o inóculo (Grupos III e IV diferiram significativamente dos Grupos I e II). Aos 8 dias da inoculação um número significativamente menor de granulomas foi verificado no Grupo IV, enquanto nos Grupos II e III, a diferença não foi significativa. Aos 34 dias da inoculação dos ovos, o Grupo III apresentou número significativamente maior de granulomas, quando comparado com os demais Grupos.

Área dos granulomas no fígado (Figura 3). Os dados obtidos resultaram das medidas de um total de 126 granulomas no Grupo III e 162 no Grupo IV. A área dos granulomas no fígado foi obtida nos animais dos Grupos III e IV, infectados previamente com *S. mansoni* da linhagem BH. Não se observou diferença significativa na área dos granulomas hepáticos entre os dois grupos ($p=0,7412$) (Figura 2A). A área dos granulomas hepáticos foi significativamente maior ($p=0,0010$) por período, aos 15 ($41316 \mu\text{m}^2$) e 8 dias após a inoculação dos ovos ($37771 \mu\text{m}^2$) e menor aos 34 dias ($32353 \mu\text{m}^2$) (Figura 3B). Na comparação dos grupos considerando os períodos não se observou diferença significativa (Figura 3C).

Número de granulomas no fígado (Figura 4). Os dados obtidos resultaram de n=48 no Grupo III e n=60 no Grupo IV. Número significativamente maior de granulomas no fígado ($p<0,0001$) foi observado no Grupo III (5,41 por área tissular de $0,98 \text{ mm}^2$), quando comparado ao número de granulomas no Grupo IV (3,96 por área tissular de $0,98 \text{ mm}^2$) (Figura 4A). O maior número de granulomas ($p<0,0001$) foi verificado um e oito dias após a inoculação (Figura 4B). Nestes períodos, constatou-se diferença significativa entre os Grupos III e IV, sendo maior o número de granulomas no Grupo III (Figura 4C).

Tabela 1: Comparação do número de cercárias infectantes e de vermes machos e fêmeos recuperados em camundongos infectados com *S.mansoni* das linhagens BH e SJ nos Grupos III e IV.

Grupo	Cercárias Infectantes	Fêmeos	Machos	Vermes Totais	Teste Duncan*
IV	94,90				A
III	95,00				A
III		17,75			A
IV		9,10			B
III			18,87		A
IV			8,50		B
III				36,62	A
IV				17,60	B

*Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si ($\alpha= 0,05$).

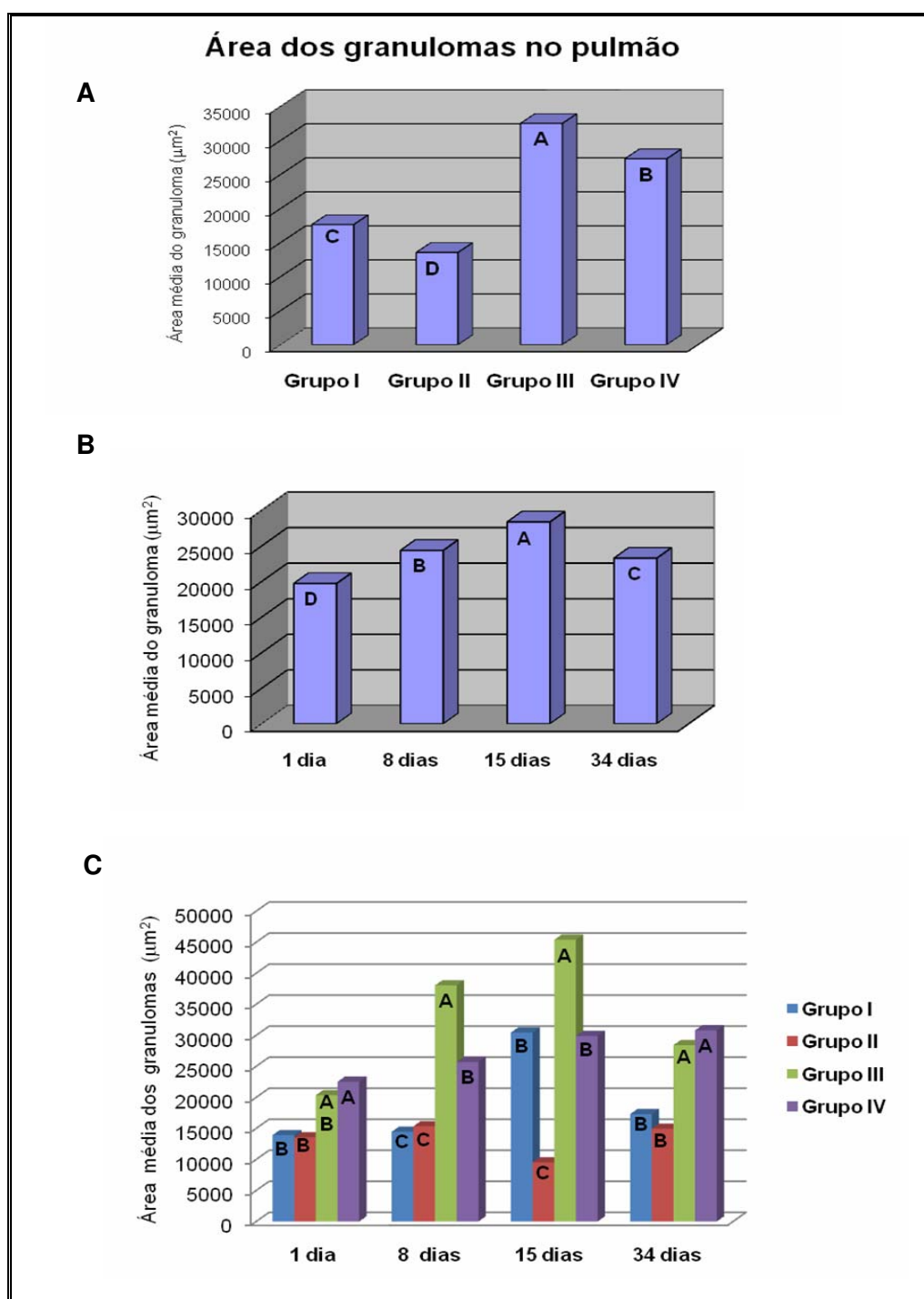


Figura 1: Área dos granulomas no pulmão de camundongos inoculados com ovos de *Schistosoma mansoni* das linhagens BH (Grupo I) e SJ (Grupo II) e em camundongos infectados previamente com *S. mansoni* da linhagem BH e inoculados na 8ª semana de infecção com ovos de *S. mansoni* da linhagem BH (Grupo III) e da linhagem SJ (Grupo IV). **A:** Comparação dos grupos I, II, III e IV. **B:** Comparação dos períodos. **C:** Comparação dos grupos considerando os períodos. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si ($\alpha=0,05$).

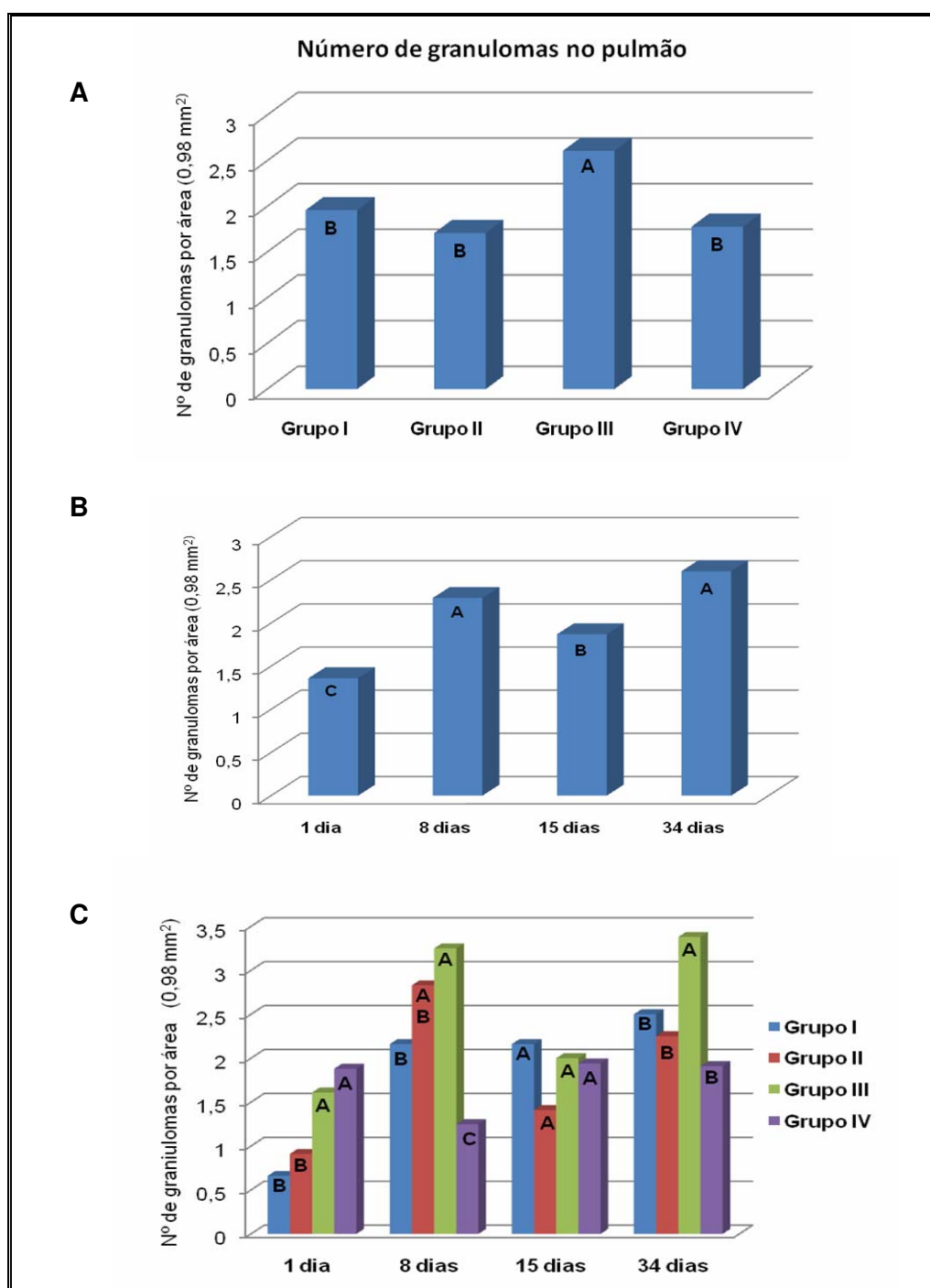


Figura 2: Número de granulomas no pulmão de camundongos inoculados com ovos de *Schistosoma mansoni* das linhagens BH (Grupo I) e SJ (Grupo II) e em camundongos infectados previamente com *S. mansoni* da linhagem BH e inoculados na 8ª semana de infecção com ovos de *S. mansoni* da linhagem BH (Grupo III) e da linhagem SJ (Grupo IV). **A:** Comparação dos grupos I, II, III e IV. **B:** Comparação dos períodos. **C:** Comparação dos grupos considerando os períodos. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si ($\alpha=0,05$).

