

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE:
INFECTOLOGIA E MEDICINA TROPICAL**

THIAGO ANDRÉ ALVES FIDELIS

**NEUROESQUISTOSSOMOSE EXPERIMENTAL EM
CAMUNDONGOS: ESTUDO CLÍNICO, ANATOMO-
PATOLÓGICO E DA RESSONÂNCIA MAGNÉTICA DO
ENCÉFALO**

Belo Horizonte

2018

THIAGO ANDRÉ ALVES FIDELIS

**NEUROESQUISTOSSOMOSE EXPERIMENTAL EM
CAMUNDONGOS: ESTUDO CLÍNICO, ANÁTOMO-
PATOLOGICO E DA RESSONÂNCIA MAGNÉTICA
DO ENCÉFALO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito para a obtenção do título de Doutor em Ciências da Saúde.

Área de concentração: Esquistossomose mansoni-
patogênese geral, imunopatogênese, clínica,
morbidade, tratamento e prognóstico

Orientador: Prof. Dr. José Roberto Lambertucci.

Coorientador: Prof. Dr. Paulo Marcos

Zech Coelho

Belo Horizonte/Minas Gerais

2018

Fidelis, Thiago André Alves.
F451n Neuroesquistossomose experimental em camundongos
[manuscrito]: estudo clínico, anátomo-patológico e da ressonância
magnética do encéfalo.
/Thiago André Alves Fidelis. - - Belo Horizonte: 2018.
124f.: il.
Orientador: José Roberto Lambertucci.
Coorientador: Paulo Marcos Zech Coelho.
Área de concentração: Infectologia e Medicina Tropical.
Tese (doutorado): Universidade Federal de Minas Gerais,
Faculdade de Medicina.

1. Esquistossomose mansoni. 2. Neuroesquistossomose. 3.
Modelos Animais. 4. Infecções do Sistema Nervoso Central. 5.
Encefalite. 6. Dissertações Acadêmicas. I. Lambertucci, José Roberto.
II. Coelho, Paulo Marcos Zech. III. Universidade Federal de Minas
Gerais, Faculdade de Medicina. IV. Título.

NLM: WC 810

Bibliotecária Responsável: Cibele de Lourdes Buldrini Filogônio Silva CRB-
6/999



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

REITORA: Profa. Dra. Sandra R. Goulart Almeida

PRÓ-REITOR DE PÓS-GRADUAÇÃO: Prof. Dr. Fábio Alves

FACULDADE DE MEDICINA

DIRETOR: Prof. Dr. Humberto José Alves

COORDENADOR DO CENTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO: Prof. Dr.
Tarcizo A. Nunes

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE: INFECTOLOGIA E MEDICINA TROPICAL

COORDENADOR: Prof. Dr. Eduardo Antônio Ferraz Coelho

SUB-COORDENADOR: Prof. Dr. Antônio Luiz Pinheiro

MEMBROS DO COLEGIADO

Prof. Dr. Eduardo Antônio Ferraz Coelho (Coordenador)

Prof. Dr. Antônio Luiz Pinho Ribeiro (Subcoordenador)

Prof^a. Dra. Denise Utsch Gonçalves

Prof. Dr. Vandack Alencar Nobre Jr.

Prof. Dr. Unai Tupinambás

Prof. Dr. Daniel Vitor de Vasconcelos Santos

Thaís Teodoro O. Santos (Representante Discente Titular)

Este trabalho foi desenvolvido no serviço de Doenças Infecciosas e Parasitárias e no Departamento de Anatomia Patológica da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, em colaboração com o Laboratório de esquistossomose do Instituto René Rachou da Fundação Oswaldo Cruz/Minas Gerais, sob a orientação do Prof. Dr. José Roberto Lambertucci da Universidade Federal de Minas Gerais. Parte do estudo foi desenvolvida no Centro Nacional de Biologia Estrutural e de Bioimagem da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

APOIO FINANCEIRO

- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)
- Fundação de Amparo à Pesquisa do estado de Minas Gerais (FAPEMIG)
- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)

*“Se aprendesse qualquer coisa,
necessitaria aprender mais, e nunca ficaria satisfeito.”
(Vidas Secas - Graciliano Ramos)*

*Dedico este trabalho:
Aos meus pais, o suporte da minha vida,
os meus pilares; aos meus irmãos,
amizade sempre.*

*Ao Dr. Lambertucci, meu mestre e
exemplo de pesquisador.*

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. José R. Lambertucci. José significa “*aquele que acrescenta*”. Sua confiança e crença em meu desempenho estimulou-me e acrescentou essa conquista em minha vida. Obrigado pela paciência, compreensão e inestimável auxílio para realização deste trabalho.

À minha família, especialmente aos meus pais pelo grande apoio e carinho incondicional em mais essa etapa da minha vida.

À minha irmã Andrea pelo estímulo em todas as horas. Obrigado por compreender a minha ausência.

Aos Profs. Drs. Marcelo Mamede, Márcio Flávio Moraes e Fernanda Tovar-Moll pela dedicação, incentivo e apoio incondicional à essa pesquisa.

Aos Drs. Paulo Marcos e Silvio Roberto, que aceitaram participar da pesquisa. Sem suas imensas colaborações, não teríamos conseguido realizar esse trabalho.

Aos Profs. Drs. Geraldo Brasileiro e Fausto Pereira, pela boa vontade e contribuição nas análises histológicas. Me despertaram para novos caminhos.

Aos amigos Aureo, Neusa, Jussara e Sueleni do Instituto René Rachou/FIOCRUZ, pela indescritível ajuda, compreensão e carinho em todos os momentos.

À Dra. Patrícia Parreiras, cuja presença e inestimável estímulo tornou possível o desenvolvimento e conclusão deste trabalho.

À Silvana Romano, secretária do Prof. Dr. Lambertucci, pela eficiência impecável, organização e carinho em todos os momentos.

À todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical e do departamento em Doenças

Infecto-parasitárias da Faculdade de Medicina/UFMG, pelas aulas, concedendo fundamentos para minha formação acadêmica.

Aos colegas Alba, Isabela, Thiago, Frederico, Caroline e Fernanda pela presença e constante incentivo.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical, pela oportunidade.

Agradeço a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho e especialmente aqueles sem os quais a tarefa seria impossível.

À Deus, pela força e luz a todo momento.

FOLHA DE APROVAÇÃO

**“Neuroesquistossomose Experimental em Camundongos:
Estudo Clínico, Anátomo-Patológico e da Ressonância
Magnética do Encéfalo”**

THIAGO ANDRÉ ALVES FIDELIS

Tese submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado, como requisito para obtenção do grau de Doutor em Ciências da Saúde pelo Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS DA SAÚDE - INFECTOLOGIA E MEDICINA TROPICAL.

Aprovada em 04 de junho de 2018, pela banca constituída pelos membros:

Prof. José Roberto Lambertucci – Orientador

UFMG

Prof. Paulo Marcos Zech Coelho – Coorientador

FIOCRUZ/MG

Profa. Denise Ustch Gonçalves

UFMG

Prof. Daniel Vitor de Vasconcelos Santos

UFMG

Profa. Isalira Peroba Rezende Ramos

UFRJ

Profa. Patrícia Martins Parreiras

FIOCRUZ/MG

Belo Horizonte, 4 de junho de 2018.

RESUMO

Neuroesquistossomose experimental em camundongos: estudo clínico, anátomo-patológico e da ressonância magnética do encéfalo

No Brasil, estimou-se que 8 milhões de pessoas estavam infectadas pelo *Schistosoma mansoni* no ano de 2000 e 30 milhões expostas ao risco de infecção. O “Global Burden of Disease Study 2010” indicou que a esquistossomose é a 100ª causa de morte no Brasil, ou 3,6% do total estimado no mundo. O sistema nervoso central pode ser acometido nas infecções pelo *S. mansoni*. Ovos do helminto já foram observados na leptomeninge, córtex cerebral, núcleos da base, plexo coróide, cerebelo e medula espinal, sendo essa última, afetada com maior frequência. No presente estudo, a infecção experimental em camundongos com cercárias de *S. mansoni* visa demonstrar a presença de granulomas formados no encéfalo e correlacionar os achados clínicos, histológicos e na ressonância magnética. Vinte e cinco camundongos *Mus musculus* – *Swiss Webster*, machos, pesando de 18 a 20 gramas, foram infectados por via subcutânea, com 50 cercárias da cepa LE e 25 foram mantidos como controles (não infectados). Planejou-se o acompanhamento dos camundongos por até 160 dias pós-infecção. A eutanásia dos animais deu-se nos dias 88, 97 e 146. Confirmada a morte do animal, seguiu-se o procedimento de fixação do encéfalo pelo formol. Para recuperação dos parasitos, seguiu-se a técnica descrita por Pellegrino & Siqueira (1956). Realizadas as imagens por ressonância magnética, obteve-se informações das lesões nos planos axial, coronal e sagital. Após aquisição das imagens, realizou-se o estudo histológico para pesquisa de ovos de *S. mansoni*, de granulomas e de outras lesões inflamatórias. As alterações neuromotoras apresentadas foram torção cervical, torção de tronco, ausência de reação de fuga, paresia, perda de equilíbrio, ataxia e rotação (*spinning*). As imagens por ressonância magnética acusaram alterações na ponderação em T1 com núcleos hiperdensos rodeados por linha hipodensa nos diferentes planos. Encontraram-se ovos de *S. mansoni* disseminados nos hemisférios cerebrais direito e esquerdo, em regiões da leptomeninge e parênquimas cerebral,

cerebelar e tronco cerebral. As amostras sugerem que os ovos alcançaram o encéfalo por via arteriolar. A reação granulomatosa epitelióide foi mais frequente na leptomeninge e em áreas de fissuras cerebrais e cerebelares. Edema e espessamento leptomeníngeo foram constatados. Os ovos observados possuíam miracídio, comprovando recente deposição no encéfalo. As células do exsudato inflamatório estão formadas por macrófagos, eosinófilos, linfócitos e células gigantes. Fibroblastos e áreas com depósitos de colágeno também estão presentes nas análises histológicas. Neste estudo descreve-se, pela primeira vez, modelo experimental da neuroesquistossomose mansoni sintomática em camundongos infectados por cercárias no subcutâneo. Houve correspondência entre as lesões encefálicas encontradas pela histologia e ressonância magnética do encéfalo.

PALAVRAS-CHAVE: Esquistossomose. Esquistossomose mansoni. Modelo murino. Neuroesquistossomose. Encefalite. Neuroinfecção.

ABSTRACT

Murine model of neuroschistosomiasis mansoni: clinical, histological and magnetic resonance imaging studies

In the year 2000, an estimated 8 million people were infected with *Schistosoma mansoni* and 30 million were at risk of infection in Brazil. The 'Global Burden of Disease Study 2010' indicated that schistosomiasis is the one hundredth cause of death in Brazil, and is responsible for 3.6% of the estimated total of deaths in the world. The central nervous system can also be affected by *S. mansoni* infection. Previous authors have observed helminth eggs in the leptomeninges, cerebral cortex, basal ganglia, choroid plexus, cerebellum and spinal cord, the latter of these with the highest frequency. In the present study, experimental infection of *S. mansoni* cercariae in mice aims to demonstrate the presence of granulomas formed in the brain and correlate the clinical, histologic, and magnetic resonance findings. We infected 25 male mice (*Mus musculus-Swiss Webster*), weighing between 18 and 20 grams, with 50 LE strain larvae subcutaneously, and maintained 25 as controls, without infection. We followed them for 160 days post-infection. Euthanasia was carried out on days 88, 97 and 146. After confirmation of death, brain samples were fixed in formalin. Parasites were recovered using the technique developed by Pellegrino and Siqueira (1956). Images were obtained in the axial, coronal and sagittal planes by magnetic resonance. Following imaging studies, we performed histological studies in order to examine *S. mansoni* eggs, granulomas and inflammatory lesions. The characteristic neuromotor behaviors observed was head and chest tilt, paresis, loss of balance reflex, altered muscle tone, ataxia and rotational motion (spinning). Histological findings included the presence of *S. mansoni* eggs disseminated in both hemispheres, in the cerebral, cerebellar and brainstem regions. Magnetic resonance imaging showed in T1 weighting hyperdense nuclei surrounded by a hypodense line in the different planes. Samples suggest eggs reached the brain through the arterial system. The granulomatous reaction was more frequent in the leptomeninge and in areas of ventricular fissures. Edema and leptomeningeal thickening were found. Eggs

presented miracidia. Additionally, histological examination demonstrated macrophages, eosinophils, lymphocytes, fibroblasts and collagen in the samples. In conclusion, the experimental model of brain schistosomiasis mansoni was developed by injecting cercariae into the subcutaneous tissue. There was a correspondence between the encephalic lesions and the magnetic resonance findings.