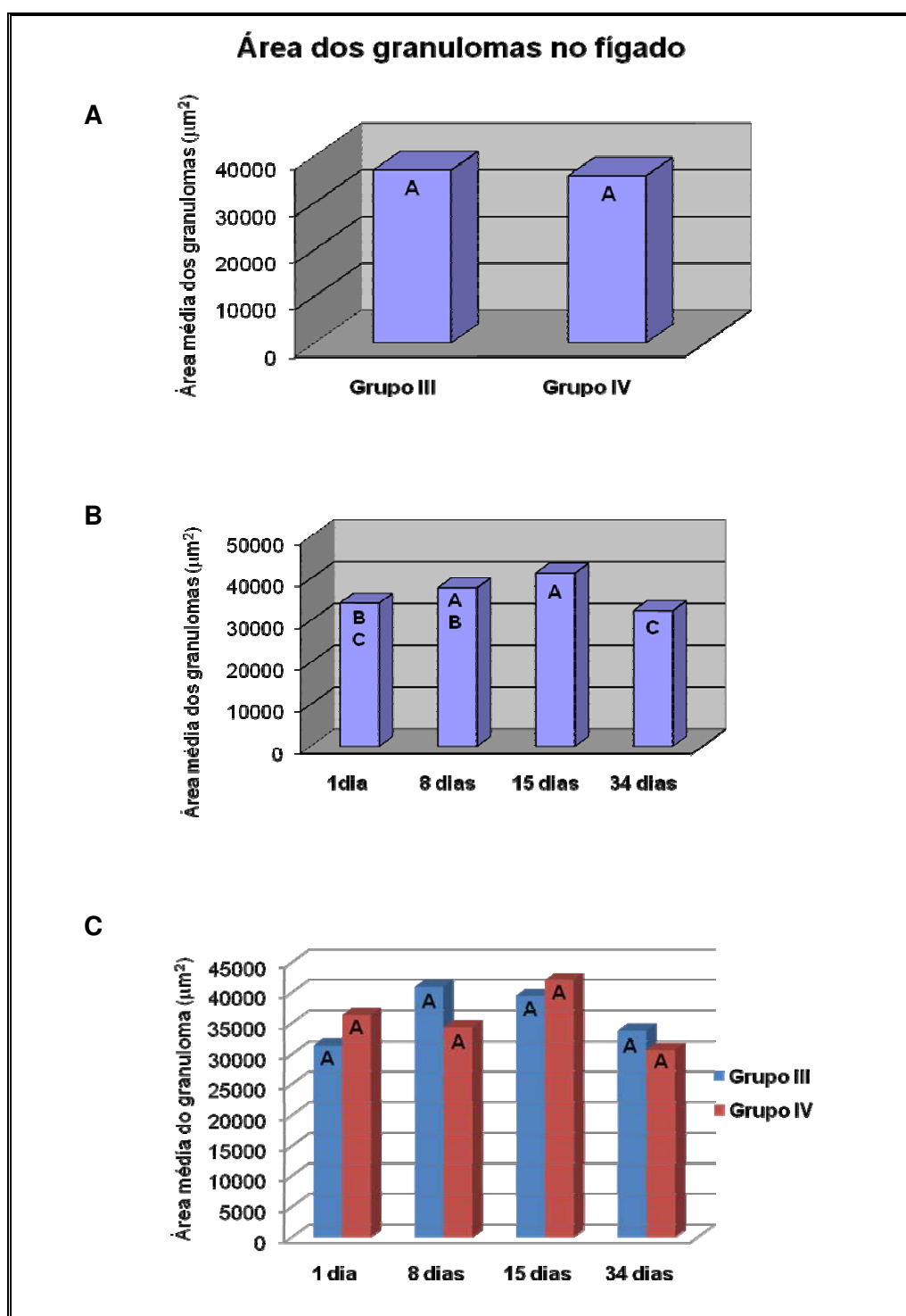


Figura 3: Área dos granulomas no fígado de camundongos infectados previamente com *Schistosoma mansoni* da linhagem BH e inoculados na 8ª semana de infecção com ovos de *S. mansoni* da linhagem BH (Grupo III) e da linhagem SJ (Grupo IV). **A:** Comparação dos grupos III e IV. **B:** Comparação dos períodos. **C:** Comparação dos grupos considerando os períodos. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si ($\alpha=0,05$).

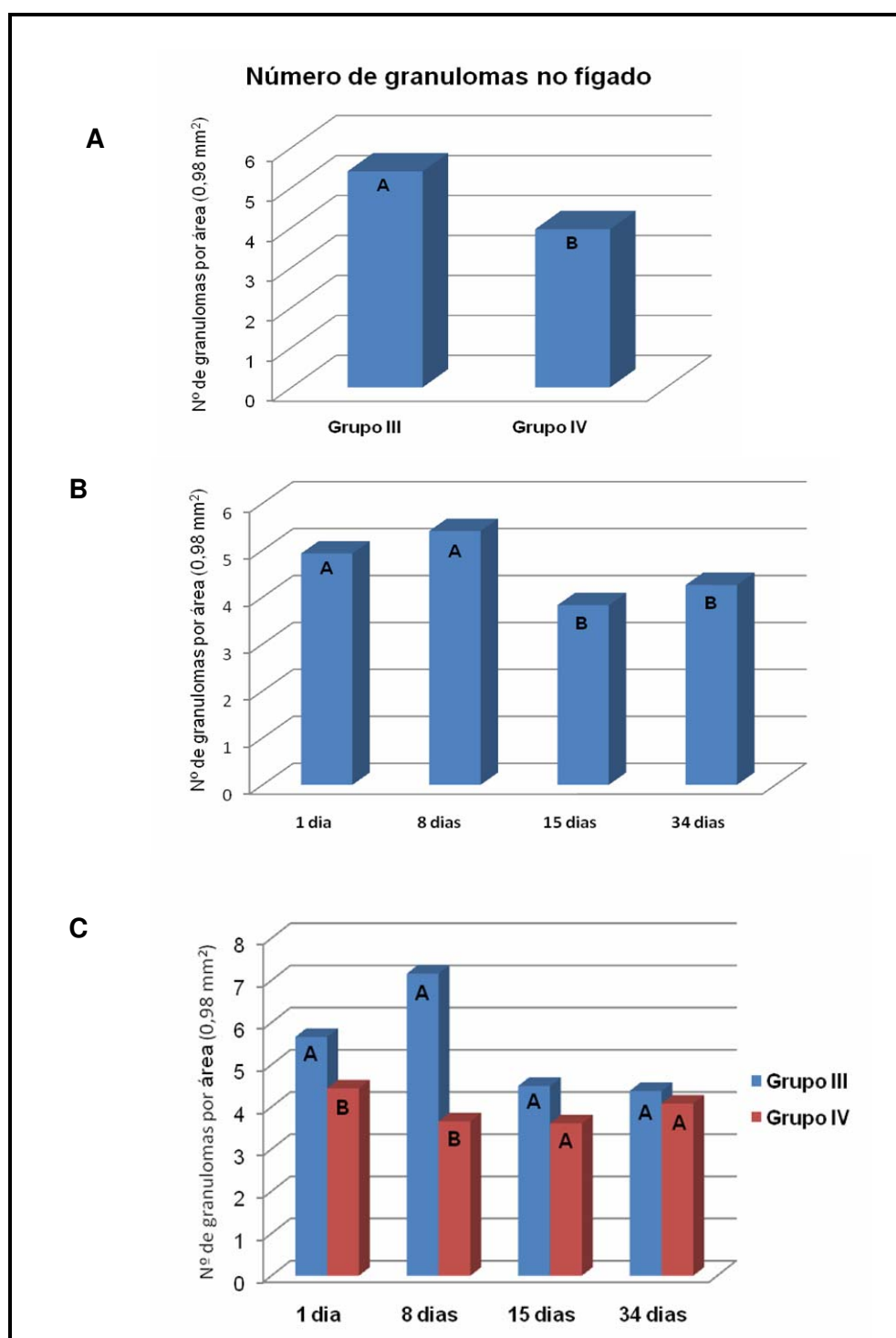


Figura 4: Número de granulomas no fígado de camundongos infectados previamente com *Schistosoma mansoni* da linhagem BH e inoculados na 8ª semana de infecção com ovos de *S. mansoni* da linhagem BH (Grupo III) e da linhagem SJ (Grupo IV). **A:** Comparação dos grupos III e IV. **B:** Comparação dos períodos. **C:** Comparação dos grupos considerando os períodos. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si ($\alpha=0,05$).

DISCUSSÃO

A reação granulomatosa induzida pelos ovos de *S. mansoni* pode ser entendida como um mecanismo protetor do organismo do hospedeiro ao mesmo tempo em que seu desencadeamento é responsável pela patologia. O grau de resposta por parte do organismo depende da capacidade estimulante do parasita e da integridade do sistema imunológico do hospedeiro.

Os granulomas são compostos, principalmente, por fibras colágenas, macrófagos, eosinófilos, linfócitos e plasmócitos em proporções diferentes, variando nos diferentes órgãos e em função da fase de sua evolução (PEARCE & MACDONALD, 2002) e é coordenado pela influência de uma rede de mediadores inflamatórios (WYNN *et al.*, 1995; CONLON, 2005).

As reações granulomatosas observadas apresentaram-se de acordo com as fases evolutivas descritas por RASO & BOGLIOLO (1970).

A reação granulomatosa induzida pelos ovos BH nos pulmões (Grupo I) foi semelhante à reação induzida pelos ovos SJ (Grupo II). Como o número de ovos inoculados foi semelhante nos dois grupos (I e II, Figura 2), o maior tamanho do ovo BH, verificado por vários autores (PARAENSE & CORRÊA, 1981; NEVES *et al.*, 1998) parece não influir no tamanho da reação granulomatosa no pulmão.