KEY-WORDS: Schistosomiasis mansoni. Schistosomiasis.
Neuroschistosomiasis murin model. Encephalitis. Neuroinfection.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Ciclo biológico do <i>Schistosoma mansoni</i>	30
Figura 2 - Classificação clínica da esquistossomose mansoni.....	31
Figura 3 - Injeção de contraste iodado na veia dorsal do pênis de macaco <i>Rhesus</i>	43
Figura 4 – Sequenciamento histológico.....	56
Figura 5 – Fluxograma do estudo.....	58
Figura 6 – Camundongo <i>Swiss Webster</i> infectado com 50 cercárias de <i>S. mansoni</i>	62
Figura 7 – Representação de cortes coronais.....	63
Figura 8 – Reconstrução multiplanar da RM do encéfalo de camundongo imageado com 97 dias de infecção.....	64
Figura 9 – Granuloma esquistossomótico.....	65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Avaliação das manifestações neurológicas de três camundongos infectados com 50 cercárias pela via subcutânea e 25 não infectados, realizados no laboratório de esquistossomose/FIOCRUZ/MG, no período de julho/2016 a janeiro/2017.....60

Tabela 2 – Topografia das lesões encefálicas, pela ressonância magnética de três camundongos infectados com 50 cercárias pela via subcutânea, atribuídas aos ovos do *S. mansoni*, realizada no CENABIO/UFRJ, 2016 – 2017.....61

Tabela 3 – Topografia das lesões encefálicas atribuídas aos ovos do *S. mansoni*, de três camundongos infectados com 50 cercárias pela via subcutânea realizada na Faculdade de Medicina/UFMG, 2016-2017.....66

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BIOTEXIRR	Biotério de Experimentação do Instituto René Rachou
C57	Linhagem não isogênica/gene C57
CD-1	Linhagem não isogênica/gene CD-1
CENABIO	Centro Nacional de Biologia Estrutural e Bioimagem
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CEUA	Comissão de ética no uso de animais
CO2	Dióxido de Carbono
CPqRR	Centro de pesquisas René Rachou
CQB	Certificado de Qualidade e Biossegurança
DATASUS	Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde do Brasil
ECO T1-3D	Sequência com ponderação em T1 adquirida nos três planos
EEP	Esquistossomose Encefálica Pseudotumoral
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
EM	Esquistossomose mansoni
EPF	Exame Parasitológico de Fezes
EUA	Estados Unidos da América
FCN	Fator de Crescimento de Nervo
FA	Ângulo de giro
FIOCRUZ	Fundação Instituto Oswaldo Cruz
FOV	Campo de visão
g	Gramas
GBD	Global Burd of Disease Study
HE	Hematoxilina-eosina
ICAM-1	Moléculas de adesão Intercelular 1

IFNα	Interferon alfa
IL	Interleucinas
IV	Via Intravenosa
KOH	Hidróxido de Potássio
L	Lombar
LE	Luiz Evangelista
LCR	Líquido Céfalo Raquidiano
MCP-1/CCL2	Proteína Quimioatraente do Monócito 1
MEMS	Sequência multieco
MIP-1α/CCL3	Proteína Inflamatória do Macrófago 1 alfa
ml	Mililitros
mm	Milímetros
ms	Metros por segundo
NEX	Número de excitações
POP-MOL	Procedimento Operacional Padrão do Moluscário
RM	Ressonância Magnética
S.	Schistosoma
SBCAL	Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório
SEA	Antígeno Solúvel do Ovo
SHIRPA	SmithKline Beecham Pharmaceuticals; Harwell, MRC Mouse Genome Center and Mammalian Genetics Unit; Imperial College School of Medicine at St Mary's; Royal London Hospital, St Bartholomew's and the Royal London School of Medicine; Phenotype Assessment
SNC	Sistema Nervoso Central
spp.	Espécies
T	Torácica
T1	Unidade Tesla 1

T2	Unidade Tesla 2
TC	Tomografia Computadorizada
TE	Tempo de eco
Th1	T helper tipo 1
Th2	T helper tipo 2
TNFα	Fator Tumoral Necrosante alfa
TR	Tempo de repetição
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
WHO	World Health Organization (Organização Mundial de Saúde).

SUMÁRIO

	CONSIDERAÇÕES INICIAIS	22
1	INTRODUÇÃO.....	26
2	REVISÃO DA LITERATURA.....	29
2.1.	Esquistossomose mansoni.....	29
2.2.	Esquistossomose mansoni experimental.....	32
2.3.	Neuroesquistossomose.....	35
2.4.	Neuroesquistossomose mansoni experimental.....	45
3	OBJETIVOS.....	49
3.1.	Objetivo geral.....	49
3.2.	Objetivos específicos.....	49
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	51
4.1.	Delineamento do estudo	51
4.2.	Animais e parasitos.....	51
4.3.	Recuperação de helmintos.....	52
4.4.	Monitoramento clínico.....	52
4.5.	Preparo do encéfalo para ressonância magnética.....	53
4.6.	Ressonância magnética.....	53
4.7.	Estudo histológico.....	54
4.8.	Topografia cerebral.....	57
4.9.	Análise estatística.....	57

4.10.	Considerações éticas.....	57
5	RESULTADOS	60
5.1.	Avaliação do comportamento animal: manifestações neurológicas.....	60
5.2.	Avaliação do encéfalo pelo uso da RM.....	61
5.3.	Topografia das lesões encefálicas.....	66
5.4.	Avaliação histológica.....	66
6	DISCUSSÃO.....	68
	Dificuldades encontradas.....	72
7	CONCLUSÕES.....	74
	Proposições.....	76
8	REFERÊNCIAS.....	78
9	ANEXOS.....	88
9.1	Anexo I.....	88
10	APÊNDICES.....	92
10.1	Apêndice I.....	92
10.2	Apêndice II.....	96
10.3	Apêndice III.....	100

CONSIDERAÇÕES INICIAIS

CONSIDERAÇÕES INICIAIS

Esta tese de doutorado teve como objetivo geral estabelecer modelo de neuroesquistossomose encefálica em camundongos com proposta de avaliar as alterações clínicas neuromotoras apresentadas pelos animais infectados, topografar as lesões encefálicas correlacionando com as manifestações neurológicas identificadas e confrontar os achados apresentados pela ressonância magnética do encéfalo com a histologia e localização das lesões neurológicas.

A escolha do tema surgiu porque a esquistossomose mansoni ocorre em 54 países da África, Ásia, América do Sul e Caribe. No Brasil, de acordo com o manual de vigilância da esquistossomose do Ministério da Saúde, entre os anos de 2010 e 2012 ocorreram 1.464 óbitos por esquistossomose e em 2015 há cerca de 1,5 milhão de infectados. Também a escolha da tese baseou-se pela escassez de estudos sobre a neuroesquistossomose mansoni experimental, tendo em vista a resposta imunológica do hospedeiro e métodos diagnósticos da doença para propor o estabelecimento de terapêuticas apropriadas.

Deste modo, apresentamos um modelo experimental sobre o assunto para que sejam desvendados os mecanismos da neuropatogênese e que pesquisas mais aprofundadas sejam desenvolvidas.

Outro ponto relevante na escolha do tema baseia-se no fato do orientador desse trabalho ser consultor da Organização Mundial de Saúde sobre pesquisa e desenvolvimento em doenças parasitárias na linha de pesquisa em esquistossomose mansoni. Seus projetos de pesquisa têm ênfase na imunopatologia, diagnóstico clínico e laboratorial das formas graves da esquistossomose mansoni desde 1981.

Durante meu mestrado no Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Epidemiologia e Doenças Infecciosas da Universidade Federal de Alagoas, cujo tema foi a mielorradiculopatia esquistossomótica, recebi o convite

do meu atual orientador para que, no ambulatório Orestes Diniz e nas enfermarias do Hospital das Clínicas da UFMG, eu pudesse estudar detalhadamente os aspectos clínicos, imaginológicos e laboratoriais da neuroesquistossomose mansoni.

Tal fato possibilitou, em uma das reuniões do grupo de pesquisa do meu orientador, a discussão sobre a possibilidade de desenvolver um projeto sobre esquistossomose neurológica em camundongos. Diante do ineditismo do tema, começamos a investigar tanto a abordagem da literatura sobre o assunto quanto o comportamento de camundongos infectados rotineiramente no biotério de experimentação animal da FIOCRUZ de Minas Gerais e da Bahia. Com colaboração dos pesquisadores e colegas de doutorado, identificamos alterações neuromotoras sugestivas de neurolesões. A histologia do cérebro de dois animais infectados via subcutânea comprovou a neuroinfecção.

Tal fato possibilitou a publicação de um artigo no periódico da “Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical” intitulado “*Brain schistosomiasis in mice experimentally infected with Schistosoma mansoni*”.

A partir disso, me foi dada a oportunidade de iniciar em 2014 esse projeto de doutorado com a proposta de concretizar estudos sobre a neuroesquistossomose encefálica experimental em camundongos. Nossa pesquisa identificou outras formas ectópicas da esquistossomose mansoni como a mielopatia, a oftalmopatia e miopatias disseminadas na musculatura esquelética dos camundongos infectados, com ovos e granulomas característicos da esquistossomose mansoni.

Essa tese apresenta uma introdução e revisão da literatura com fundamentação teórica da esquistossomose mansoni, esquistossomose mansoni experimental, neuroesquistossomose e neuroesquistossomose mansoni experimental. Em sequência, observam-se os objetivos da tese, metodologia adotada, resultados e discussão. Na última parte estão inseridos todo o fechamento da tese com conclusão geral, perspectivas propostas, referências bibliográficas e anexos importantes.

A apresentação deste trabalho foi realizada de acordo com a Resolução nº 02/2013, de 18 de setembro de 2013; que regulamenta o formato dos trabalhos finais e estabelece condições para a marcação da defesa de teses e dissertações do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical da Faculdade de Medicina da UFMG.

O estudo está inserido na linha de pesquisa sobre “Esquistossomose mansoni - patogênese geral, imunopatogênese, clínica, morbidade, tratamento e prognóstico”.

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

A esquistossomose mansoni (EM) é considerada importante problema de saúde pública principalmente em países em desenvolvimento. A Organização Mundial de Saúde estima que entre 200 a 300 milhões de pessoas estão infectadas pelo *Schistosoma mansoni* e que cerca de 800 milhões vivem sob risco de infecção (LAMBERTUCCI, 2012, 2014). No Brasil, aproximadamente 2,5 milhões de pessoas estavam infectadas e 30 milhões expostas ao risco de infecção (WHO, 2009).

Registros de transmissão mostram que há esquistossomose em 18 estados da federação e o Distrito Federal. Os estados de maior endemicidade são Minas Gerais, Alagoas, Bahia, Espírito Santo e Pernambuco e as áreas focais são registradas no Distrito Federal, Maranhão, Ceará, Pará, Rio Grande do Sul, São Paulo e Rio de Janeiro (BRASIL, 2014). Minas Gerais é o estado com maior área endêmica no país, onde a doença ocorre em 533 municípios (61% do Estado) (DRUMMOND *et al.*, 2006). O índice de positividade em 2012 foi de 4,5% em 589.906 pessoas examinadas. Trata-se, portanto, de doença comum e potencialmente grave (BRASIL, 2014).

A principal causa de morbimortalidade da esquistossomose são as complicações da hipertensão portal nos indivíduos com forma hepatoesplênica, tais como, esplenomegalia e circulação colateral (varizes esofagianas e hemorroidárias), resultando em hemorragia digestiva alta. Cerca de 5% a 10% dos indivíduos infectados em área de alta prevalência desenvolvem a forma hepatoesplênica (LAMBERTUCCI *et al.*, 1993, 2001).

O sistema nervoso central (SNC) pode ser acometido nas infecções pelo *S. mansoni*, *S. haematobium* e *S. japonicum*, havendo sido observado ovos de *S. mansoni* em vários locais do sistema nervoso como cérebro, cerebelo e meninges. A medula espinal seria o sítio mais acometido (PEREIRA, 2006c). Em ambas as formas, a gravidade dos sintomas dependerá da quantidade de ovos na região comprometida e a intensidade da reação inflamatória ao seu redor. Os exames do líquido cefalorraquiano e de imagem por ressonância

magnética (RM) são importantes ferramentas diagnósticas. Corticosteróides e drogas esquistossomicidas são usadas no tratamento desta doença, e seu prognóstico dependerá diretamente do rápido uso destas drogas (CARVALHO, 2013).

Estima-se que a incidência da complicação neurológica oscila entre 0,3% e 4% dos portadores de esquistossomose mansoni. No Brasil, existe uma média de 1,5 milhão de portadores de esquistossomose, havendo possibilidade de existir cerca de 4.200 a 56.000 pessoas portando a forma neurológica (MATAS, 2001; BRASIL, 2012^a, NOYA *et al.*, 2015). Yamagiwa (1889) chamou a atenção dos pesquisadores por relatar a primeira descrição da esquistossomose cerebral, causada pelo *S. japonicum*. Autópsias realizadas em 46 pacientes provenientes de Minas Gerais, acusaram prevalência em 26% dos casos (12 cérebros) causadas por *S. mansoni* (PITTELLA, 1981, 1997; LAMBERTUCCI, 2014).

O número limitado de experimentos em modelos experimentais relacionados a infecção no SNC causados por ovos do *S. mansoni* precisa ser ampliado, com maior detalhamento na abordagem. Os primeiros resultados de pesquisas *in vivo* sugerem que a infecção em camundongos pode ser um bom modelo para elucidar o processo histopatogênico em humanos, através das respostas inflamatórias do SNC nos roedores estudados (ALOE *et al.*, 1996; LAMBERTUCCI *et al.*, 2014).