A infecção dos camundongos previamente com *S. mansoni* da linhagem BH, induziu reação granulomatosa maior no pulmão em torno dos ovos (BH e SJ, Grupos III e IV), o que indica certa identidade antigênica entre os ovos das duas linhagens (Figura 1A). Porém como as reações granulomatosas nos pulmões em torno dos ovos BH (Grupo III) foram significativamente maiores do que em torno dos ovos SJ, aos 8 e 15 dias após a inoculação, parecendo haver certa especificidade de resposta do hospedeiro em relação às referidas linhagens (Figura 1C).

Linhagens geográficas do *S. mansoni* apresentam diferenças significativas na patogenia atribuídas ao maior comprometimento dos órgãos em decorrência da maior amplitude de distribuição dos ovos do trematódeo (SAOUD, 1966), à quantidade de

ovos produzidos pelo parasita (MAGALHÃES & CARVALHO, 1976; BINA & PRATA, 2003) e ao grau de suscetibilidade do molusco vetor (SAOUD, 1966; ZANOTTI-MAGALHÃES *et al.*, 1993, 1995).

A presença de maior número de granulomas nos pulmões e no fígado verificado no Grupo III (infecção por *S. mansoni* e inoculação de ovos BH) pode ser atribuída ao maior número de vermes recuperados neste grupo (Tabela 1).

Os granulomas verificados no fígado dos animais dos Grupos III e IV foram provocados por ovos depositados pelos vermes BH, uma vez que o exame dos fígados dos animais dos Grupos I e II (apenas inoculados com ovos BH e SJ) não revelou a presença de granulomas. As reações granulomatosas observadas no fígado dos Grupos III e IV na fase inicial foi predominantemente exsudativa, grande, de limites irregulares, geralmente centradas por um foco de necrose. Aos 34 dias da inoculação dos ovos, as reações em torno dos ovos apareceram bem circunscritas, menores, predominantemente proliferativas e fibrosantes de acordo com RASO & BOGLIOLO (1970). Desta forma a constatação de granulomas hepáticos menores 90 dias após a infecção (34 dias após a inoculação) indica um início da imunomodulação do granuloma (Figura 3B), conforme sugerido por ANDRADE & WARREN (1964).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

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

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

COELHO, P. M. Z.; RASO, P.; MELLO, R. T.; TOPPA, N. H. Dimensões do granuloma hepático produzido por ovos de duas linhagens geográficas do *Schistosoma mansoni*, no camundongo. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, 84: 213-217, 1989.

CONLON, C. P. Schistosomiasis. **Medicine** **31**: 64-67, 2005.

HIGGINS-OPITZ, S. B. & DETTMAN, C. D. The infection characteristics of a South African isolate of *Schistosoma mansoni*: a comparison with a Puerto Rican isolate in a BALB/c mice and *Mastomys coucha*. **Parasitol. Res.**, **77**: 142-151, 1991.

KASTNER, M. R. Q.; KOHN, A.; TEIXEIRA, E. D.; PITANGA, L. C. Estudo morfológico do *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907, encontrado na espécie humana. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, **9**: 247-61, 1975.

MACHADO-SILVA, J. R.; GALVÃO, C.; PRESCAVE, O. A. F.; REY, L.; GOMES, D. C. Host induced morphological changes of *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907 male worms. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, **89**: 411-414, 1994.

MACHADO-SILVA, J. R.; GALVÃO, C.; OLIVEIRA, R. M. F.; PRESGRAVE, A. F.; GOMES D. C. *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907: Comparative morphological studies of some Brazilian strains. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, **37**: 441-447, 1995.

MACHADO-SILVA, J. R.; LANFRED, R. M.; GOMES, D. C. Morphological study of adult male worms of *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907 by scanning electron microscopy. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, **92**: 647-653, 1997.

MACHADO-SILVA, J. R.; PELAJO-MACHADO, M.; LENZI, H. L.; GOMES, D. C. Morphological study of adult male worms of *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907 by confocal laser scanning microscopy. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, **93**: 303-307, 1998.

MAGALHÃES, L. A. Técnica para avaliação da viabilidade de penetração de cercárias *Schistosoma mansoni* em *Mus musculus*. **Hospital**, **75**: 1663-1666, 1969.

MAGALHÃES, L. A. & CARVALHO, J. F. Verificação do número de machos e de fêmeas de *Schistosoma mansoni* capturados em camundongos infectados com duas cepas do helminto. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, **3**: 253-254, 1969.

MAGALHÃES, L. A. & CARVALHO, J. F. Estudo morfológico de *Schistosoma mansoni* pertencentes a linhagens de Belo Horizonte (MG) e de São José dos Campos (SP). **Rev. Saúde Pública**, **7**: 289-294, 1973.

MAGALHÃES, L. A.; ALCANTARA, F. G.; CARVALHO, J. F. Distribuição de lesões esquistossomóticas extra-hepáticas em camundongos infectados pelas linhagens BH e SJ de *Schistosoma mansoni*. **Rev. Saúde Pública**, **13**: 326-334, 1975.

MAGALHÃES, L. A. & CARVALHO, J. F. Sobre o comportamento de duas linhagens de *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907. Proposição para método de estudo quantitativo. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, **4**: 169-194, 1976.

NEVES, R. H.; PEREIRA, M. J. S.; OLIVEIRA, R. M. F.; GOMES, D. C, MACHADO-SILVA, J. R. *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907: morphometric differences between adult worms from sympatric rodents and human isolates. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, **93**: 309-312, 1998.

NEVES, R. H; OLIVEIRA, A. S; MACHADO-SILVA, COUTINHO, E; GOMES, D. C. Phenotypic characterization of *Schistosoma mansoni* adult worms recovered from undernourished mice: a morphometric study focusing on the reproductive system. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, **35**: 405-407, 2002.

PARAENSE, W. L. & CORRÊA, L. R. Variation in susceptibility of *Australorbis glabratus* to a strain of *Schistosoma mansoni*. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, **5**: 15-22, 1963.

PARAENSE, W. L. & CORRÊA, L. R. Differential susceptibility of *Biomphalaria tenagophila* populations to infection with a strain of *Schistosoma mansoni*. **J. Parasitol.**, **64**: 822-826, 1978.

PARAENSE, W. L. & CORRÊA, L. R. Observation on two biological races of *Schistosoma mansoni*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, **76**: 287-291, 1981.

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

RASO, P. BOGLIOLO, L. Patologia, p. 77-130. In: CUNHA, A S. **Esquistossomose mansoni**, Editora da Universidade de São Paulo, São Paulo, 1970.

ROLLINSON, D. & SOUTHGATE, V. R. The genus *Schistosoma*: a taxonomic appraisal. In: Rollinson D, Southgate V.R. **The Biology of Schistosomes from Genes to Latrines**. San Diego: Academic Press, p. 1-49, 1987.

SAOUD, M. F. A. The infectivity and pathogenicity of geographical strains of *Schistosoma mansoni*. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, **60**: 585-600, 1966.

SAS. Institute Inc 2006. SAS System for Windows versão 9.01. Cary, NC, USA.

WARREN, K. S. & DOMINGO, E. O. *Schistosoma manson*: Stage-specificity of granuloma formation around eggs after exposure to irradiated cercariae, unisexual infections, or dead worms. **Exp. Parasitol.**, **27**: 60-66, 1970.

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

WYNN, T. A.; CHEEVER, D.; JANKOVIC, D.; POINDEXTER, R. W.; CASPAR, P.; LEVIS, F. A.; SHER, A. An IL-12-based vaccination method for preventing fibrosis induced by schistosome infection. **Nature**, **376**: 594-596, 1995.

YOLLES, T. K.; MOORE, P. V.; DEGENSTI, D. L.; RIPSON, C. A. & MELENEY, H. E. A technique for the perfusion of laboratory animals for recovery of schistosomes. **J. Parasitol.**, **33**:419, 1947.

YOSHIOKA, L.; ZANOTTI-MAGALHÃES, E. M.; MAGALHÃES, L. A.; LINHARES, A. X. *Schistosoma mansoni*: estudo da patogenia da linhagem Santa Rosa (Campinas, SP, Brasil) em camundongos. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, **35**: 203-207, 2002.

ZANOTTI-MAGALHÃES, E. M.; MAGALHÃES, L. A.; CARVALHO, J. F. Relação entre a patogenicidade do *Schistosoma mansoni* em camundongos e susceptibilidade do molusco vetor. II. Número de ovos nas fezes e número e tamanho dos granulomas nas vísceras. **Rev. Saúde Pública**, **29**: 265-70, 1993.

ZANOTTI-MAGALHÃES, E. M.; MAGALHÃES, L.A.; CARVALHO, J. F. Relação entre a patogenicidade do *Schistosoma mansoni* em camundongos e susceptibilidade do molusco vetor. III. Mortalidade, peso corporal e das vísceras. **Rev. Saúde Pública**, **29**: 265-270, 1995.

ZANOTTI-MAGALHÃES, E. M.; MAGALHÃES, L. A.; CARVALHO, J. F. Relação entre a patogenicidade do *Schistosoma mansoni* em camundongos e susceptibilidade do molusco vetor. IV. Infeciosidade dos miracídeos. **Rev. Saúde Pública**, **31**: 488-494, 1997.

ZUIM, N. R. B. **Características Morfológicas e Biológicas do *Schistosoma mansoni* Oriundo de Populações de Moluscos Seleccionados Geneticamente.** 2003. 140 pp. Dissertação de Mestrado. Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas. 2003.

CAPÍTULO II

REAÇÕES GRANULOMATOSAS E PATOGENIA DE LINHAGENS DE *Schistosoma mansoni*

RESUMO: O trabalho teve por objetivo estudar a patogenicidade em camundongos infectados por *Schistosoma mansoni* da linhagem isolada na Lagoa Boa União, do Jardim São Domingos (Campinas, SP), denominada SD. Os resultados foram comparados com os dados obtidos nas linhagens SJ (Vale do Rio Paraíba do Sul, SP) e BH (Belo Horizonte, SP). O estudo foi motivado pela observação de casos clínicos de neuroesquistossomose em doentes autóctones atendidos no Centro de Saúde do bairro. Os camundongos, utilizados como hospedeiros definitivos foram infectados com cercárias provenientes de *Biomphalaria tenagophila* (linhagens SJ e SD) e de *B. glabrata* (linhagem BH). Os parâmetros observados foram: número de ovos de *S. mansoni* nas fezes dos animais; número de granulomas por área de tecido do fígado, baço, pulmões, pâncreas e cólon ascendente; mensuração dos granulomas hepáticos e intestinais; número de vermes adultos em veias do sistema porta-mesentérico; sobrevivência dos animais e mensuração dos ovos. Comparando-se as linhagens estudadas, a linhagem SD isolada em Campinas (SP) apresentou maior recuperação de vermes (48,62%) em relação ao número de cercárias penetrantes ($\bar{x}$ = 64,50) e grau de patogenicidade semelhante à linhagem BH, com grande número de granulomas na maioria das vísceras, maior tamanho dos granulomas e dos ovos (155,60 μ m x 64,63 μ m). Também foi elevado o número de ovos do trematódeo eliminado nas fezes.