No presente estudo a infecção experimental de camundongos com cercárias de *S. mansoni* pela via subcutânea visa demonstrar a presença de granulomas formados no encéfalo e correlacionar os achados com resultados clínicos, histológicos e da ressonância magnética.

REVISÃO DE LITERATURA

2 REVISAO DE LITERATURA

2.1 Esquistossomose mansoni

No Brasil, estimou-se que aproximadamente 8 milhões de pessoas estariam infectadas no ano de 2000 e 30 milhões expostas ao risco de infecção (KATZ e PEIXOTO, 2000). Cerca de 280.000 mortes por ano são atribuídas à esquistossomose e às complicações decorrentes principalmente de sua fase crônica (VAN DER WERF *et al.*, 2003).

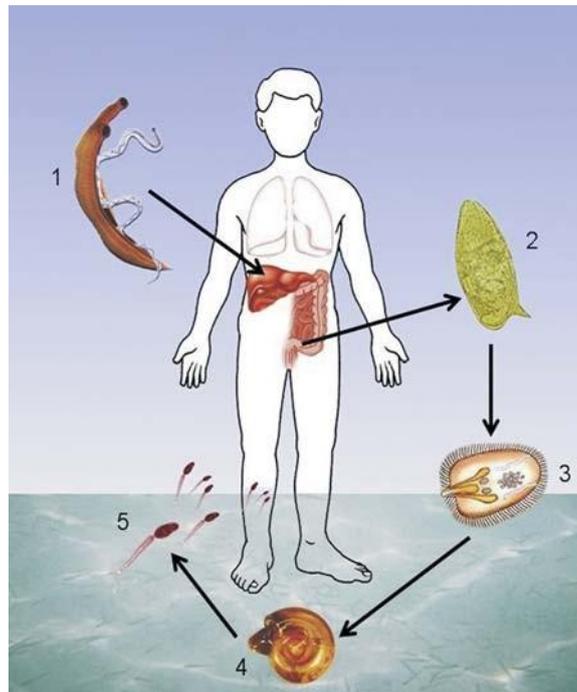
O “Global Burden of Disease Study 2010” (GBD, 2010) indicou que a esquistossomose é a 100ª causa de morte no Brasil, ou 3,6% do total estimado no mundo. O *Schistosoma mansoni*, a única espécie com transmissão estabelecida nas Américas, constitui-se a principal causa de morbimortalidade da esquistossomose. As complicações da hipertensão portal incluem a esplenomegalia e a circulação colateral. As varizes esofagianas, quando se rompem, resultam em hemorragia digestiva alta de gravidade variada (LAMBERTUCCI *et al.*, 2001), muitas vezes letal.

O início da esquistossomose ocorre pela penetração das cercárias nas mucosas e na pele, geralmente pelos pés e pernas por serem áreas que estão sempre em contato com águas infestadas. A infecção ocorre em rios, açudes, hortas irrigadas, reservatórios de água e pequenos córregos habitados pelo hospedeiro intermediário, o planorbídeo do gênero *Biomphalaria* que também é parasitado pelo helminto (COUTO, 2010).

O ciclo biológico da esquistossomose inicia-se quando os ovos do parasito são eliminados junto com as fezes do indivíduo infectado, disseminando-se no ambiente aquático. Na água doce os ovos de *S. mansoni* eclodem, libertando os miracídeos. Esses se movem, por movimento ciliar, até penetrarem no caramujo do gênero *Biomphalaria*, e passam por transformações sucessivas até atingir a forma de cercária (MAHMOUD, 1997; ROUQUAYROL *et al.*, 2003). Ao penetrarem no homem, por ação de substâncias histolíticas, as cercárias perdem sua cauda bifurcada, tornando-se esquistossômulos.

Esses, migram por vias linfáticas ou sanguíneas, atingem a circulação venosa que as conduz ao coração, e deste aos pulmões, pelas artérias pulmonares. Dos pulmões, ganham os vasos venosos, e pelas veias pulmonares alcançam o coração esquerdo, de onde são lançadas na circulação geral pelo sistema arterial, fixando-se no fígado. Nos vasos hepáticos, os parasitos diferenciam-se sexualmente, onde completam seu ciclo. Pela veia porta e suas tributárias, atingem as vênulas das paredes do intestino (MORAES, 2008) (Figura 1).

Figura 1 - Ciclo biológico do *Schistosoma mansoni*



1. Casal de parasitos adultos. 2. ovo de *S. mansoni* com sua espícula lateral. 3. miracídio ciliado. 4. hospedeiro intermediário caramujo do gênero *Biomphalaria*. 5. cercária.

Fonte: Lambertucci, 2012.

As manifestações clínicas da doença se dividem em fase aguda e fase crônica. Durante a fase de invasão e migração de esquistossômulos e vermes adultos pelos tecidos do hospedeiro humano, sintomas e sinais podem se manifestar: dermatite cercariana, pneumonite eosinofílica, eosinofilia e hepatoesplenomegalia. Na fase de migração há domínio imune da resposta Th1. Com a postura de ovos a resposta imune passa a ser Th2 dominante. A fase aguda é dada pela formação de granulomas gigantes do tipo necrótico-

exsudativos. Com o tempo há modulação da resposta imune com produção de granulomas pequenos e envolvidos por colágeno (VALE *et al.*, 2012; BARSOUM, 2013).

Na fase aguda pode ocorrer febre alta (38°- 39°C), sudorese intensa, cefaléia, dores musculares generalizadas, linfadenopatia, tosse produtiva e alterações urticariformes na pele (LOPES, 2006). Na crônica, as formas clínicas caracterizam-se como: intestinal, que pode ser assintomática ou caracterizada por diarréia muco-sanguinolenta, com oito a dez dejeções diárias, dor e desconforto abdominal; hepatointestinal, com diarréia, epigastria e hepatomegalia (HUGGINS *et al.*, 1998); hepatoesplênica com hepatoesplenomegalia, hipertensão portal, com formação de varizes de esôfago ou hemorroidárias e ascite (Figura 2).

Os ovos do *S. mansoni* podem ser encontrados em vários órgãos, como pulmões, pâncreas, rins, sistema genit urinário, linfonodos, tireóide, coração e sistema nervoso central (SANTOS, 2006).

Figura 2 - Classificação clínica da esquistossomose mansoni.

CLASSIFICAÇÃO DA ESQUISTOSSOMOSE MANSONI

Fase aguda (aparente e/ou inaparente):

Dermatite cercariana, febre, eosinofilia, granulomas.

Fase crônica:

Hepatointestinal

Hepática

Hepatoesplênica

Pneumopatias

Complicações neurológicas

Complicações urogenitais

Nefropatias

Oftalmopatias

Dermatites

Fonte: autor, 2018.

2.2 Esquistossomose mansoni experimental

Diversos experimentos são realizados com modelos animais para estudar os processos patogênicos, anátomo-histológicos e comportamentais que envolvem a esquistossomose mansoni. A escolha dos animais é resultado de tentativas de reproduzir os achados encontrados no homem.

Estudo realizado por Warren & Peters (1967) em roedores de laboratório sobre a penetração de cercárias e o desenvolvimento do *S. mansoni* até a fase adulta, constatou que o camundongo Swiss albino apresentou 36,9% de susceptibilidade à infecção em relação ao hamster (60%), à cobaia (10,6%), ao coelho (6,4%) e ao rato (0%).

Azevedo (1976) testou a eficiência de diferentes vias de infecção na esquistossomose experimental no camundongo albino por cercárias de *S. mansoni*. As formas de penetração analisadas foram: via oral, via transcutânea (por imersão parcial do camundongo, por imersão apenas da cauda e por colocação de cercárias em área depilada do abdômen) e via intraperitoneal. Cada camundongo foi infectado com 100 cercárias. Os resultados demonstraram que o maior número de vermes recuperados foi obtido pelo método de imersão parcial do corpo do animal. A via intraperitoneal provocou maior mortalidade do hospedeiro, talvez pelo fato de decorrerem frequentes hemorragias intestinais, ou por assegurar infecções mais graves, ou mesmo por eventuais acidentes de técnica.

Outra maneira de infecção utilizada em laboratórios é por inoculação dos ovos maduros de *S. mansoni*, via intravenosa (IV), em áreas próximas a determinados órgãos-alvo. Eltoun *et al.* (1995) compararam a dimensão do granuloma em resposta ao ovo de *S. mansoni*, em pulmões e fígados de camundongos fêmeas C3H/HeN, entre ovos inoculados IV e ovos eliminados pelo casal de vermes infectados por via subcutânea. Como resultado, o granuloma ao redor dos ovos inoculados por IV foi menor que as formadas ao redor de ovos liberados pelos vermes. Os autores sugerem que a

imunomodulação em resposta aos ovos injetados é menor pela perda de antígenos durante o processo de isolamento do ovo.

Outra via comum para infecção do parasito é a via subcutânea, preferida em laboratórios do mundo inteiro por facilidades técnicas e bons resultados na recuperação dos vermes. Camundongos de 20 g de peso são infectados por injeção no dorso, abaixo da cabeça, com 100-120 cercárias, sem necessidade de anestesia. Praticamente todos os animais infectam-se, e a taxa de recuperação gira em torno de 20-30 vermes adultos, 45 dias após a infecção (KATZ, 2005).

Dentre os modelos experimentais utilizados, particularmente no que se refere à reprodução da fibrose hepática esquistossomótica, destacam-se macacos chimpanzés e babuínos (SADUM *et al.*, 1970; LICHTENBERG *et al.*, 1971; DAMIAN *et al.*, 1976; FARAH *et al.*, 2000), coelhos (CHEEVER *et al.*, 1980), porcos (HURST *et al.*, 2000) e camundongos (DE WITT & WARREN, 1959; ANDRADE & WARREN, 1964; CHEEVER, 1965; WARREN, 1966; ANDRADE, 1987; ANDRADE & CHEEVER, 1993; HENDERSON *et al.*, 1993; COUTINHO *et al.*, 1997,2002).

Camundongos albinos *Swiss Webster* eutróficos infectados pelo *S. mansoni* apresentam granulomas periovulares esparsamente distribuídos no parênquima hepático e lesões porto-venosas obstrutivas semelhantes às que são encontradas no homem (CHEEVER, 1965), com formação de fibrose homóloga à fibrose de Symmers. Ocorre em cerca de 30-50% dos animais "outbred", em infecções prolongadas e de pequena intensidade (ANDRADE & WARREN, 1964; ANDRADE & CHEEVER, 1993). COUTO *et al.* (2007) observaram que em camundongos albinos *Swiss* houve formação de granulomas nas camadas muscular e serosa da porção central do intestino delgado.

Pneumopatias associadas à esquistossomose são rotineiramente observados em camundongos experimentalmente infectados por *S. mansoni*, cujos ovos e granulomas atingem as áreas pulmonares via derivações portopulmonares. A

patologia é resultado de arterites causadas pelos ovos e granulomas que produzem hipertensão pulmonar e cor pulmonale assemelhando-se à observada em seres humanos (WARREN, 1964; CHEEVER *et al.*, 2002).

Rodrigues e colaboradores registraram prevalência de 12,7% de acometimento renal em 63 pacientes portadores de esquistossomose hepatoesplênica atendidos em ambulatório em Belo Horizonte (MG) (OTONI, 2011).

Lesões e depósitos de imunocomplexos em glomérulos foram identificados em camundongos infectados por *S. mansoni*, porém, sem alterações no parênquima renal (CHEEVER & ANDRADE, 2002). Fugiwara *et al.* (1988) relataram que camundongos fêmeas *BXSB* infectadas com dez cercárias de *S. mansoni*, desenvolveram quadros graves de glomerulonefrite atribuídos à infecção. Andrade *et al.* (2002) relatam sobre acometimento renal em chimpanzés e coelhos de laboratório infectados por *S. japonicum*.

Os trabalhos de Sher *et al.* (1977), Cheever *et al.* (1994) e Wahl *et al.* (1997), realizados em camundongos, definiram aspectos relevantes da imunopatogenia da doença. A transformação do esquistossômulo em verme adulto sinaliza o início da oviposição. O ovo viável é capaz de liberar sinais quimiotáticos que recrutam e ativam leucócitos, particularmente macrófagos (WINN, 1995; CHEEVER, 1995). Lukacs *et al.* (1994) sugeriram que a amplificação da resposta inflamatória pode ser mediada a partir da fixação de macrófagos na superfície do endotélio vascular. Produtos macrofágicos da reação inflamatória inicial, particularmente fator de necrose tumoral alfa (TNF α), ativam as células endoteliais que passam a expressar, de forma exuberante, moléculas de adesão intercelular (ICAM-1). Fixadas, estas células passam a liberar grande quantidade de citocinas quimiotáticas e pró-inflamatórias, as interleucinas IL-12, IL-1 β e IL-6, capazes de atrair um número crescente de células que se comprometem com a resposta inflamatória. A IL-10, importante marcador de fibrose hepática, identificada tanto em fase aguda quanto na crônica, induz e controla a resposta Th2 na formação do granuloma. Linfócitos CD4 precursores (Th0) são quimioatraídos, acumulam-se no sítio inflamado e também ativados pelo SEA, liberam proteína quimioatraente de monócito 1 (MCP-1/CCL2),

proteína inflamatória do macrófago 1 alfa (MIP-1 α /CCL3) e interferon alfa (IFN α). Assim atraídos e fixados, os macrófagos e as células dendríticas apresentadoras de antígenos ativados, disparam uma sequência de fenômenos imunológicos específicos, culminando com a ativação e diferenciação de células T CD4+ (células T efectoras). Dessa forma, a imunidade adaptativa se soma à imunidade inata para a erradicação do patógeno (FERRARI, 2010; OTONI, 2011).

No estudo da esquistossomose mansoni experimental, os animais classicamente utilizados têm sido os camundongos (CAPRON *et al.*, 1982), por serem animais de baixo custo, fácil reprodução e manutenção em laboratório. Por outro lado, atendem ao pré-requisito de um bom modelo, por permitirem a reprodução da infecção de forma regular e característica (CRAM & BOZICEVICH, 1914; CRAM & FILES, 1947; MACHADO E SILVA *et al.*, 1991; KATZ, 2005).

2.3 Neuroesquistossomose

A presença dos helmintos, ovos ou granulomas no tecido nervoso é pouco relatada, e pode ser observada em qualquer área do cérebro, cerebelo ou medula espinal, provocando desde lesões inexpressivas, com poucas manifestações clínicas, até casos graves de mielite transversa, tumor cerebral, cerebelar ou medular, hemorragia cerebral maciça com correspondentes distúrbios neurológicos, que podem causar a morte (LOPES, 2006; LAMBERTUCCI, 2014).

Neuroesquistossomose refere-se à esquistossomose que afeta o SNC, quando sintomático, apresenta-se como a forma mais grave atribuída à doença e prognóstico relacionado ao diagnóstico precoce. É considerada doença subestimada principalmente no referente à encefalopatia em regiões tropicais. O envolvimento do encéfalo e medula espinal devem ser relacionados não apenas ao surgimento dos sintomas característicos da afecção, mas também a todos os casos de pessoas que foram expostas aos riscos de infecção.

Em humanos, o SNC pode ser acometido nas infecções pelo *S. japonicum*, *S. haematobium* e *S. mansoni*. O *S. japonicum* tem maior propensão para as encefalopatias, enquanto que o *S. haematobium* e o *S. mansoni* acometem principalmente a medula espinal, raízes nervosas e cauda equina (LAMBERTUCCI *et al.*, 2004, 2006; FERRARI *et al.*, 2011; VALE *et al.*, 2012).

Geograficamente, a esquistossomose japônica é endêmica nas regiões da China e ilhas Filipinas de Leyet, Samar, Mindoro e Mindanao (MOST *et al.*, 1948).

A primeira descrição da esquistossomose cerebral foi feita por Yamagiwa (1889), quinze anos antes da descoberta do agente etiológico *S. japonicum*. O paciente apresentou quadros de epilepsia jacksoniana. Autopsia cerebral identificou granulomas no lobo occipital direito, em todo lobo parietal direito e sulco central do cérebro (FAUST, 1948).

Em 1905, Tsunoda e Shimamura encontraram ovos de *S. japonicum* no córtex cerebral e núcleos da base no hemisfério esquerdo de um homem de 37 anos de idade com manifestações neurológicas, do tipo epilepsia jacksoniana, e hemiplegia à direita (MOST *et al.*, 1948).

Em 1913, Ferguson relatou que dentre 600 pessoas infectadas pelo *S. haematobium*, em um paciente, cujo cérebro e medula foram dissecados e digeridos em solução de hidróxido de potássio (5%), encontrou-se vasta quantidade de ovos do helminto. Pela técnica utilizada, não foi possível identificar em qual órgão os ovos estavam depositados (FAUST, 1948).

Chu (1931) relatou que dentre 39 pacientes chineses com esquistossomose japônica, em um caso houve epilepsia jacksoniana e um outro paciente apresentou hemiparesia à direita. Para esses casos, o pesquisador não mencionou estudo histológico no cérebro dos pacientes (FAUST, 1948).

Em 1935, Shimidzu descreveu o caso de um rapaz de 18 anos de idade com papiledema e diminuição da visão bilateralmente, dor de cabeça e hiperestesia. Depois de um ano do início dos sintomas, foi realizada craniotomia e remoção

de cerca de 40 gramas de massa tumoral em região occipital do cérebro. O pesquisador relatou que a superfície do tumor, ao toque, “assemelhava-se a grãos de areia”. A microscopia identificou ovos de *S. japonicum* envoltos por células gliais em degeneração. Todas as artérias examinadas possuíam aspecto normal, porém as veias apresentaram aspecto flebítico. Nove meses após a cirurgia, o paciente estava sem queixas e apto ao trabalho (FAUST, 1948).

Em 1936, foi publicado o caso de um oficial da marinha inglesa que havia trabalhado na China por 4 anos. O exame neurológico revelou hiperreflexia patelar à direita e hemiparesia facial à direita. Realizou-se ressecção de um tumor com 2,5 cm de diâmetro da região temporoparietal do hemisfério cerebral esquerdo. Relatou-se que o material possuía “aspecto amarelado e nitidamente demarcado”. A histologia revelou ovos de *S. japonicum* envoltos por agregado de eosinófilos (MOST *et al.*, 1948).

Day e Kenawy, em 1936, apresentaram o caso de uma criança de 10 anos de idade com paraplegia flácida. À autópsia, encontrou-se na região lombar da medula espinal ovos de *S. haematobium* com necrose periovular. Não foram encontradas alterações da morfologia cerebral (FAUST, 1948).

Grenfield e Pritchard, em 1937, descreveram o caso de um oficial da marinha inglesa de 25 anos de idade, que havia trabalhado na China. Tal paciente apresentou manifestações clínicas como dor de cabeça, vômitos, hemiparesia à direita e hemianopsia à direita. Foi realizada craniotomia e removida massa tumoral do quadrante superior esquerdo da região parieto-occipital do cérebro. A histologia apresentou ovos de *S. japonicum* circundados por fibroblastos, células epiteliais e células gigantes (FAUST, 1948).

Em 1941, Vitug *et al.* descreveram 2 casos de esquistossomose cerebral em cidadãos filipinos. O primeiro caso apresentou convulsões do tipo jacksoniana e disartria. A histologia revelou ovos de *S. japonicum* situado no plexo coroide. O segundo caso foi sobre um homem de 49 anos de idade hemiparesia e hemianestesia à direita, espasmos na hemiface direita e movimentos atetóides

da mão direita. Nesse segundo caso, apesar do exame coprológico ser positivo para ovos de *S. japonicum*, não houve biópsia do tecido cerebral, levando os autores a supor afecção neurológica pelo *S. japonicum*. Em ambos os casos foram realizados exames de LCR para detecção de anticorpos anti-schistosoma, porém os resultados foram negativos.

Em 1944 relatou-se 27 casos de esquistossomose cerebral em soldados americanos que, durante a Segunda Guerra Mundial, ocuparam a região de Leyte (Filipinas). Esse número constitui cerca de 2,3% de 1,200 pessoas infectadas pelo *S. japonicum*. Nesse mesmo ano (1944), em 800 pessoas provindas da Ásia e atendidas no Hospital Geral Moore (Carolina do Norte - Estados Unidos da América) aproximadamente 2% (160 pessoas) dos atendidos desenvolveram complicações cerebrais atribuídas à esquistossomose japônica. Os autores não relatam histologia do parênquima cerebral (FAUST, 1948; GARCIA, 1976).

Estudos realizados por Gelfand (1950), após examinar o cérebro de 50 pacientes portadores de infecção urinária pelo *S. haematobium*, identificou ovos do verme em 56% (28 pessoas) desses pacientes. As regiões de depósitos de ovos foram parietal, occipital, temporal, frontal e límbica do córtex cerebral. Em 1958, Alves examinou 150 cadáveres de portadores de esquistossomose haematóbica e identificou ovos de *S. haematobium* em 28% (42 órgãos) dos cérebros autopsiados. Nessas duas pesquisas, não houve descrição da clínica neurológica dos pacientes.

Pesquisa realizada por Junaid *et al.* (1975), selecionou 34 cadáveres femininos para estudo sistêmico da distribuição e de ovos e/ou vermes do *S. haematobium* no organismo humano. Em apenas um caso, encontrou ovos de *S. haematobium* no cérebro.

Em 1994, Parenti *et al.* descreveram o caso de um homem com 30 anos de idade portador de infecção cerebral por *S. haematobium*. O paciente apresentou quadro clínico de dor de cabeça, diminuição da visão do olho esquerdo e um episódio de perda de consciência. A ressonância magnética

evidenciou lesão em região parietal do cérebro com acentuado edema. A histologia identificou linfócitos, histiócitos, células gigantes e eosinófilos periovulares.

Segundo Ferrari *et al.* (2011), em 1948 a encefalopatia causada pelo *S. japonicum* foi principal causa de internações, com cerca de 1 a 5% dos casos de encefalites agudas, diagnosticados nos serviços de saúde na China. Os autores destacam que cerca de 3 a 5% dos pacientes desenvolveram o pseudotumor atribuído a doença. Sobre a encefalite atribuídas ao *S. haematobium* e *S. mansoni*, não há relato na literatura sobre tal prevalência.

A tendência dos ovos de *S. japonicum* alcançarem o encéfalo é mais frequente se comparado aos do *S. haematobium* e de *S. mansoni*. Embora relativamente pouco abordado, o envolvimento cerebral por *Schistosoma spp.* possa ser mais comum do que se acredita. A reação granulomatosa é a lesão típica atribuída a neuroesquistossomose, com formação de massa tumoral, edema e possível efeito de massa no parênquima nervoso (CAROD-ARTAL, 2007).

Atribui-se que a forma assintomática da esquistossomose encefálica associa-se com a fase crônica da doença, mais comum nas infecções pelo *S. haematobium* e *S. mansoni*. Em pesquisa desenvolvida por Pittella *et al.* (1981), no Brasil, realizaram-se autópsia em 46 pacientes com esquistossomose mansoni hepatoesplênica. Encontrou-se ovos e granulomas de *S. mansoni* em 26% (12 casos) dos cérebros estudados. Nenhum desses casos apresentou sintomatologia neurológica.

Na forma sintomática, a clínica varia de acordo com a região cerebral lesada, da resposta imune do hospedeiro e da fase da infecção. O cerebelo é o local mais comum de depósito dos ovos, seguido da leptomeninge e córtex cerebral. (PITTELLA, 1981,1997; FERRARI *et al.*, 2011; VALE *et al.*, 2012; LAMBERTUCCI *et al.*, 2014).

As manifestações neurológicas na fase aguda da neuroesquistossomose envolvem febre, dermatite, delírio e confusão mental, perda de consciência, dor

de cabeça, convulsões, disfasia, alteração da visão, déficit motor (paresias e plegias), síndrome cerebelar, síndrome meníngea, retenção urinária e/ou fecal (CAROD-ARTAL, 2007; FERRARI *et al.*, 2011; VALE *et al.*, 2012; LAMBERTUCCI *et al.*, 2014).

Estudo elaborado com 21 pacientes diagnosticados com esquistossomose encefálica pseudotumoral (EEP), constatou que a forma clínica da neuroesquistossomose japônica caracteriza-se por dor de cabeça intensa e persistente (100%), déficit motor (71%), alterações visuais (62%), convulsões (57%), distúrbios mentais (57%), vertigem (43%), alterações sensoriais (38%), alterações de fala (29%), vômito (29%) e ataxia (24%). Apurou-se que na maioria dos casos o início das manifestações clínicas podem surgir entre 1 semana e 2 anos pós-infecção. Alguns autores relacionam a fase e formação do granuloma com a duração e gravidade dos sintomas (FERRARI *et al.*, 2011). Não há relatos na literatura sobre prevalência das manifestações neurológicas relativas à encefalite por esquistossomose mansoni.

Em pesquisa realizada por Hayashi (1979) em um grupo de 71 pacientes com a neuroesquistossomose japônica observou-se que diferentes tipos de convulsões podem ocorrer, sendo a mais frequente a forma jacksoniana (epilepsia focal) seguida da psicomotora, grande mal e neurovegetativa.

É crescente a ocorrência e descrição das afecções encefálicas atribuídas ao *S. mansoni*. Sinais e sintomas clínicos de encefalites agudas, vasculites cerebrais, ventriculites e síndrome meníngea são característicos principalmente na fase aguda (segunda a sexta semana pós-infecção). Lesões como infartos isquêmicos, hemorragias cerebrais e cerebelares, arterites necróticas fibrinóides e hipereosinofilia têm sido associadas na encefalite por esquistossomose mansoni (PITTELLA *et al.*, 1981).

A reação do hospedeiro ao ovo do *S. mansoni* no tecido nervoso inclui sinais prodrômicos de encefalites ou tumores cerebrais. Atualmente adota-se a classificação em 3 formas: (1) aguda, associada a febre, dor de cabeça e alterações comportamentais; (2) convulsiva, com crises focais ou

generalizadas; (3) pseudotumoral, apresenta-se com hipertensão intracraniana e déficits neuromotores. Pesquisas sugerem que a duração dos sintomas clínicos é variável, correlacionando-se com a fase em que o granuloma se encontra: fase necrótico-exudativo (sintomas de curta duração), fase produtiva e fase “cura-por-fibrose” (PITTELLA *et al.*, 1996; FERRARI, 2011; LAMBERTUCCI *et al.*, 2014).