Palavras-chave: *Schistosoma mansoni*, esquistossomose, patogenia, linhagem SD.

INTRODUÇÃO

Em 1963, PARAENSE & CORRÊA descreveram as linhagens BH e SJ de *Schistosoma mansoni*, baseados na verificação de que a *Biomphalaria glabrata* de Belo Horizonte (MG) se infectava com a linhagem local (BH), porém era resistente à infecção por *S. mansoni* isolado de São José dos Campos (linhagem SJ). Além disso, *Biomphalaria tenagophila* de São José dos Campos (SP) era susceptível ao *S. mansoni* simpátrico (linhagem SJ), porém refratária à infecção alopátrica (linhagem BH).

Estudos posteriores realizados nos camundongos (MAGALHÃES & CARVALHO, 1973; PARAENSE & CORRÊA, 1981) revelaram diferenças morfológicas entre os vermes destas duas linhagens e também diferenças quanto à patogenicidade (MAGALHÃES et al., 1975; MAGALHÃES & CARVALHO, 1976; LEMOS NETO et al., 1978). Os autores (MAGALHÃES & CARVALHO, 1976) concluíram que um número bem menor de parasitas da linhagem BH provoca níveis de nocividade equivalentes aos provocados por um maior número de vermes da linhagem SJ.

Enquanto que nas áreas endêmicas abrangidas pela linhagem BH é freqüente o encontro de indivíduos com hepatosplenomegalia descompensada, nas áreas onde o homem se infecta com a linhagem SJ, o quadro clínico descrito é o da forma intestinal, com baço levemente aumentado (SANTOS, 1967).

O primeiro caso autóctone de esquistossomose mansônica em Campinas constante nos registros da Secretaria de Saúde do Estado de São Paulo é de 1959, proveniente de um foco do córrego Piçarrão (PIZA & RAMOS, 1960). Desde então, novos casos e focos foram registrados em Campinas e região. A maioria deles, no entanto, mostra-se assintomática.

Casos autóctones de esquistossomose mansônica no Jardim São Domingos (Campinas/SP) 23°02'44"S 47°06'12"W, têm sido relatados desde 1998. Recentemente, de exemplares de *B. tenagophila* coletados na Lagoa Boa União, localizada no mesmo bairro, foi possível o isolamento da linhagem do trematódeo em laboratório. FREITAS & OLIVEIRA (2002) e FREITAS et al. (2002) verificaram sinais de hipertensão portal e

neuroesquistossomose medular em pacientes com esquistossomose autóctone, atendidos no Jardim São Domingos. Esses fatos nos induziram a desenvolver pesquisa com a finalidade de realizar um estudo comparativo da patogenicidade do *S. mansoni* da linhagem isolada no Jardim São Domingos (Campinas, SP) e das linhagens BH (Belo Horizonte, MG) e SJ (Vale do Rio Paraíba do Sul, SP).

MATERIAL E MÉTODOS

Grupos de camundongos Swiss, SPF (Specific Pathogen Free), fêmeos, oriundos do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica da UNICAMP foram expostos à infecção por cercárias de *S. mansoni* das linhagens BH, SJ e SD. Foram constituídos três grupos de camundongos:

grupo 1: 15 camundongos infectados com cercárias de *S. mansoni* da linhagem BH; grupo 2: 10 camundongos infectados com cercárias de *S. mansoni* da linhagem SJ; e grupo 3 : 10 camundongos infectados com cercárias de *S. mansoni* da linhagem SD.

A partir da 3ª semana de infecção, semanalmente foram colhidas fezes dos roedores para verificação da eliminação de ovos de *S. mansoni*. Na 8ª semana de infecção, os camundongos sobreviventes foram mortos para recuperação dos vermes.

Os parâmetros verificados foram: número de cercárias penetrantes; número de ovos eliminados nas fezes; número de esquistossomos no sistema porta-mesentérico por ocasião do sacrifício dos roedores; número de granulomas no fígado, baço, intestino (cólon ascendente), pâncreas e pulmão, área dos granulomas observados no fígado e intestino e tamanho dos ovos de *S. mansoni*.

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Estadual de Campinas (Protocolo nº 642-1).

Infecção dos camundongos

Para a infecção dos camundongos foram obtidas cercárias provenientes de planorbídeos nascidos em laboratório descendentes de *B. tenagophila* provenientes da Lagoa Boa União, do Jardim São Domingos, em Campinas, expostos a miracídios da

linhagem São Domingos, de *B. glabrata* provenientes de Belo Horizonte (MG), expostos a miracídios da linhagem BH e de *B. tenagophila* provenientes do Vale do Rio Paraíba do Sul, expostos a miracídios da linhagem SJ.

Os camundongos foram expostos individualmente, durante duas horas, às cercárias provenientes dos moluscos infectados pelas diferentes linhagens. A infecção foi percutânea pela exposição das caudas dos roedores a 70 cercárias, de acordo com a técnica de MAGALHÃES (1969).

Verificação do número de ovos de *S. mansoni* eliminados nas fezes

O número de ovos eliminados nas fezes dos camundongos infectados foi verificado a partir da 3ª semana de infecção dos animais, através do método de Kato-Katz (KOMYIA & KOBAYASHI, 1966; KATZ *et al.*, 1972). Foram preparadas 3 lâminas para cada grupo de cinco animais, de modo que o resultado final corresponde a uma média aritmética dessas lâminas.

Obtenção e contagem dos vermes

Os animais sobreviventes ao final da 8ª semana foram sacrificados por deslocamento cervical. A coleta dos vermes foi feita por meio de perfusão do sistema porta-mesentérico de acordo com a técnica de YOLLES *et al.* (1947). Após esse procedimento, o número de vermes machos e fêmeos, tanto isolados como em casais, foram contados.

Obtenção, contagem e medição dos granulomas das vísceras

Após perfusão, foram retirados fragmentos do fígado, baço, cólon ascendente, pulmão e pâncreas dos animais sacrificados para a contagem e medição dos granulomas. Os fragmentos foram fixados em Bouin aquoso e cortes histológicos de 5 µm de espessura foram corados com tricrômico de Masson (ZANOTTI-MAGALHÃES *et al.*, 1993). Em seguida, foram analisados sob microscópio óptico a fim de se calcular o número de granulomas por área tissular (1,25 mm²), a qual foi determinada através da técnica de MAGALHÃES *et al.* (1975), e o tamanho das reações granulomatosas.

Somente foram medidos os granulomas que continham em seu centro um ovo de *S. mansoni*. As medições foram realizadas utilizando o programa "Image Pro Lite", version 4,0 para Windows 95/NT/98.

Obtenção e medição dos ovos de *S. mansoni*

Ovos de *S. mansoni* das três linhagens em estudo, foram obtidos das fezes de camundongos infectados. Tomaram-se as medidas do comprimento, da largura e do comprimento do espículo dos ovos, observados em microscopia óptica e utilizando o programa "Image Pro Lite", versão 4.0, para Windows 95/NT/98. Os dados foram analisados estatisticamente considerando o comprimento, a largura, o tamanho do espículo, a proporção entre o comprimento e a largura, a proporção entre o comprimento e o espículo e a proporção entre a largura e o espículo. Para a análise utilizou-se o programa SAS (Statistical Analysis System, SAS, Inc. 2006), através do PROC GLM (General Linear Procedure).

RESULTADOS

Todos os animais infectados pelas três linhagens de *S. mansoni* sobreviveram durante as oito semanas do experimento.

As Tabelas 1 e 2 mostram a média dos números de cercárias penetrantes, de vermes machos, de vermes fêmeos, de vermes acasalados, de vermes totais e da porcentagem de recuperação de vermes em relação ao número de cercárias penetrantes em camundongos infectados com as linhagens BH, SJ e SD de *S. mansoni*.

A análise estatística mostrou que a capacidade de penetração das cercárias foi significativamente diferente ($p=0,0241$) entre as linhagens, observando-se que cercárias SJ apresentaram maior capacidade de penetração do que cercárias BH (Tabela 1).

O número de casais e o número de vermes totais foi significativamente diferente entre as linhagens SD e BH ($p=0,0020$ e $p=0,0036$, respectivamente). A linhagem SD apresentou número significativamente maior de vermes (acasalados e totais) do que a linhagem BH (Tabela 2).

A percentagem de recuperação de vermes em relação ao número de cercárias penetrantes foi significativamente diferente entre as linhagens ($p=0,0065$). De acordo com a tabela 2, verificamos que a percentagem de recuperação de vermes foi maior na linhagem SD. A análise estatística (Tabela 1) mostrou ainda que os números de vermes machos e de vermes fêmeos recuperados dos camundongos não foram significativamente diferentes entre as três linhagens ($p=0,7389$ e $p=0,4560$, respectivamente).

A Tabela 3 mostra o número de reações granulomatosas por área tissular ($1,25 \text{ mm}^2$) encontradas nas vísceras dos camundongos infectados com as linhagens BH, SJ e SD de *S. mansoni*.

O número médio de reações granulomatosas encontradas no fígado diferiu significativamente ($p=0,0032$) sendo maior nos camundongos infectados com as linhagens BH e SD do que naqueles infectados com a linhagem SJ (Tabela 3).

Com relação ao número médio de granulomas esplênicos, observamos diferença significativa entre as linhagens ($p=0,0390$) constatando-se maior número para a linhagem SD do que para as linhagens BH e SJ. A diferença entre os valores encontrados para as linhagens BH e SJ não foi significativa (Tabela 3).

A análise dos cortes feitos para o pâncreas mostrou um número médio também maior de granulomas esquistossomóticos na linhagem SD (Tabela 3) do que nas demais linhagens ($p=0,0189$).

A análise estatística do número de granulomas obtidos do intestino (cólon ascendente) e pulmão não indicaram diferença significativa entre as três linhagens ($p=0,2134$ e $p=0,2473$, respectivamente) ainda que no intestino tenha se observado um número médio maior de granulomas na linhagem SD e que no pulmão os valores obtidos para a linhagem SD apenas não tenha superado àqueles notados na linhagem BH (Tabela 3).