O granuloma característico na neuroesquistossomose mansoni é do tipo epitelióide composto em sua periferia por linfócitos, macrófagos, células gigantes e eosinófilos. Mastócitos e fibroblastos existem em número variável, desempenhando papel importante na fibrose. A necrose tem aspecto granular e acidófilo na fase aguda e parece estar relacionada com ação de fatores eliminados dos grânulos de eosinófilos e macrófagos, fase essa classificada como necrótico-exudativa. Os granulomas epitelióides evoluem para a fase cura-por-fibrose, com produção de citocinas que induzem a síntese de proteínas da matriz extracelular, deposição de colágeno, fibras elásticas e componentes amorfos da matriz extracelular. A fibrose avança progressivamente para o centro do granuloma por causa do desaparecimento, por apoptose, das células epitelióides. Se o agente inflamatório e a necrose não são completamente reabsorvidos, há o encapsulamento por fibrose dessas estruturas. Presença de astrocitose no infiltrado periovular têm sido relatados (PITTELLA *et al.*, 1981, 1985, 1989; CAROD-ARTAL, 2007; FERRARI *et al.*, 2011; VALE *et al.*, 2012; BOGLIOLO, 2013).

Manifestações neurológicas na fase aguda, relacionada ao estágio necrótico-exudativo do granuloma, inicia-se com febre, quadros de meningoencefalite, cefaleia transitória ou intermitente, confusão mental, parestesia, anestesia, convulsões (focal ou generalizada), nistagmo, fraqueza em extremidades, paralisia de nervos cranianos, distúrbios cerebelares diversos, alterações visuais e de fala. A forma crônica (convulsivo e/ou “cicatrização-por-fibrose”) pode apresentar os mesmos sinais e sintomas da fase aguda, porém, o paciente pode desenvolver a clínica típica de tumor com aumento da pressão intracraniana e lesões por efeito de massa, papiledema e hidrocefalia

(PITTELLA *et al.*, 1981; LAMBERTUCCI *et al.*, 2009; ROSS *et al.*, 2012; VALE *et al.*, 2012).

Ovos do *S. mansoni* já foram observados na leptomeninge, córtex cerebral, núcleos da base, plexo coróide, cerebelo e medula espinal, sendo essa última, afetada com maior frequência do que as outras regiões (PITTELLA *et al.*, 1996; SOUSA-PEREIRA, 2006).

Pittella *et al.* (1996) destaca que os ovos do *S. mansoni* alcancem o tecido encefálico ou por embolização sistêmica ou por depósito *in situ*, uma vez que os vermes adultos possam migrar para áreas próximas ao tecido nervoso. O autor destaca que os ovos agrupados, à medida que desenvolvem-se em granulomas, surjam sinais neurológicos de lesões por efeito de massa. Tais sintomas geralmente associam-se ao aumento da pressão intracraniana. O pseudotumor na neuroesquistossomose mansoni é subdiagnosticado e raramente associado ao envolvimento visceral.

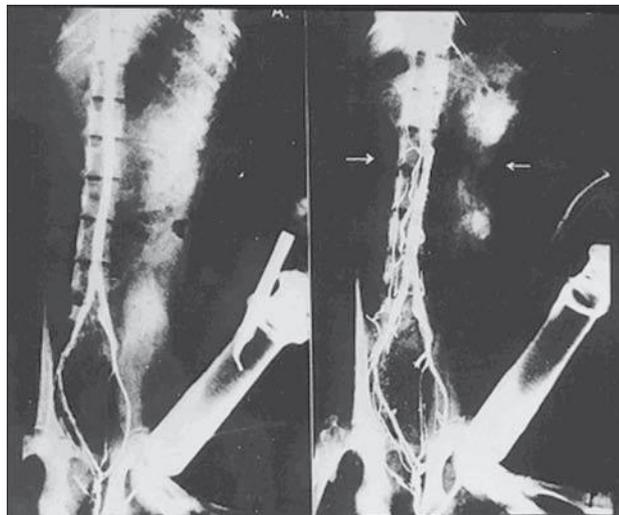
O ingresso do *S. mansoni* e/ou seus ovos no encéfalo não são definidos. Sugere-se que os ovos são embolizados por via arterial após formação de *shunts* ou anastomoses arteriovenosas portopulmonares com o sistema de veias azygus, criados em consequência do aumento de pressão no sistema venoso hepático. Outra hipótese da embolização para o encéfalo seria por alterações do fluxo arterial na pneumopatia esquistossomótica o que explicaria a formação de fístulas arteriovenosas também resultado da hipertensão pulmonar por granulomas da esquistossomose (PITTELLA *et al.*, 1981; LAMBERTUCCI, 2004; FERRARI *et al.*, 2011).

O comprometimento intracraniano também pode ser alcançado pela ampla comunicação do sistema venoso intra-abdominal com o plexo venoso vertebral e subaracnóideo. Como é avalvular, o sangue abdominal pode alcançar os seios venosos intracranianos. Esse plexo foi estudado por Batson, em 1940, ao analisar as vias para as metástases do câncer de próstata. Batson observou que esse plexo é totalmente desprovido de válvulas e comunica o sistema venoso intra-abdominal com o vertebral. Assim, com o aumento da pressão

venosa intra-abdominal, o sangue pode fluir livremente para o plexo venoso vertebral, carregando os ovos e/ou vermes para os vasos aí localizados (MATAS, 2001).

Faust (1948) considera a migração anômala do casal de parasitos para locais próximos do encéfalo, via anastomoses entre veias cerebrais, ou medulares, e o plexo venoso de Batson. Tal comunicação vascular explica presença de vermes em veias leptomeníngicas e justifica depósito de ovos *in situ* e formação local de massa granulomatosa (Figura 3).

Figura 3 - Injeção de contraste iodado na veia dorsal do pênis de macaco *Rhesus*.



À direita, após compressão abdominal, o contraste passa para as veias medulares (Batson, 1940).

Fonte: Lambertucci, 2004.

Sanelli *et al.* (2001), após o estudo de dois pacientes com esquistossomose cerebral e outro com doença medular, confirmados cirurgicamente, sugeriram padrão de imagem à RM que, apesar de não estar presente em todos os casos, quando observado, deve indicar o diagnóstico de esquistossomose do SNC. Ele se caracteriza pela captação central linear de contraste, cercada por múltiplos nódulos puntiformes, chamado de aspecto “arborizado”. Em 1998,

Bennett e Provenzale já haviam descrito captação periférica de contraste com aspecto nodular da medula (citado por LAMBERTUCCI, 2004).

Silva (2007) afirma que a RM é o método mais acurado para revelar anormalidades na medula espinal em praticamente todos os casos da MRE, incluindo casos em que a mielografia e/ou mielotomografia não revelam alterações. As principais alterações descritas na ressonância magnética são: aumento do diâmetro da medula espinal e/ou de raízes da cauda eqüina nas imagens ponderadas em T1; hiperintensidade do sinal em T2 na região acometida, representando aumento do conteúdo de água (edema); e captação heterogênea de contraste (eventualmente homogênea) devido à quebra da barreira hematoencefálica, com pequenas áreas focais de acentuação mais intensa formando frequentemente padrão granular.

Em estudo prospectivo, entre os anos de 2000 a 2005, realizado por Liu *et al.* (2008) em 2 hospitais de Anhui, província de Shanghai, China, estudaram 33 casos de neuroesquistossomose cerebral japônica cujo diagnóstico foi ressaltado pela análise da RM. Em onze casos, além da RM, a infecção foi confirmada pela histologia do tecido cerebral e em 9 casos, realizou-se sorologia e exame parasitológico de fezes (EPF). Estudo das imagens de RM acusaram lesões focais em 20 pacientes e lesões múltiplas disseminadas pelo encéfalo em 13 pacientes. As lesões cerebrais foram exibidas nas ponderações T1 e T2, associados a edema vasogênico periovular e efeito de massa. Após administração de contraste, as lesões apresentaram padrão nodular agrupados em uma grande massa.

Na esquistossomose mansonii encefálica a RM acusa lesões por tumor não específico com borda irregular e pouco definido, envolto por edema e associado a efeito de massa (PITTELLA *et al.*, 1996; FERRARI *et al.*, 2011; VALE *et al.*, 2012).

Estudos experimentais sobre neuroesquistossomose são escassos. Há necessidade de investigar os mecanismos das alterações morfológicas,

manifestações neurológicas observadas e definir a reação imunológica e patogênese da inflamação.

A descoberta do casal de *S. haematobium* em um ramo da veia oftálmica superior e de um macho adulto na veia média cerebral em um macaco experimentalmente infectado, comprova a evidencia de migração de vermes adultos para áreas anômalas (FAUST, 1948).

Den Noort *et al.* (1970) realizaram estudo experimental em 20 primatas *Cercopithecus aethiop* para investigar infecção cerebral pelo *S. japonicum*. Três animais, cuja inoculação de solução salina com cerca de 100 mil ovos de *S. japonicum* foi pela artéria carótida esquerda, apresentaram sinais neurológicos como descerebração, hemiparesia e hemianopsia. A histologia do tecido cerebral confirmou ovos e granulomas, porém em um caso, não houve reação granulomatosa.

Experimento realizado por Wang *et al.* (2011) em 60 coelhos *New zealand*, inoculação de 1mL de solução salina com ovos mortos de *S. japonicum* (1 mg/mL) no seio sagital superior de cada animal. Resultados obtidos revelaram astrocitose, eosinófilos, neutrófilos e processo de cicatrização por fibrose. As manifestações neurológicas ocorreram em 12 animais e incluíram convulsões parciais e generalizadas e paralisia. Apesar do resultado satisfatório, o processo de injeção, via tecal ou por vasos sanguíneos, de soluções com ovos de *Schistosoma spp.* exige habilidade cirúrgica de alta complexidade do pesquisador, afim de evitar erros de procedimento como lesão do tecido nervoso e morte do animal. Eltoun (1995) relata que a resposta antigênica do organismo aos ovos de *Schistosoma spp.* injetados artificialmente produz discreta reação inflamatória, pois há perda de antígenos durante o processo de isolamento dos ovos.

2.4 Neuroesquistossomose mansoni experimental

O desenvolvimento de modelo experimental da neuroesquistossomose mansoni constitui avanço singular, em ampla esfera, como estudos dos

granulomas em várias fases da doença, identificação de mediadores da inflamação (quimiocinas e citocinas) e estudo de marcadores diagnósticos no líquido.

Aloe *et al.* (1996) utilizaram 15 camundongos albinos fêmeas *CD-1* infectados via percutânea com 60 cercárias (cepas de Porto Rico) de *S. mansoni* para encontrar ovos e granulomas no SNC. Quinze e vinte semanas pós-infecção, identificaram ovos viáveis de *S. mansoni* e granulomas (constituídos por eosinófilos, mastócitos e basófilos) no hipocampo, cerebelo, tronco cerebral e córtex cerebral em 10 camundongos. Testes de sensibilidade térmica (*hot plate test*) acusaram hiperalgesia dolorosa nas patas dos animais infectados (ALOE *et al.*, 1994, 1996, 1997, 1998; FIORE *et al.*, 1996, 2001, 2002). No estudo, não mencionaram quantos animais apresentaram sensibilidade alterada e também a correlação entre sinais clínicos e locais das lesões encefálicas.

Experimento realizado por Fiori *et al.* (1997) investigou sensibilidade à dor e comportamento exploratório de camundongos fêmeas *CD-1* desprovidos da glândula salivar, infectados com 60 cercárias de *S. mansoni*, via percutânea. Os animais foram estudados até a 15ª semana pós-infecção. A histologia comprovou granulomas no encéfalo dos camundongos infectados. Adicionalmente, os animais infectados-sialectomizados apresentaram redução da atividade locomotora enquanto seu grupo controle, camundongos infectados, exibiram redução da atividade locomotora e hiperalgesia dolorosa nas patas. A topografia das lesões, número de animais com granulomas e descrição dos granulomas não foram mencionados.

Carvalho *et al.* (2017) inocularam suspensão de 20 µL com ovos de *S. mansoni* (concentração: 25.000 ovos/mL) no espaço subaracnoideo da medula espinal em 25 ratos *Wistar* machos. Aos 20 dias pós-infecção observaram-se alterações de força muscular, sensibilidade térmica e reflexo mecânico bilateralmente das patas nos animais (n=5). À histologia, encontraram ovos na comissura anterior da medula espinal nos segmentos T10-L5, porém sem reação granulomatosa. No estudo da esquistossomose mansoni, os animais classicamente utilizados têm sido os camundongos por permitirem a

reprodução da infecção de forma regular e característica como ocorre no homem, particularmente no que se refere à reprodução da fibrose hepática esquistossomótica (CRAM & BOZICEVICH, 1914; CRAM & FILES, 1947; MACHADO E SILVA *et al.*, 1991; KATZ, 2005) (DE WITT& WARREN, 1959; ANDRADE & WARREN, 1964; CHEEVER, 1965; WARREN, 1966; ANDRADE, 1987; MACHADO E SILVA *et al.*, 1991; ANDRADE & CHEEVER, 1993; HENDERSON *et al.*, 1993; COUTINHO *et al.*, 1997, 2002; KATZ, 2005).