Em geral, a análise dos cortes histológicos feitos para as três linhagens mostrou, como esperado, o fígado como a víscera com maior número de reações granulomatosas em torno de ovos de *S. mansoni*, seguido, também em todas as linhagens, pelo intestino. Na linhagem SD, esse número foi gradualmente decrescente quando se analisaram as lâminas de pâncreas, baço e pulmão. A linhagem BH também

apresentou o pâncreas como a terceira víscera com maior número de granulomas, mas, diferentemente da SD, seguiram-se pulmão e baço. A linhagem SJ apresentou valores iguais para os números de granulomas encontrados no pâncreas e no baço. Nenhum granuloma foi encontrado no pulmão dos animais infectados pela linhagem SJ.

Os valores obtidos em relação ao tamanho médio das reações granulomatosas e ao número de ovos por grama de fezes das três linhagens estão nas Tabelas 4 e 5.

Podemos observar pelos dados da Tabela 4 relativos ao tamanho dos granulomas que, para o fígado, os maiores valores foram verificados na linhagem SD, seguidos, em ordem decrescente, das linhagens BH e SJ.

Similarmente, também os granulomas intestinais apresentaram maiores tamanhos nos animais infectados com as linhagens SD e BH, seguidos daqueles infectados pela linhagem SJ (Tabela 4).

Os granulomas encontrados no pâncreas e no pulmão não foram comparados estatisticamente, pois não foram visualizados no pulmão dos animais infectados com a linhagem SJ e o único encontrado em um dos cortes de pâncreas apresentava mais de um ovo em seu centro.

Podemos observar que a linhagem SD, embora possua a *B. tenagophila* como hospedeira intermediária, apresenta eliminação de ovos bastante parecida com a da linhagem BH, considerando os dados das 7ª e 8ª semanas de infecção (Tabela 5). É importante ressaltar porém, que o número de vermes totais e de casais recuperados no sistema porta-mesentérico dos camundongos infectados com a linhagem SD foi, em média, maior que o daqueles obtidos nos roedores infectados com a linhagem BH (Tabela 2).

Como os granulomas foram maiores na linhagem SD, resolvemos medir o tamanho dos ovos de *S. mansoni* das três linhagens em estudo. Na Tabela 6 estão apresentados os dados relativos às medidas. O comprimento e a largura dos ovos da linhagem SD (Tabela 6) foram significativamente maiores ($p < 0,0001$), sendo que os ovos das linhagens SJ e BH não diferiram em relação ao comprimento. A menor largura dos ovos foi observada na linhagem BH.

Em relação ao tamanho do espículo (Tabela 6) não foi observada diferença significativa entre as linhagens ($p = 0,9383$), porém alguns ovos da linhagem SD

apresentavam espículo com a extremidade recurvada conforme pode ser visto na Figura 1. O estudo das proporções (Tabela 7) mostrou que as linhagens diferiram somente na proporção entre a largura e o comprimento do espículo ($p=0,0855$), sendo maior na linhagem SD.

Tabela 1: Comparação do número de cercárias penetrantes e número de vermes machos e de vermes fêmeos em camundongos infectados com *S. mansoni* das linhagens BH, SJ e SD.

Linhagem de <i>S. mansoni</i>	Número de camundongos	Cercárias penetrantes	Vermes Machos	Vermes Fêmeos	Teste de Duncan*
SJ	10	66,90			A
SD	10	64,50			A B
BH	15	62,67			B
BH	15		1,73		A
SD	10		1,30		A
SJ	10		0,90		A
SJ	10			0,30	A
BH	15			0,13	A
SD	10			0,10	A

* Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si ($\alpha=0,05$).

Tabela 2: Comparação do número de vermes acasalados, de vermes totais e percentagem de recuperação de vermes em relação ao número de cercárias penetrantes em camundongos infectados com *S. mansoni* das linhagens BH, SJ e SD.

Linhagem de <i>S. mansoni</i>	Número de camundongos	Vermes acasalados	Vermes Totais	Recuperação de vermes (%)	Teste de Duncan*
SD	10	14,80			A
SJ	10	11,60			A B
BH	15	7,87			B
SD	10		31,00		A
SJ	10		24,40		A B
BH	15		17,60		B
SD	10			48,62	A
SJ	10			36,67	A B
BH	15			28,47	B

* Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si ($\alpha=0,05$).

Tabela 3 : Comparação do número de granulomas por área de tecido (área tissular de 1,25 mm²) em camundongos infectados com *S. mansoni* das linhagens BH, SJ e SD.

Linhagem do <i>S. mansoni</i>	Número de camundongos	Número de granulomas (média) /1,25 mm ²					Teste de Duncan*
		Fígado	Baço	Pâncreas	Intestino	Pulmão	
BH	15	15,27					A
SD	10	13,80					A
SJ	10	10,60					B
SD	10		1,00				A
BH	15		0,13				B
SJ	10		0,10				B
SD	10			3,40			A
BH	15			2,00			A B
SJ	10			0,10			B
SD	10				4,50		A
BH	15				3,87		A
SJ	10				2,50		A
BH	15					1,07	A
SD	10					0,40	A
SJ	10					0,00	A

* Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si ($\alpha=0,05$).

Tabela 4: Comparação da área dos granulomas hepáticos e intestinais em camundongos infectados com as linhagens BH, SJ e SD de *S. mansoni*.

Linhagem do <i>S. mansoni</i>	Número de granulomas	Área do granuloma média (μm^2)		Teste de Duncan*
		Hepático	Intestinal	
SD	206	132194		A
BH	403	111586		B
SJ	137	109472		B
SD	32		78313	A
BH	41		72340	A
SJ	16		38667	B

* Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si ($\alpha=0,05$).

Tabela 5: Comparação do número (log) de ovos de *S. mansoni* das linhagens BH, SJ e SD por grama de fezes.

Linhagem	Número de camundongos	Número de ovos(média)	Teste de Duncan*	Semana
SJ	10	1.417	A	3 ^a
BH	15	0.944	A	
SD	10	0.000	A	
SJ	10	3.186	A	4 ^a
BH	15	0.944	A	
SD	10	0.000	A	
SJ	10	4.342	A	5 ^a
SD	10	3.967	A	
BH	15	2.409	B	
SD	10	4.309	A	6 ^a
SJ	10	3.804	A	
BH	15	3.275	A	
SD	10	6.787	A	7 ^a
BH	15	6.579	A	
SJ	10	4.524	B	
SD	10	7.248	A	8 ^a
BH	15	6.746	A	
SJ	10	5.563	B	

* Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si ($\alpha=0,05$).

Tabela 6: Comparação do tamanho dos ovos de *S. mansoni* das linhagens BH, SJ e SD.

Linhagem do <i>S. mansoni</i>	Número de ovos	Ovos (média) μm			Teste de Duncan*
		Comprimento	Largura	Espículo	
SD	23	155,60			A
SJ	31	141,11			B
BH	31	139,34			B
SD	23		64,63		A
SJ	31		59,37		B
BH	31		56,89		C
BH	31			21,22	A
SJ	31			21,09	A
SD	23			20,85	A

* Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si ($\alpha=0,05$).

Tabela 7: Proporção das medidas dos ovos de *S. mansoni* das linhagens BH, SJ e SD.

Linhagem do <i>S.</i> <i>mansoni</i>	Número de ovos	Ovos (média)			Teste de Duncan*
		Comprimento/Largura	Comprimento/Espículo	Largura/Espículo	
SD	23	2,45			A
BH	31	2,41			A
SJ	31	2,38			A
SD	23		7,63		A
BH	31		6,93		A
SJ	31		6,87		A
SD	23			3,16	A
SJ	31			2,89	A B
BH	31			2,80	B

* Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si ($\alpha=0,05$).



Figura 1: Ovo de *S. mansoni* da linhagem SD observado nas fezes dos camundongos.

DISCUSSÃO

Linhagens geográficas do *S. mansoni* apresentam diferenças significativas na patogenia atribuídas ao maior comprometimento dos órgãos em decorrência da maior amplitude de distribuição dos ovos do trematódeo (SAOUD, 1966), à quantidade de ovos produzidos pelo parasita (MAGALHÃES & CARVALHO, 1976; BINA & PRATA, 2003) e ao grau de suscetibilidade do molusco vetor (SAOUD, 1966; ZANOTTI-MAGALHÃES *et al.* 1993; 1995).

Em estudo anterior, YOSHIOKA *et al.* (2002) constataram que uma linhagem de *S. mansoni* isolada no município de Campinas, SP, Brasil, denominada linhagem Santa Rosa (SR) era menos patogênica quando comparada às linhagens BH e SJ, tendo em vista o menor número de vermes, o menor número de ovos eliminados nas fezes, o menor número de granulomas e o menor diâmetro da reação granulomatosa em torno do ovo.

BINA & PRATA (2003) verificaram uma associação entre o desenvolvimento da forma hepatoplênica e a quantidade de ovos de *S. mansoni* eliminados nas fezes dos pacientes.

Os resultados apresentados aqui revelaram a maior patogenicidade apresentada pela linhagem São Domingos (SD) isolada do bairro do mesmo nome, no município de Campinas (SP) com níveis semelhantes à patogenicidade da linhagem BH, se considerado o número de reações granulomatosas na maioria das vísceras e o tamanho das reações granulomatosas (Tabela 3 e 4). O maior comprometimento dos tecidos e dos órgãos pode ser atribuído ao elevado número de ovos eliminados pelos vermes e também pelo maior tamanho dos ovos da linhagem SD. Além de mais numerosos, os ovos da linhagem SD apresentaram maiores dimensões (tabela 6) e aspecto morfológico distinto conforme atesta a Figura 1.

Do ponto de vista epidemiológico estes resultados são relevantes tendo em vista a maior recuperação de vermes em relação ao número de cercárias penetrantes e ao elevado número de ovos eliminados nas fezes dos animais infectados com a linhagem SD.

Os dados obtidos no estudo da linhagem SD de *S. mansoni* indicam também ser esta linhagem a mais patogênica das linhagens já descritas, que tem *B. tenagophila* como hospedeira do trematódeo (como a linhagem SJ). As observações constatadas experimentalmente em animais de laboratório confirmaram as observações clínicas obtidas do exame dos enfermos atendidos no Hospital de Clínicas da UNICAMP, oriundos do Jardim São Domingos quando foram constatados sinais de hipertensão portal e neuroesquistossomose medular (FREITAS & OLIVEIRA, 2002; FREITAS et al., 2002). A neuroesquistossomose é considerada uma das formas mais graves da infecção pelo *Schistosoma mansoni* e as evidências sugerem que os ovos do parasita sejam os responsáveis por esta manifestação clínica (FERRARI, 2004).

Não desconsiderando o papel imunorregulador dos linfócitos Th1/Th2, dos antígenos do ovo do trematódeo SEA e SM-p40, das particularidades genéticas do hospedeiro (STADECKER, 1999) e da carga parasitária na manifestação clínica da esquistossomose no camundongo e no homem, devem ser observadas outras características biológicas do esquistossomo no desenvolvimento da patogenia.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

FERRARI, T. C. A. Involvement of central nervous system in schistosomiasis. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, **99**: 59-62, 2004.