Silva *et al.* (2002) escolheram 3 diferentes linhagens de camundongos para pesquisar ovos de *S. mansoni*, por digestão do encéfalo com hidróxido de potássio (KOH) a 4%. Todos os animais foram infectados via transcutânea. Vinte camundongos *Swiss*, de ambos os sexos, foram infectados com 30 ou 50 cercárias e apenas 1 animal apresentou ovos no encéfalo. Vinte e quatro camundongos *Balb/C*, de ambos os sexos, foram infectados com cerca de 105 cercárias e em 4 casos encontraram ovos do parasito. Doze camundongos *C57*, também de ambos os sexos, foram infectados com total de 30 cercárias e em 2 casos foram encontrados ovos de *S. mansoni*. Os autores consideraram que o número de ovos encontrados em cada encéfalo foi inexpressivo para causar danos no tecido nervoso e concluíram que o modelo murino é inapropriado para o estudo da neuroesquistossomose.

Essa pesquisa visa estabelecer a topografia das lesões encefálicas e suas relações com sinais neurológicos atribuídas à neuroinfecção por *S. mansoni* apresentadas pelos camundongos infectados via subcutânea.

Tal modelo possibilitará identificar as vias de ingresso no SNC dos ovos ou casal de parasitos, o tempo pós-infecção para surgimento das alterações neuromotoras, a lesão histológica envolvida e localizar os granulomas formados.

Desse modo, alterações neuromotoras apresentadas pelos animais infectados podem caracterizar danos neurológicos causados pelos ovos de *S. mansoni*, e o modelo murino pode contribuir no desenvolvimento e prolongamento de pesquisas relacionadas à neuroesquistossomose mansoni em humanos.

OBJETIVOS

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Descrever modelo de neuroesquistossomose experimental em camundongos: avaliar as manifestações neurológicas, os aspectos histológicos e a ressonância magnética do encéfalo.

3.2 Objetivos específicos

3.2.1 Caracterizar as manifestações neurológicas e sua relação com o *loci* das lesões;

3.2.2 Identificar a topografia e a lesão granulomatosa;

3.2.3 Descrever as alterações histológicas da lesão;

3.2.4 Descrever as alterações na ressonância magnética do encéfalo.

METODOLOGIA

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Delineamento do estudo

Trata-se de estudo experimental descritivo para investigar os aspectos morfológicos, sinais neurológicos, histológicos e alterações de imagem de ressonância magnética no encéfalo de camundongos infectados pelo *Schistosoma mansoni*.

4.2 Animais e parasitos

Camundongos *Mus musculus* da linhagem *Swiss Webster*, machos, com mais ou menos quatro semanas de idade, pesando de 18 a 20 gramas, nascidos e mantidos no biotério do Instituto René Rachou (BIOTEXIRR) foram utilizados nos experimentos. O Instituto possui certificado de qualidade em biossegurança nível 2 (CQB nº 2), isento de ruídos, com controle de temperatura entre 18 e 22°C, ciclo de luz 12 horas claro/12 horas escuro, alimentados com ração e água *ad libitum*.

Cinquenta camundongos utilizados foram divididos em dois grupos. Vinte e cinco (Grupo 1) foram infectados, por via subcutânea, com 50 cercárias da cepa LE e 25 (Grupo 2) foram mantidos como controles (não infectados).

A cepa LE de *S. mansoni* é mantida rotineiramente no Moluscário Lobato Paraense do CPqRR por mais de 40 anos usando o ciclo *B. glabrata* → camundongo → *B. glabrata* (Pelegriño & Katz 1968).

Para que a infecção dos camundongos fosse homogênea e balanceada, alguns aspectos foram seguidos: inocularam-se as cercárias nos animais, no máximo 3 horas após a liberação pelos caramujos. O volume final da suspensão de cercárias, em água desclorada, se deu entre 50 e 100 ml e o volume injetado situou-se em 0,3 ml. Cada camundongo sofreu inoculação no dorso, por via subcutânea, segundo a técnica descrita por Pellegrino & Katz (1968) com 50 (± 10) cercárias da cepa LE (POP-MOL 06, infecção de animais com cercárias de *S. mansoni*). A infecção foi realizada utilizando uma seringa de aço-inox de

10mL (B-D CORNWALL; Becton.Dickson&Co) com volume ajustável. A agulha para injeção foi do tipo hipodérmica SOLIDOR 25X8 (21GX1"). A homogeneização deu-se em frasco de Becker (100 ml) por placa de silicone fenestrada (4,2 cm de diâmetro).

Nesse projeto, conforme Procedimento Operacional Padrão-Moluscário (POP-MOL 06, infecção de animais com cercárias de *S. mansoni*), a via utilizada foi a subcutânea, por ser método de fácil realização, seguindo-se o delineamento experimental, evitando que várias repetições tenham sido realizadas.

Planejou-se o acompanhamento dos camundongos por até 160 dias após a infecção. A eutanásia dos animais dos Grupos 1 e 2 se deram nos dias 87, 96 e 145.

4.3 Recuperação de helmintos

A perfusão foi realizada seguindo-se a técnica descrita por Pellegrino & Siqueira (1956), resumidamente: o conteúdo visceral foi exposto; fígado e mesentério separados pela ligadura da veia renal e a veia porta foi seccionada. Com o auxílio de uma agulha, acoplada a um pipetador automático (Brewer), solução salina 0,85% heparinizada foi injetada na aorta descendente, permitindo, assim, a perfusão do sistema porta e das veias mesentéricas, recuperando-se os vermes presentes. Adicionalmente foi realizada a perfusão do fígado através da injeção de salina 0,85%, heparinizada, no hilo hepático. Os vermes foram coletados em placas de Petri, contados e separados em macho, fêmea e acasalados com auxílio de lupa.

4.4 Monitoramento clínico

Para o monitoramento dos sinais neurológicos foi utilizado o protocolo SHIRPA (SmithKline Beecham Pharmaceuticals; Harwell, MRC Mouse Genome Center and Mammalian Genetics Unit; Imperial College School of Medicine at St Mary's; Royal London Hospital, St Bartholomew's and the Royal London School of Medicine; Phenotype Assessment/2014) modificado, para avaliar os seguintes parâmetros: torção cervical, torção do tronco, reação de fuga,

paresia, reflexo de endireitamento (equilíbrio), tônus muscular, força de agarrar, ataxia, atividade locomotora, rotação do animal erguido pela cauda (*tail suspension/spinning*), isolamento do grupo e piloereção (Anexo I).

Os animais foram observados 8 horas/dia (9 h às 17 h), a cada 60 min., seis dias por semana.

4.5 Preparo do encéfalo para ressonância magnética

A eutanásia dos animais deu-se com uso de câmara de gás, conectada a uma fonte de CO₂. Após confirmada a morte do animal, seguiu-se o procedimento de fixação em formol do encéfalo do animal, seguindo as recomendações do Centro Nacional de Biologia Estrutural e de Bioimagem – Universidade Federal do Rio de Janeiro (CENABIO-UFRJ), cuja conduta obedece a seguinte ordem:

1. Eutanásia do animal;
2. Dissecagem da aorta descendente;
3. Clampeamento da aorta descendente;
4. Incisão do ventrículo esquerdo;
5. Injeção de formol a 10 %, via ventrículo direito com uso de seringa de insulina (agulha de 13x 0,45 mm e volume de 1 ml);
6. Decaptação e retirada dos tecidos moles;
7. Armazenamento da cabeça do camundongo em tubo *Falcon* a 15 ml com formol a 10%.

4.6 Ressonância magnética

As aquisições de imagens dos camundongos *ex-vivo* foram realizadas no CENABIO-UFRJ) em um sistema de ressonância magnética 7.0 Tesla (Varian 7T scanner, 210 mm horizontal bore/Agilent Technologies, Palo Alto, CA, EUA). No protocolo foi realizada a sequência multi echo (mems) no plano coronal

(TR= 3000 ms; TE = 9 ms; 3 ecos; matriz = 128 x 128; FOV= 15 mm²; espessura de corte = 0.5 mm; NEX = 30; 30 cortes sem intervalos e tempo de aquisição= 3h 12') e a sequência gradiente eco 3D com ponderação em T1 (TR= 370 ms; TE= 5 ms; FA = 35°; matriz= 128 x 96 x 96; FOV= 20 x 15 x 15 mm; espessura de corte = 0,15 mm; NEX = 13 e tempo de aquisição= 12h18').

Foram estabelecidos protocolos de aquisição de imagens anatômicas de alta resolução, multiplanares e volumétricos em ponderação T1 para a obtenção de informações anatômicas detalhadas nos planos axial, coronal e sagital.

O software versão MRlcron 2MAY2016 64bit BSD License utilizado para visualização das imagens.

Nos três animais infectados que apresentaram sinais neurológicos e seus respectivos controles (sem sinais), foram realizadas as imagens de RM.

4.7 Estudo histológico

Após aquisição das imagens de RM, utilizou-se tinta nanquim verde-bandeira Acrilex® para colorir o lado direito do crânio e identificar o hemisfério cerebral direito nos cortes histológicos. A fixação da tinta deu-se com imersão da cabeça em solução de ácido acético a 4,2% durante cinco minutos.

As peças anatômicas (cabeças dos camundongos) foram colocadas em solução de ácido nítrico a 7% para descalcificação dos ossos do crânio.

O processo de descalcificação iniciou-se com a imersão da peça inteira em solução de ácido nítrico a 7% por 24 horas. Após esse tempo, a peça foi cortada com navalha em fragmentos coronais, no sentido fronto-occipital, com intervalos de 2 mm de espessura. Em seguida, os fragmentos foram inseridos em cassetes com a identificação sequencial dos cortes, e recolocados na solução de ácido nítrico a 7% por mais 24 horas, para completa descalcificação.

Após descalcificação, todos os fragmentos obtidos foram emblocados em parafina utilizando-se o processador automático de tecidos da marca LUPE, modelo PT MONO 2000. Realizou-se cortes semi-seriados de 4 μ m de espessura, separados a cada 50 μ m por toda extensão do encéfalo, em micrótomo (modelo Spencer 820). Os cortes foram corados com hematoxilina e eosina (HE). Em cada lâmina, reuniram-se seis cortes escalonados do encéfalo para análise, totalizando média de 70 lâminas (420 cortes) por animal (Figura 4). Nos três animais infectados que apresentaram sinais neurológicos e seus respectivos controles (sem sinais), foram realizadas as análises histológicas.

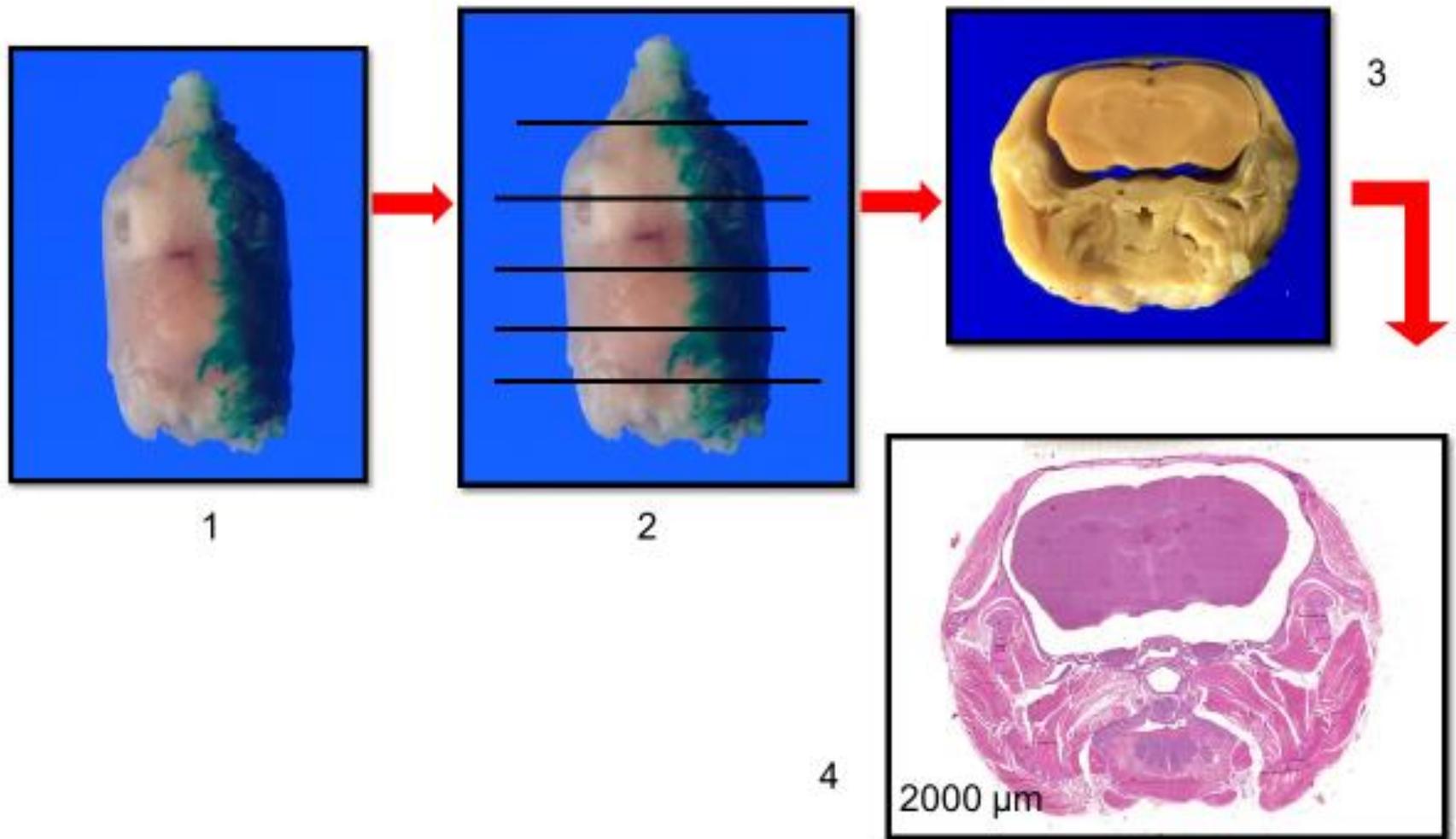


Figura 4 – Sequenciamento histológico: 1. Coloração do hemisfério direito; 2. Cortes coronais semi-seriados do crânio, separados a cada 2mm de espessura; 3. Cortes com 2 mm de espessura para emblocamento; 4. Cortes de 4μ de espessura corados com HE. Fonte: autor, 2018.

Ao microscópio de luz, examinaram-se as lâminas para pesquisa de ovos de *S. mansoni*, de granulomas e de outras lesões inflamatórias. Descreveram-se os principais achados histológicos e sua topografia no encéfalo.

4.8 Topografia cerebral

No atlas eletrônico identificaram-se os locais de deposição dos ovos e granulomas no encéfalo (<http://mouse.brain-map.org/static/atlas>).

4.9 Análise estatística

Para avaliar associação entre o grupo Caso e Controle foi utilizado o teste exato de Fisher. Análises foram realizadas no software STATA (Stata Corporation, College Station, Texas) versão 12.0 considerando um nível de 5% de significância.

4.10 Considerações éticas

O projeto foi submetido à Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Instituto de Pesquisas René Rachou/FIOCRUZ/MG e da Universidade Federal de Minas Gerais, sendo aprovada sua execução de acordo ao disposto na lei 11794/08, que dispõe sobre o uso científico no uso de animais, inclusive, aos princípios da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL). Protocolo CEUA/FIOCRUZ: LW-54/14. Protocolo CEUA/UFMG: 377/2014.

Fluxograma

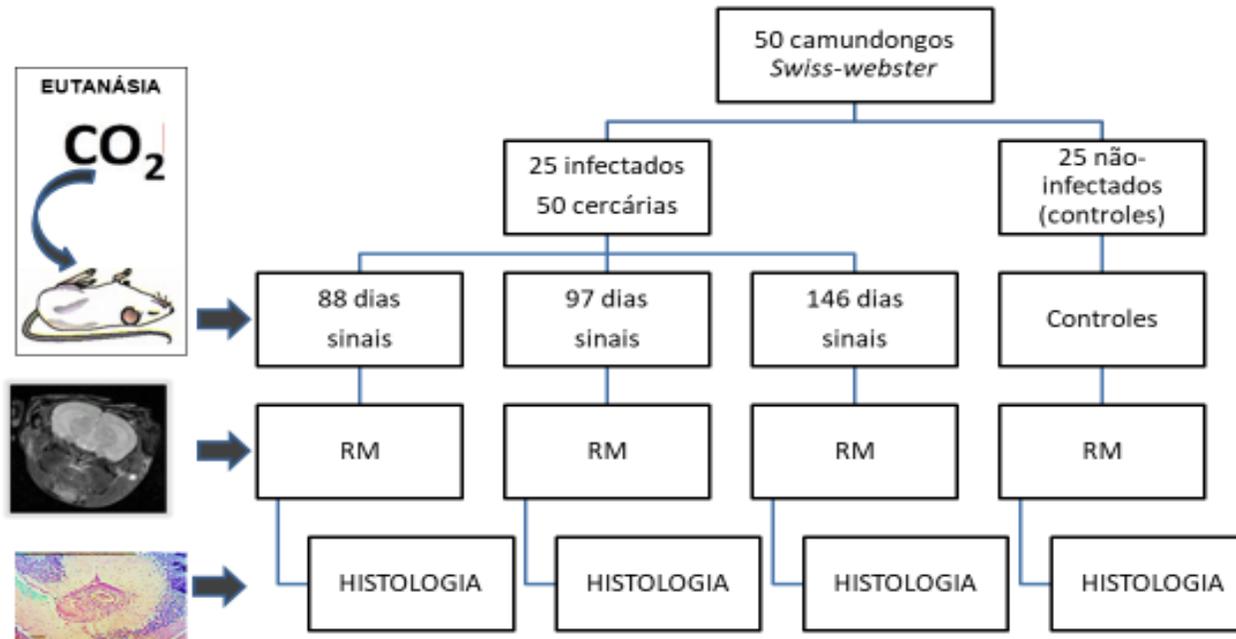


Figura 5 – Fluxograma do estudo.
Fonte: autor, 2018.

RESULTADOS

5 RESULTADOS

Vinte e cinco camundongos *Mus musculos* – *Swiss Webster* machos, com mais ou menos quatro semanas de idade, pesando entre 18 a 20 gramas, foram infectados com 50 cercárias da cepa LE de *S. mansoni*, por via subcutânea, e vinte e cinco camundongos controles não foram infectados. Dos infectados, 3 animais (12%) apresentaram sinais neuromotores sugestivos de lesão neurológica. As manifestações neurológicas foram atribuídas à neuroesquistossomose.

5.1 Avaliação do comportamento animal: manifestações neurológicas

Os animais foram observados a partir de 45 dias pós-infecção pelo período de 160 dias. Nesse tempo, 3 camundongos (12%) apresentaram manifestações neurológicas. O primeiro animal sintomático foi sacrificado aos 88 dias pós-infecção, o segundo aos 97 dias e o terceiro aos 146 dias. Os animais controle, não infectados, não apresentaram alterações motoras.

Os sinais neurológicos catalogados incluíram *spinning*, hemiparesia (à direita e esquerda), torção de cabeça (à direita e esquerda), torção de tronco à direita, ataxia e desequilíbrio (Tabela 1) (Figura 6).

Tabela 1 – Avaliação das manifestações neurológicas de três camundongos infectados com 50 cercárias pela via subcutânea e 25 não infectados, realizados no laboratório de esquistossomose/FIOCRUZ/MG, no período de julho/2016 a janeiro/2017

MANIFESTAÇÕES NEUROLÓGICAS	Caso		Controle		p
	n	%	n	%	
<i>Spinning</i>	3	12,0	0	0,0	0,235
Torção de cabeça à direita	2	8,0	0	0,0	0,490
Torção de cabeça à esquerda	1	4,0	0	0,0	0,999
Torção de tronco à direita	2	8,0	0	0,0	0,490
Hemiparesia à direita	1	4,0	0	0,0	0,999
Hemiparesia à esquerda	2	8,0	0	0,0	0,490
Ataxia	3	12,0	0	0,0	0,235
Desequilíbrio	3	12,0%	0	0,0	0,235

Fonte: autor, 2018.

5.2 Avaliação do encéfalo pelo uso da RM

As imagens de RM mostraram alterações no encéfalo em 3 animais sintomáticos. As lesões apresentaram-se como núcleos hiperdensos rodeados por sinal hipodenso nas imagens ponderadas em T1. As lesões nos encéfalos acusadas pela RM dos animais sintomáticos corroboraram com sua histologia (Figura 8).

Tais imagens acusaram depósitos de ferro (Fe), sugerindo focos hemorrágicos, cujas análises histológicas confirmaram presença de hemácias.

Os achados supracitados foram categorizados como alterações que eventualmente poderiam estar relacionados à esquistossomose (Tabela 2).

Nos animais controle, não houveram alterações nas imagens.

Tabela 2 - Topografia das lesões encefálicas, pela ressonância magnética de três camundongos infectados com 50 cercárias pela via subcutânea, atribuídas aos ovos do *S. mansoni*, realizada no CENABIO/UFRJ, 2016 – 2017.

TOPOGRAFIA	Caso		Controle		p
	n	%	n	%	
Lobo límbico	2	8,0	0	0,0	0,490
Área sensório-motora do córtex cerebral	3	12,0	0	0,0	0,235
Área visual do córtex cerebral	2	8,0	0	0,0	0,490
Área auditiva do córtex cerebral	1	4,0	0	0,0	0,999
Fissuras do córtex cerebelar	2	8,0	0	0,0	0,490
Tronco encefálico	2	8,0	0	0,0	0,490
III Ventrículo	1	4,0	0	0,0	0,999
IV Ventrículo	1	4,0	0	0,0	0,999

Fonte: autor, 2018.

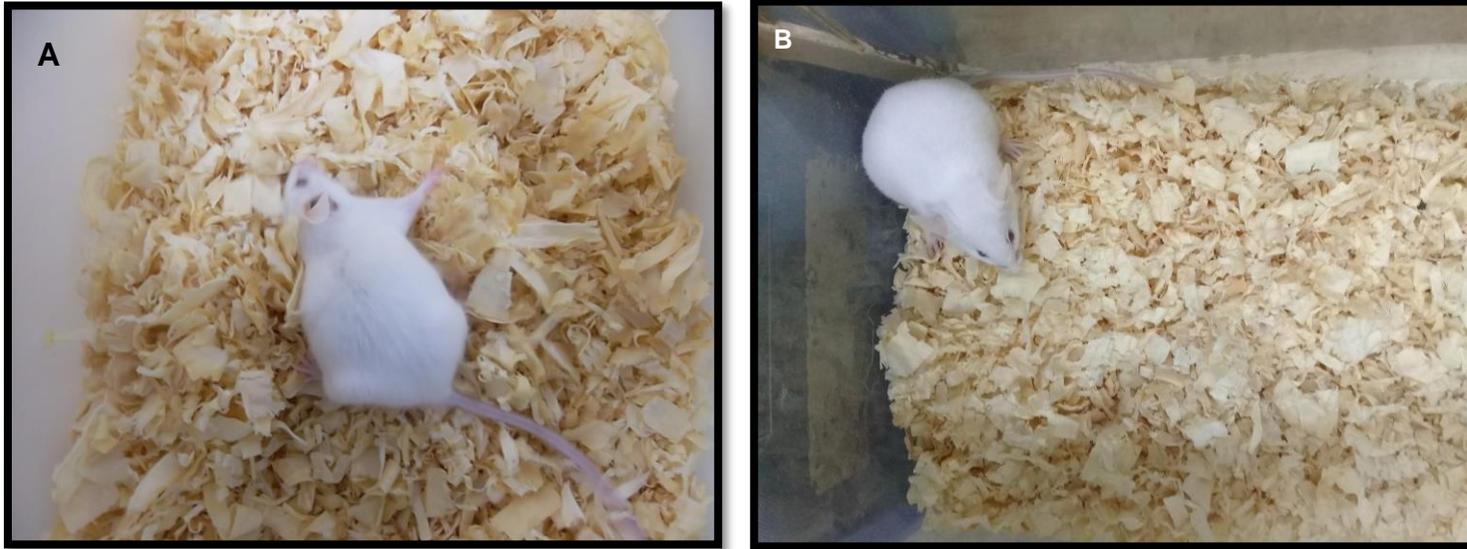
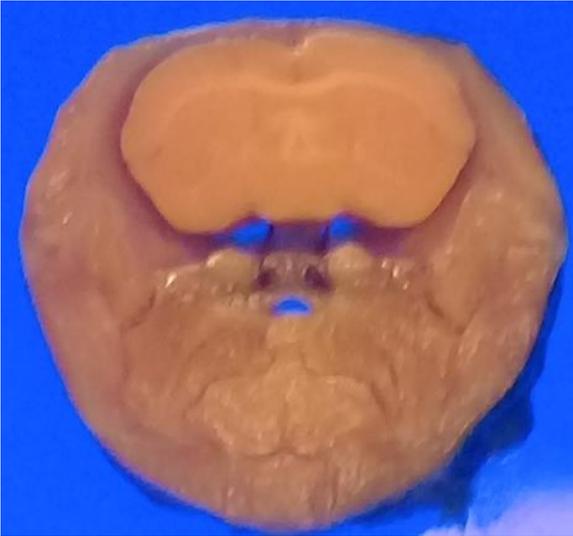


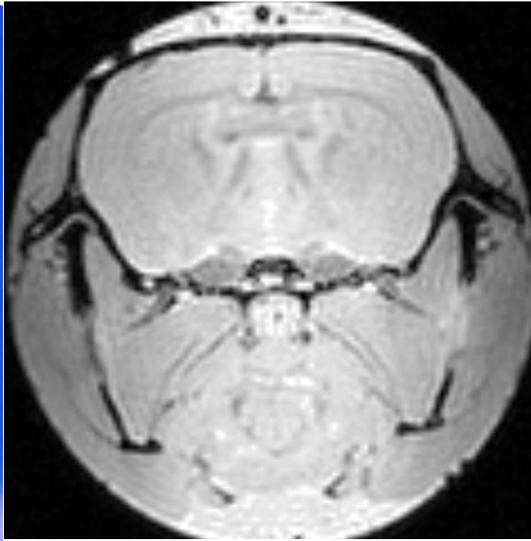
Figura 6 - A. Camundongo *Swiss Webster* infectado com cercárias de *S. mansoni*, animal mostra torção cervical e do tronco à esquerda. B. animal não-infectado (controle), mostrando postura habitual.