FREITAS, A. R. R.; OLIVEIRA, A. C. P. Schistosomal myelopathy and the relevance of Schistosomiasis in low prevalence area. *In*: VIII International Symposium on Schistosomiasis, 2002, Recife-PE. **Abstracts of 8^o International Symposium on Schistosomiasis**, 2002.

FREITAS, A. R. R.; YOKODA, J. C. R.; SANTOS, A. M.; REIS, R. D.; NEUMANN, M. M. A. G. L. ; YAMANAKA, A. Approach of hepatic alterations in schistosomiasis on area of low prevalence by ultrasonography using who standardization. *In*: VIII International

Symposium on Schistosomiasis, 2002, Recife-PE. **Abstracts of 8o International Symposium on Schistosomiasis**, 2002.

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

KOMYIA, Y & KOBAYASHI, A. Evolution of Kato's thick smear technic with a cellophane cover for helminth eggs in feces. **Jap. J. Med. Sci. Biol.**, **19**: 59, 1966.

LEMO NETO, R. C.; MAGALHÃES, L. A.; PIEDRABUENA, A. E. Alguns aspectos referentes ao estudo de linhagens de *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907, provenientes dos Estados de Minas Gerais e de São Paulo, Brasil. **Rev. Saúde Pública**, **12**: 277-290, 1978.

MAGALHÃES, L. A. Técnica para avaliação da viabilidade de penetração de cercárias *Schistosoma mansoni* em *Mus musculus*. **Hospital**, **75**:1663-1666, 1969.

MAGALHÃES, L. A.; CARVALHO, J. F. Estudo morfológico de *Schistosoma mansoni* pertencentes às linhagens de Belo Horizonte (BH) e de São José dos Campos (SP). **Rev. Saúde Pública**, **7**: 289-294, 1973.

MAGALHÃES, L. A.; ALCÂNTARA, F. G.; CARVALHO, J. F. Distribuição de lesões esquistossomóticas extra-hepáticas em camundongos infectados pelas linhagens BH e SJ de *Schistosoma mansoni*. **Rev. Saúde Pública**, **13**: 326-334, 1975.

MAGALHÃES, L. A.; CARVALHO, J. F. Sobre o comportamento de duas linhagens de *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907. Proposição para método de estudo quantitativo. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, **10**:169-194, 1976.

PARAENSE, W. L.; CORRÊA, L. R. Sobre a ocorrência de duas raças biológicas do *Schistosoma mansoni* no Brasil. **Cien. Cult.**, **15**: 245-246, 1963.

PARAENSE, W. L.; CORRÊA, L. R. Observation on two biological races of *Schistosoma mansoni*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, **76**: 287-291, 1981.

PIZA, J. T.; RAMOS, A. S. Os focos autóctones da esquistossomose no Estado de São Paulo. **Arq. Hig. Saúde Públ.**, **25**: 261-271, 1960.

SANTOS, N. R. **Esquistossomose mansônica autóctone no Vale do Médio Paraíba, estado de São Paulo, Brasil: contribuição para o estudo da zona endêmica.** Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, 1967.

SAOUD, M. F. A. The infectivity and pathogenicity of geographical strains of *Schistosoma mansoni*. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, **60**:585-600, 1966.

SAS. Institute Inc. 2006. SAS System for Windows versão 9.01. Cary, NC, USA.

STADECKER, M. The development of granulomas in schistosomiasis: genetic backgrounds, regulatory pathways, and specific egg antigen responses that influence the magnitude of disease. **Microbes infec.**, **1**: 05-510, 1999.

YOLLES, T. K.; MOORE, D. U.; DE GINSTI, D. L.; RIPSON, C. A.; MELENEY, H. E. A technique for the perfusion of laboratory animals for the recovery of Schistosomes. **J. Parasitol.**, **33**: 419-426, 1947.

YOSHIOKA, L.; ZANOTTI-MAGALHÃES, E. M.; MAGALHÃES, L. A.; LINHARES, A. X. *Schistosoma mansoni*: estudo da patogenia da linhagem Santa Rosa (Campinas, SP, Brasil) em camundongos. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, **35**: 203-207, 2002.

ZANOTTI-MAGALHÃES, E. M.; MAGALHÃES, L. A. & CARVALHO, J. F. Relação entre a patogenicidade do *Schistosoma mansoni* em camundongos e a susceptibilidade do molusco vetor. II Número de ovos nas fezes e número e tamanho dos granulomas nas vísceras. **Rev. Saúde Pública**, **27**: 412-420, 1993.

ZANOTTI-MAGALHÃES, E. M.; MAGALHÃES, L. A. & CARVALHO, J. F. Relação entre a patogenicidade do *Schistosoma mansoni* em camundongos e a susceptibilidade do molusco vetor. III. Mortalidade, peso corporal e das vísceras. **Rev. Saúde Pública**, **29**: 265-270, 1995.

6. CONCLUSÕES

CAPÍTULO I:

⇒ ESTUDO DAS REAÇÕES GRANULOMATOSAS EM TORNO DOS OVOS DE *Schistosoma mansoni* das LINHAGENS BH E SJ.

- O tamanho da reação granulomatosa induzida pelos ovos BH nos pulmões (Grupo I) foi semelhante à reação induzida pelos ovos SJ (Grupo II).
- Constatou-se que no grupo de camundongos infectados previamente por cercárias BH e inoculados posteriormente com ovos da linhagem BH (grupo III) as reações granulomatosas no pulmão foram marcadamente de maior tamanho.
- O maior número de granulomas nos pulmões e no fígado verificado nos animais infectados por *S. mansoni* e inoculados com ovos BH pode ser atribuído ao maior número de vermes recuperados neste grupo.
- A reação granulomatosa em torno dos ovos de *S. mansoni* das linhagens BH e SJ mostrou ser linhagem específica, indicando haver identidade parcial entre os ovos das duas linhagens.

CAPÍTULO II:

⇒ REAÇÕES GRANULOMATOSAS E PATOGENIA DE LINHAGENS DE *Schistosoma mansoni*.

- A linhagem São Domingos (SD) apresentou patogenicidade semelhante à linhagem BH, considerando-se o número e o tamanho das reações granulomatosas na maioria das vísceras.
- O maior comprometimento dos tecidos e dos órgãos provocados pela linhagem SD pode ser atribuído ao elevado número de ovos eliminados pelos vermes.

- Os ovos da linhagem SD apresentaram aspecto morfológico distinto, com um espículo lateral recurvado. Além disso, os ovos desta linhagem apresentaram maiores dimensões.
- A linhagem SD apresentou maior recuperação de vermes e elevado número de ovos eliminados nas fezes na 7ª e 8ª semana de infecção quando comparada com as linhagens BH e SJ.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

ANSWAAD, S. Liver punction biopsy in Egyptian infants and children. **J. Roy. Egypt. Med. Ass.**, **32**: 146-157, 1949.

BENNETT, J. L. Schistosomiasis: fibrosis and esophageal varices. **Parasitol. Today**, **13**: 39, 1997.

BLOCH, E. H.; ABDEL WAHAB, M. F.; WARREN, K. S. In vivo microscopic observations of the pathogenesis and pathophysiology of hepatosplenic schistosomiasis in the mouse liver. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, **21**: 546-557, 1972.

BOROS, D. R.; PELLEY, R. P.; WARREN, K. S. Spontaneous modulation of granulomatous hypersensitivity in schistosomiasis mansoni. **J. Immunol.**, **114**: 1437-1441, 1975.

BRITO, T. D.; HOSHINO-SHIMIZU, S.; SILVA, L. C.; KANAMURA, H.; COSTA, C. M.; PINTO, P. S. Immunopathology of experimental schistosome (*S. mansoni*) egg granulomas in mice possible defense mechanisms mediated by local immune complexes. **J. Pathol.**, **140**:17-28, 1983.

BRUNET, L. R.; DUNNE, D. W.; PEARCE, E. J. Cytokine interaction and immune responses during *Schistosoma mansoni* infection. **Parasitol. Today**, **14**: 422-427, 1998.

BUCHANAN, R. D.; FINE, D. P.; COLLEY, D. G. *Schistosoma mansoni* infection in mice depleted in mice of thymus-dependent lymphocytes. II. Pathology and altered pathogenesis. **Am. J. Pathol.**, **71**: 207-217, 1973.

CHEEVER, A. W. A comparative study of *Schistosoma mansoni* infections in mice, gerbils, multimammate rats and hamsters. I. The relation of portal hypertension on size of hepatic granulomas. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, **14**: 211-226, 1965.

CHEEVER, A. W.; MOSIMANN, J. E.; DEB, S. Natural history of *Schistosoma mansoni* infections in mice: egg production, egg passage in the feces, and contribution of host and parasite death to changes in worm numbers. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, **50**: 269-280, 1994.

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

CHENSUE, S. W. & BOROS, D. L. Modulation of granulomatous hypersensitivity. I.Characterization of T lymphocytes involved in the adoptive suppression of granuloma formation in *Schistosoma mansoni*- infected mice. **J. Immunol.**, **123**: 1409-1414, 1979.

COELHO, P. M. Z.; RASO, P.; MELLO, R. T.; TOPPA, N. H. Dimensões do granuloma hepático produzido por ovos de duas linhagens geográficas do *Schistosoma mansoni*, no camundongo. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, **84**: 213-217, 1989

COKER, C. M. & LICHTENBERG, F. A revised method for isolation of *Schistosoma mansoni* eggs for biological experimentation. **Soc. Exp. Biol. Med.**, **92**: 780-782, 1956.

CONLON, C. P. Schistosomiasis. **Medicine** **31**: 64-67, 2005.

DIAS, L. C. S.; GLASSER, C. M.; ETZEL, A.; KAWAZOE, U.; HOSHINO-SHIMIZU, S.; KANAMURA, H. Y.; CORDEIRO, J. A.; MARÇAL, J. R. O.; CARVALHO, J. F.; GONÇALVES, J. R. F.; PATUCCI, R. The epidemiology and control of schistosomiasis mansoni where *Biomphalaria tenagophila* is the snail host. **Rev. Saúde Pública** **22**: 462-463, 1988.

DOENHOFF, M. J.; HASSOUNAH, O.; MURARE, H.; BAIN, J.; LUCAS, S. The schistosome egg granuloma: immunopathology in the cause of host protection or parasite survival? **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, **80**: 503-514, 1986.

DOENHOFF, M. J. A role for granulomatous inflammation in the transmission of infectious disease: schistosomiasis and tuberculosis. **Parasitology**, **115**: 113-125, 1997.

DOMINGO, E. O. & WARREN, K. S. The inhibition of granuloma formation around *Schistosoma mansoni* eggs. II. Thymectomy. **Am. J. Pathol.**, **51**: 757-767, 1967.

DOMINGO, E. O. & WARREN, K. S. Endogenous desensitization: Changing host granulomatous response to schistosome eggs at different stages of infection with *Schistosoma mansoni*. **Am. J. Pathol.**, **52**: 369-377, 1968.

DUNNE, D. W.; LUCAS, S.; BICKLE, Q.; PEARSON, S.; MADGWICK, L.; BAIN, J.; DOENHOFF, M. J. Identification and partial purification of an antigen (omega I) from *S. mansoni* eggs which is putatively hepatotoxic in T-cell deprived mice. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** **75**: 54-71, 1981.

EL-MOFTY, A. M. & CAHILL, K. M. Cutaneous manifestations of schistosomiasis. **Derm. Trop.**, **3**: 157-161, 1964.

ELTOUM, I. A.; WYNN, T. A.; POINDEXTER, R. W.; FINKELMAN, F. D.; LEWIS, F. A.; SHER, A.; CHEEVER, A. W. Suppressive effect of IL-4 neutralization differs for granulomas around *Schistosoma mansoni* eggs injected into mice compared to eggs laid in infected mice. **Infect. Immun.**, **63**: 2532-2536, 1995.

FREITAS, A. R. R.; OLIVEIRA, A. C. P. Schistosomal myelopathy and the relevance of Schistosomiasis in low prevalence area. In: VIII International Symposium on Schistosomiasis, 2002, Recife-PE. **Abstracts of 8^o International Symposium on Schistosomiasis**, 2002.

FREITAS, A. R. R.; YOKODA, J. C. R.; SANTOS, A. M.; REIS, R. D.; NEUMANN, M. M. A. G. L. ; YAMANAKA, A. Approach of hepatic alterations in schistosomiasis on area of low prevalence by ultrasonography using who standardization. In: VIII International Symposium on Schistosomiasis, 2002, Recife-PE. **Abstracts of 8^o International Symposium on Schistosomiasis**, 2002.

HENDERSON, G. S.; LU, X.; MCCURLEY, T. L.; COLLEY, D. G. In vivo molecular analysis of lymphokines involved in the murine immune response during *Schistosoma mansoni* infection II. Quantification of IL-4 mRNA, IFN- γ mRNA and IL-2 mRNA levels in the granulomas livers, mesenteric lymphnodes, and spleens during the course of modulation. **J. Immunol.**, **147**: 2261-2269, 1992.

HIGGINS-OPITZ, S. B.; DETTMAN, C. D. The infection characteristics of a South African isolate of *Schistosoma mansoni*: a comparison with a Puerto Rican isolate in a BALB/c mice and *Mastomys coucha*. **Parasitol. Res.**, **77**: 142-151, 1991.

HOFFMANN, W. A.; PONS, J. A.; JANER, J. L. Sedimentation concentration method in schistosomiasis, Puerto Rico. **J. Public Health**, **9**: 283-298, 1934.

JAMES, S. L. & COLLEY, D. G. Eosinophil-mediated destruction of *Schistosoma mansoni* eggs. **J. Reticuloendothel Soc.**, **20**: 359-374, 1976.

JANKOVIC, D.; CHEEVER, W.; KULLBERG, M. C.; WYNN, T. A.; YAP, G.; GASPAR, P.; LEWIS, F. A.; CLYNES, R.; RAVETCH, J. V.; SHER, A. CD4⁺ cell-mediated granulomatous pathology in schistosomiasis is downregulated by a B cell-dependent mechanism requiring Fc receptor signaling. **J. Exp. Med.**, **187**: 619-629, 1998.

KASTNER, M. R. Q.; KOHN, A.; TEIXEIRA, E. D.; PITANGA, L. C. Estudo morfológico do *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907, encontrado na espécie humana. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, **9**: 247-61. 1975.

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

KOMYIA, Y. & KOBAYASHI, A. Evolution of Kato's thick smear technic with a cellophane cover for helminth eggs in feces. **Jap. J. Med. Sci. Biol.**, **19**: 59, 1966.

LENZI, H. L.; KIMMEL, E.; SCHECHTMAN, H.; PELAJO-MACHADO, M.; ROMANHA, W. S.; PACHECO, R. G.; MARIANO, M.; LENZI, J. A. Histoarchitecture of schistosomal granuloma development and Involution: morphogenetic and biomechanical approaches. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, **93**: 141-151, 1998.

LICHTENBERG, F. V. Host response to eggs of *Schistosoma mansoni* I. Granuloma formation in the unsensitized laboratory mouse. **Am. J. Pathol.**, **41**: 711-731, 1962.

LICHTENBERG, F. V. Studies on granuloma formation. III. Antigen sequestration and destruction in the schistosomose pseudotubercle. **Am. J. Pathol.**, **45**: 75-93, 1964.

LIMA, J. N. **Estudo clínico e terapêutico da esquistossomose em menores de 15 anos do Vale do Ribeira, SP: comparação com oxamniquet, praziquantel e associação dessas drogas em baixas doses.** 1991. 102 pp. Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1991.

LINS, R. A. B.; CAVALCANTI, C. B. L.; ARAÚJO-FILHO, J. L. S.; MELO-JÚNIOR, M. R.; CHAVES, M. E. C. A. Distribuição dos eosinófilos nas diferentes fases de evolução do granuloma hepático em camundongos infectados pelo *Schistosoma mansoni*. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, **41**: 173-178. 2008.

MACHADO-SILVA, J. R.; GALVÃO, C.; PRESCAVE, O. A. F.; REY, L.; GOMES, D. C. Host induced morphological changes of *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907 male worms. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, **89**: 411-414, 1994.

MACHADO-SILVA, J. R.; GALVÃO, C.; OLIVEIRA, R. M. F.; PRESGRAVE, A. F.; GOMES, D. C. *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907: comparative morphological studies of some Brazilian strains. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, **37**: 441-447, 1995.

MACHADO-SILVA, J. R.; LANFRED, R. M.; GOMES, D. C. Morphological study of adult male worms of *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907 by scanning electron microscopy. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, **92**: 647-653, 1997.

MACHADO-SILVA, J. R.; PELAJO-MACHADO, M.; LENZI, H. L.; GOMES, D. C. Morphological study of adult male worms of *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907 by confocal laser scanning microscopy. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, **93**: 303-307, 1998.

MAGALHÃES, L. A. Estudo dos dados obtidos de uma população de *Biomphalaria glabrata* de Belo Horizonte infectada por *Schistosoma mansoni* da mesma cidade, e de uma população de *Biomphalaria tenagophila* de Campinas, infectada por *Schistosoma mansoni* de São José dos Campos. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, **4**: 195-196, 1969a.

MAGALHÃES, L. A. Técnica para avaliação da viabilidade de penetração de cercárias *Schistosoma mansoni* em *Mus musculus*. **Hospital**, **75**: 1663-1666, 1969b.

MAGALHÃES, L. A. & CARVALHO, J. F. Verificação do número de machos e de fêmeas de *Schistosoma mansoni* capturados em camundongos infectados com duas cepas do helminto. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, **3**: 253-254, 1969.

MAGALHÃES, L. A. & CARVALHO, J. F. Desenvolvimento do *Schistosoma mansoni* das linhagens de Belo Horizonte (MG) e de São José dos campos (SP) em *Mus musculus*. **Rev. Saúde Pública**, **7**: 285-287, 1973a.

MAGALHÃES, L. A. & CARVALHO, J. F. Estudo morfológico de *Schistosoma mansoni* pertencentes a linhagens de Belo Horizonte (MG) e de São José dos Campos (SP). **Rev. Saúde Pública**, **7**: 289-294, 1973b.

MAGALHÃES, L. A.; ALCÂNTARA, F. G.; CARVALHO, J. F. Alguns dados referentes ao estudo parasitológico e anatomopatológico de duas linhagens de *Schistosoma mansoni*, Sambom, 1907. **Rev. Saúde Pública**, **9**: 1-5, 1975a.

MAGALHÃES, L. A.; ALCÂNTARA, F. G.; CARVALHO, J. F. Distribuição de lesões esquistossomóticas extra-hepáticas em camundongos infectados pelas linhagens BH e SJ de *Schistosoma mansoni*. **Rev. Saúde Pública**, **13**: 326-334. 1975b.

MAGALHÃES, L. A. & CARVALHO, J. F. Sobre o comportamento de duas linhagens de *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907. Proposição para método de estudo quantitativo. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, **4**: 169-194, 1976.

MATHEW, R. C. & BOROS, D. L. Anti- L3T4 antibody treatment suppresses hepatic granuloma formation and abrogates antigen-induced interleukin-2 production in *Schistosoma mansoni*. **Infect. Immun.**, **54**: 820-826, 1986.

MENEZES, H. Granuloma esquistossomótico do miocárdio. **Rev. Bras. Med.**, **9**: 4-5. 1952.

NEVES, R. H.; PEREIRA, M. J. S.; OLIVEIRA, R. M. F.; GOMES, D. C, MACHADO-SILVA J. R. *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907: morphometric differences between adult worms from sympatric rodents and human isolates. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, **93**: 309-312, 1998.

NEVES, R. H.; OLIVEIRA, A. S.; MACHADO-SILVA, COUTINHO, E.; GOMES, D. C. Phenotypic characterization of *Schistosoma mansoni* adult worms recovered from undernourished mice: a morphometric study focusing on the reproductive system. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, **35**: 405-407, 2002.

PARAENSE, W. L.; CORRÊA, L. R. Sobre a ocorrência de duas raças biológicas do *Schistosoma mansoni* no Brasil. **Cien. Cult.**, **15**: 245-246, 1963a.

PARAENSE, W. L. & CORRÊA, L. R. Variation in susceptibility of *Australorbis glabratus* to a strain of *Schistosoma mansoni*. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, **5**: 15-22. 1963b.

PARAENSE, W. L. & CORRÊA, L. R. Differential susceptibility of *Biomphalaria tenagophila* populations to infection with a strain of *Schistosoma mansoni*. **J. Parasitol.**, **64**: 822-826, 1978.

PARAENSE, W. L. & CORRÊA, L. R. Observation on two biological races of *Schistosoma mansoni*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, **76**: 287-291, 1981.

PEARCE, E. J.; CASPAR, P.; GRZYCH, J. M.; LEWIS, F. A.; SHER, A. Downregulation of Th1 cytokine production accompanies induction of Th2 responses by a parasitic helminth, *Schistosoma mansoni*. **J. Exp. Med.**, **173**: 159-166, 1991.

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

PELLEY, R. P.; RUFFIER, J. J.; WARREN, K. S. The suppressive effect a chronic helminths infection, schistosomiasis mansoni, on the in vitro responses of spleen and lymph node cells to the T cell mitogens phytohemagglutinin and concanavalin A. **Infect. Immun.**, **13**: 1176-1183, 1976.

PELLEGRINO, J.; OLIVEIRA, C. A.; FARIA, J.; CUNHA, A. S. New approach to the screening of drugs in experimental Schistosomiasis mansoni in mice. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, **11**: 201-215, 1962.

PERROTO, J. L. & WARREN, K. S. Inhibition of granuloma formation around *Schistosoma mansoni* eggs. IV. X-irradiation. **Am. J. Pathol.**, **56**: 279-291, 1969. Guanabara Koogan, 1982.

PHILLIPS, S. M.; DICONZA, J. J.; GOLD, W. A. Schistosomiasis in the congenitally athymic (nude) mouse. I. Thymic dependency of eosinophilia, granuloma formation, and host morbidity. **J. Immunol.**, **118**: 594-599, 1977.

- PITTELLA, J. E. H. Neuroschistosomiasis. **Brain Pathol.**, **7**: 649-662, 1997.
- PITTELLA, J. E. H. & LANA-PEIXOTO, M. A. Brain involvement in hepato-splenic schistosomiasis mansoni. **Brain**, **104**: 621-632, 1981.
- PRATA, A. **Biopsia retal na esquistossomose. Bases de aplicações no diagnóstico e tratamento.** Tese de Doutorado, Universidade Federal de Salvador, Bahia, 1957.
- QUEIROS, A. C. O. Envolvimento do sistema nervoso central na esquistossomose mansônica. **Rev. Patol. Trop.**, **3**: 255-261, 1974.
- RASO, P.; BOGLIOLO, L. Patologia, p. 77-130. In: CUNHA, A. S. **Esquistossomose mansoni.** Editora da Universidade de São Paulo, São Paulo. 1970.
- REY, L. **Parasitologia.** 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.
- ROLLINSON, D. & SOUTHGATE, V. R. The genus *Schistosoma*: a taxonomic appraisal. In: Rollinson D, Southgate V.R. **The Biology of Schistosomes from Genes to Latrines.** San Diego: Academic Press, 1987.
- SANTOS, N. R. **Esquistossomose mansônica autóctone no Vale do Paraíba, Estado de São Paulo, Brasil: contribuição para o estudo da zona endêmica, São Paulo.** 1967. Tese de Doutorado, Faculdade de Medicina da USP, São Paulo. 1967.
- SAOUD, M. F. A. The infectivity and pathogenicity of geographical strains of *Schistosoma mansoni*. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, **60**: 585-600. 1966.
- SAS. Institute Inc. SAS System for Windows versão 9.01. Cary, NC, USA. 2006.
- 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**: 353-361. 2000.
- SMITHERS, S. R. S. & DOENHOFF, M. J. Schistosomiasis. In: **Immunology of Parasitic Infections.** 2 ed. S. Cohen, K.S, Warren. Great Britain, Blackwell Scientific Publications, pp. 527-607. 1982.

SOUZA VIDAL, M. R. F.; BARBOSA JR, A. A.; ANDRADE, Z. A. Experimental pulmonary schistosomiasis. Lack of morphological evidence of modulation in schistosomal pulmonary granulomas. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, **35**: 423-429, 1993.

STAVITSKY, A. B. Regulation of granulomatous inflammation in experimental models of schistosomiasis. **Infect. Immun.**, **72**: 1-12. 2004.

VAN MARCK, E. A.; KESTENS, L.; STOCKER, S.; GRIMAUD, J. A.; GIGASE, P. L.; DEELDER, A. M. Fibrosis around schistosomal egg antigen coated beads in the liver of mice. **Contrib. Microbiol. Immunol.**, **7**: 251-259, 1983.

WARREN, K. S. & DOMINGO, E. O. Granuloma formation around *Schistosoma mansoni*, *S. haematobium*, and *S. japonicum* eggs. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, **19**: 292-304, 1970a.

WARREN, K. S. & DOMINGO, E. O. *Schistosoma mansoni*: Stage-specificity of granuloma formation around eggs after exposure to irradiated cercariae, unisexual infections, or dead worms. **Exp. Parasitol.**, **27**: 60-66, 1970b.

WARREN, K. S.; DOMINGO, E. O.; COWAN, R. B. T. Granuloma formation around schistosomes eggs as a manifestation of delayed hypersensitivity. **Am. J. Pathol.**, **51**: 735-756, 1967.

WYLER, D. J. Molecular and cellular basis of hepatic fibrogenesis in experimental schistosomiasis mansoni infection. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, **87**: 117-125. 1992.

WYNN, T. A.; CHEEVER, D.; JANKOVIC, D.; POINDEXTER, R. W.; CASPAR, P.; LEVIS, F.A; SHER, A. An IL-12-based vaccination method for preventing fibrosis induced by schistosome infection. **Nature**, **376**: 594-596, 1995.

WYNN, T. A.; THOMPSON, R. W.; CHEEVER, A. W.; MENTINK-KANE, M. M. Immunopathogenesis of schistosomiasis. **Immunol. Rev.**, **201**: 156-167. 2004.

WILSON, M. S.; MENTINK-KANE, M. M.; PESCE, J. T.; RAMALINGAM, T. R.; THOMPSON, R.; WYNN, T. A. Immunopathology of schistosomiasis. **Immunol. Cell. Biol.**, **85**: 148-154, 2007.

YOLLES, T. K.; MOORE, P. V.; DEGENSTI, D. L.; RIPSON, C. A. & MELENEY, H. E. A. technique for the perfusion of laboratory animals for recovery of schistosomes. **J. Parasitol.**, **33**:419, 1947.

YOSHIOKA, L.; ZANOTTI-MAGALHÃES, E. M.; MAGALHÃES, L. A.; LINHARES, A. X. *Schistosoma mansoni*: estudo da patogenia da linhagem Santa Rosa (Campinas, SP, Brasil) em camundongos. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, **35**: 203-207. 2002.

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

ZANOTTI-MAGALHÃES, E. M.; MAGALHÃES, L. A.; CARVALHO, J. F. Relação entre a patogenicidade de *Schistosoma mansoni* em camundongos e a susceptibilidade do molusco. I. Infeciosidade das cercárias e carga de vermes. **Rev. Saúde Pública**, **25**: 359-366, 1991.

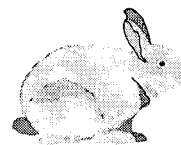
ZANOTTI-MAGALHÃES, E. M.; MAGALHÃES, L. A.; CARVALHO, J. F. Relação entre a patogenicidade do *Schistosoma mansoni* em camundongos e susceptibilidade do molusco vetor. II. Número de ovos nas fezes e número e tamanho dos granulomas nas vísceras. **Rev. Saúde Pública**, **29**: 265-70, 1993a.

ZANOTTI-MAGALHÃES, E. M.; MAGALHÃES, L. A.; UETA, M. T.; LINHARES, A. X. & ARTIGAS, P. T. Morphometrics of the adult worm and larvae of two *Schistosoma mansoni* strains maintained in *Mus musculus*. 4th International Symposium on Schistosomiasis, Rio de Janeiro, p.212, 1993b.

ZANOTTI-MAGALHÃES, E. M.; MAGALHÃES, L. A.; CARVALHO, J. F. Relação entre a patogenicidade do *Schistosoma mansoni* em camundongos e susceptibilidade do molusco vetor. III. Mortalidade, peso corporal e das vísceras. **Rev. Saúde Pública** **29**: 265-270, 1995.

ZANOTTI-MAGALHÃES, E. M.; MAGALHÃES, L. A.; CARVALHO, J. F. Relação entre a patogenicidade do *Schistosoma mansoni* em camundongos e susceptibilidade do molusco vetor. IV. Infeciosidade dos miracídios. **Rev. Saúde Pública**, **31**: 488-494, 1997.

ZUIM, N. R. B. **Características Morfológicas e Biológicas do *Schistosoma mansoni* Oriundo de Populações de Moluscos Seleccionados Geneticamente**. 2003. 140 pp. Dissertação de Mestrado. Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas. 2003.



Comissão de Ética na Experimentação Animal
CEEA-IB-UNICAMP

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 870-1, sobre "ESTUDO DAS REAÇÕES GRANULOMATOSAS EM TORNO DO OVO DE SCHISTOSOMA MANSONI DAS LINHAGENS BH E SJ. EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS DE CHOQUE TÉRMICO EM CAMUNDONGOS INFECTADOS COM AS LINHAGENS BH E SJ DE SCHISTOSOMA MANSONI" sob a responsabilidade de Profa. Dra. Eliana Maria Zanotti-Magalhães / Nádia Regina Borim Zuim está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA)-IB-UNICAMP em reunião de 13 de setembro de 2005.

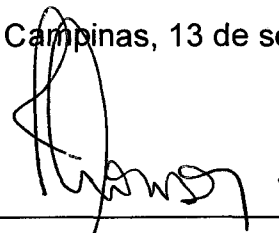
CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 870-1, entitled "STUDY OF THE REACTIONS GRANULOMATOUS AROUND THE EGG OF SCHISTOSOMA MANSONI OF THE LINEAGES BH AND SJ. EXPRESSION OF THE HEAT SHOCK PROTEIN IN MICE INFECTED WITH THE LINEAGES BH AND SJ OF SCHISTOSOMA MANSONI", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - UNICAMP) on September 13, 2005.

Campinas, 13 de setembro de 2005.

2ª. VIA


Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente - CEEA/IB/UNICAMP


Fátima Alonso
Secretária - CEEA/IB/UNICAMP



**Comissão de Ética na Experimentação Animal
CEEA/UNICAMP**

C E R T I F I C A D O

Certificamos que o Protocolo nº **642-1**, sobre "**ESTUDO EM CAMUNDONGOS DA PATOGENIA DO SCHISTOSOMA MANSONI DA LINHAGEM SÃO DOMINGOS (CAMPINAS, SP)**" sob a responsabilidade de **Profa. Dra. Eliana Maria Zanotti-Magalhães/Antonio Aurélio Euzebio Junior** está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal – CEEA/UNICAMP em reunião de 11 de Março de 2004.

C E R T I F I C A T E

We certify that the protocol nº **642-1**, entitled "_____", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - UNICAMP) on march 11, 2004.

Campinas, 30 de junho de 2009.

2ª. VIA

Prof. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente

Fátima Alonso
Secretária