Fonte: autor, 2018.

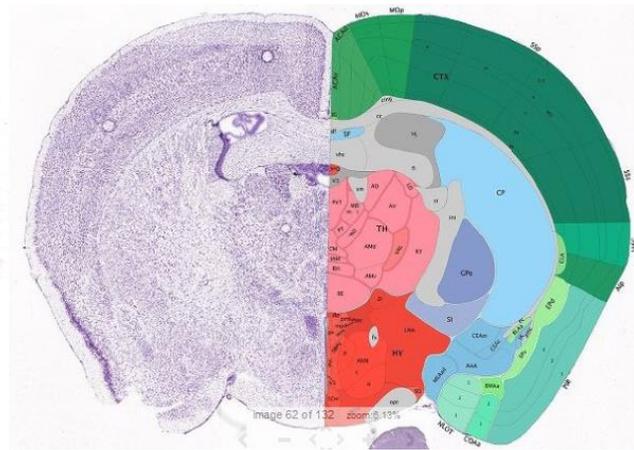
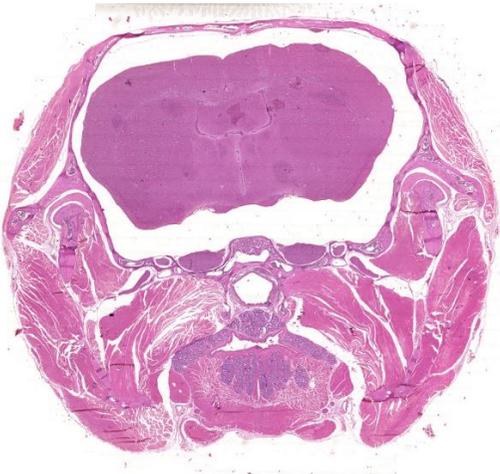
A



B



C



D

Figura 7 – Representações dos cortes coronais:

A. Segmento *in totum*; B. Imagem de RM; C. Corte histológico com HE; D. Atlas anatômico.

Fonte: autor, 2018.

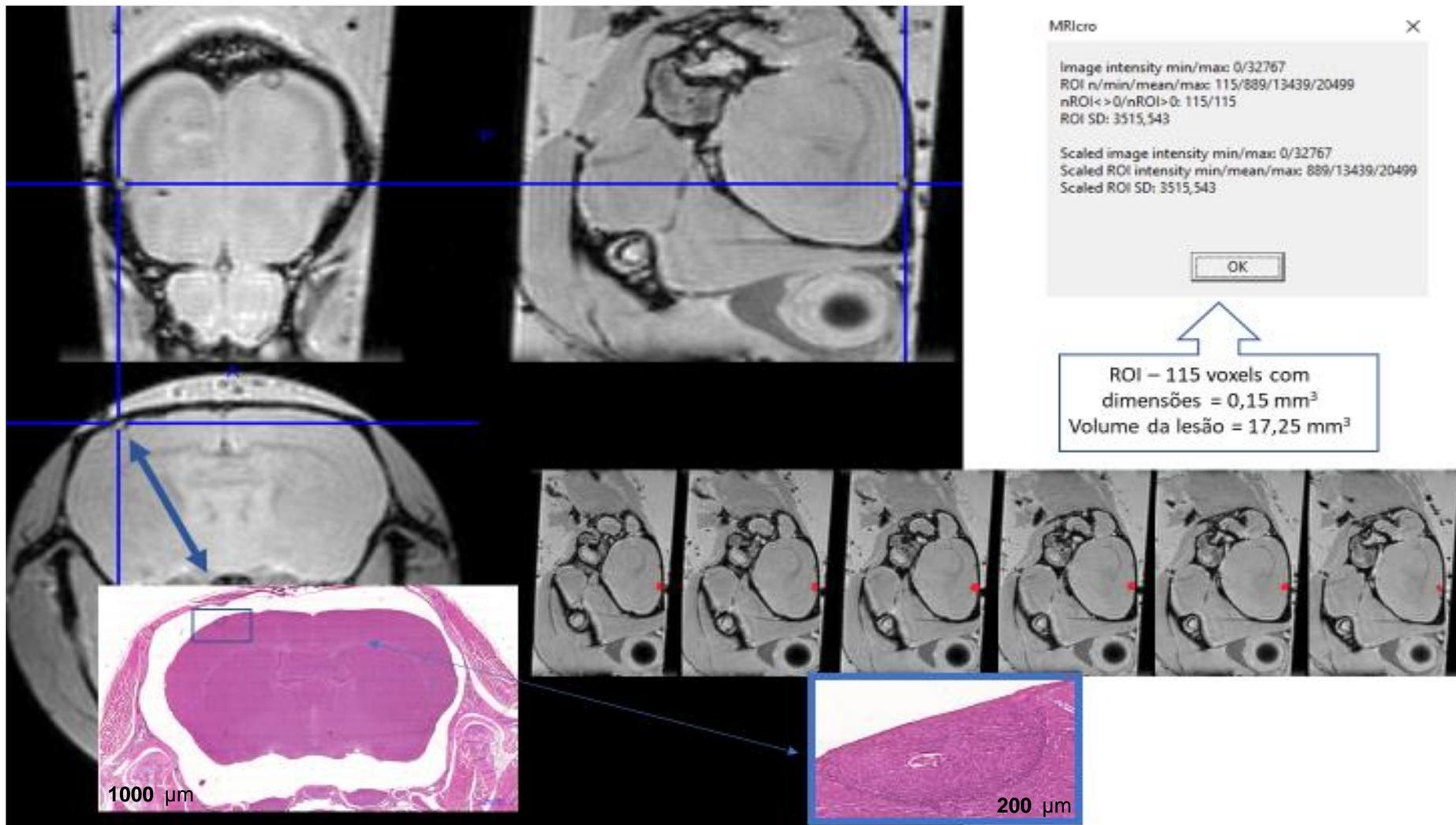


Figura 8 – Reconstrução multiplanar de RM do encéfalo de camundongo imageado com 97 dias de infecção. Destaca-se nos três planos à intersecção das retas azuis, uma região de hiposinal em T1 condizente com lesão hemorrágica confirmada pela histologia desse tecido.

Fonte: autor, 2018.

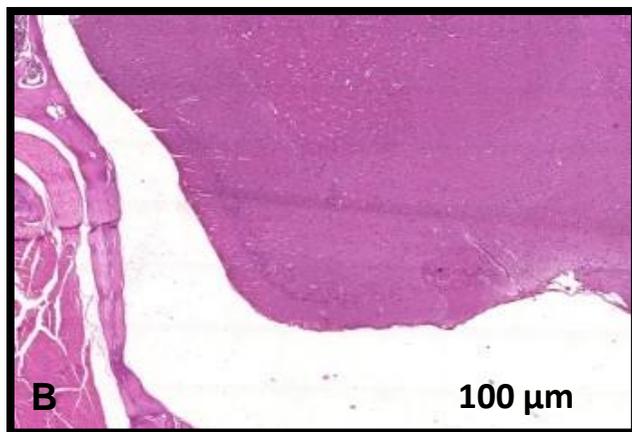
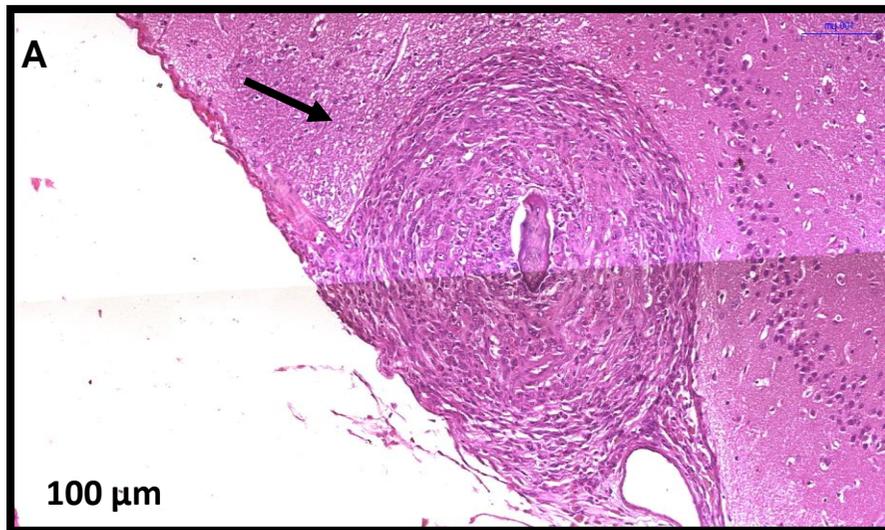


Figura 9 – A. Granuloma esquistossomótico na leptomeninge do lobo límbico (área do córtex do piriforme), com moderada fibrose. A seta acusa espessamento meníngeo do parênquima cerebral.

B. mesma região do animal controle (sem alterações morfológicas).

Fonte: autor, 2018.

5.3 Topografia das lesões encefálicas

Foram identificados ovos e granulomas nos hemisférios cerebrais direito e esquerdo, em áreas da leptomeninge e parênquima cerebral, especificamente regiões sensório-motoras, visuais e auditivas do córtex cerebral, nas fissuras dos lobos anterior e posterior do cerebelo, no trato olfatório, no III e IV ventrículos, no lobo límbico e no tronco cerebral dos animais com manifestações neurológicas (Tabela 3) (Figura 9). Seus respectivos controles, não apresentaram lesões.

Tabela 3 - Topografia das lesões encefálicas atribuídas aos ovos do *S. mansoni*, de três camundongos infectados com 50 cercárias pela via subcutânea realizada na Faculdade de Medicina/UFMG, 2016 – 2017.

TOPOGRAFIA	Caso		Controle		p
	n	%	n	%	
Trato olfatório	2	8,0	0	0,0	0,490
Lobo límbico	3	12,0	0	0,0	0,235
Área sensório-motora do córtex cerebral	3	12,0	0	0,0	0,235
Área visual do córtex cerebral	2	8,0	0	0,0	0,490
Área auditiva do córtex cerebral	1	4,0	0	0,0	0,999
Fissuras do córtex cerebelar	2	8,0	0	0,0	0,490
Tronco encefálico	2	8,0	0	0,0	0,490
III Ventrículo	1	4,0	0	0,0	0,999
IV Ventrículo	2	8,0	0	0,0	0,490

Fonte: autor, 2018.

5.4. Avaliação histológica

Foram encontrados ovos de *S. mansoni* disseminados nos hemisférios cerebrais direito e esquerdo, em regiões da leptomeninge e parênquimas cerebral e cerebelares e tronco cerebral. Nas amostras, frequentemente encontraram-se ovos subsequentes a arteríolas.

Ovos envolvidos por infiltrado granulomatoso epitelióide foram mais frequentes na leptomeninge, em fissuras e em ventrículo, tanto no cérebro quanto no cerebelo. Ovos de *S. mansoni* com pouca reação inflamatória, foram mais comuns nos parênquimas cerebral e cerebelar. Edema e áreas de necrose periovular foram constatados. Nos ovos observaram-se o miracídio, comprovando recente deposição no encéfalo (Figuras 8 e 9).

As células do exsudato inflamatório estão formadas por macrófagos, células gigantes, eosinófilos e linfócitos. Fibroblastos e áreas com depósitos de colágeno também estão presentes nas análises dos animais (Figura 9).

DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

Os camundongos *Swiss Webster* infectados via subcutânea com 50 cercárias da cepa LE de *S. mansoni* apresentaram as seguintes manifestações neurológicas: *spinning*, hemiparesia (à direita ou esquerda), torção cervical e de tronco (à direita ou esquerda), ataxia e perda de equilíbrio. As imagens de RM acusaram alterações na morfologia do encéfalo com núcleo hiperdenso rodeado por sinal hipodenso bilateral não simétrico na ponderação em T1. Tais resultados corroboram com os locais de lesões confirmados pela histologia. Foram encontrados ovos de *S. mansoni* disseminados nos hemisférios cerebrais direito e esquerdo, em regiões do trato olfatório, lobo límbico, áreas sensório-motora, visual e auditiva do córtex cerebral, fissuras do córtex anterior e posterior do cerebelo, tronco encefálico, III e IV ventrículos. Nas amostras estudadas encontraram-se ovos viáveis de *S. mansoni* em áreas adjacentes às arteríolas e hemácias. Os ovos estão circundados por eosinófilos, macrófagos, células gigantes e linfócitos, o que caracteriza o granuloma.

Essa é a primeira descrição sobre a relação entre lesões encefálicas e sinais neurológicos no modelo murino *Swiss Webster* infectado via subcutânea com cercárias de *S. mansoni*.

Estudo desenvolvido por Andrade *et al.* (2002) concluiu que o modelo experimental em camundongos *Swiss Webster* não é adequado para o estudo da neuroesquistossomose mansoni, embora o modelo murino seria muito bom para o estudo sistêmico da esquistossomose mansoni.

No presente estudo os animais foram observados a partir do 45º dia pós-infecção pelo período de 160 dias. Nesse tempo, 3 camundongos (12%) apresentaram manifestações neurológicas sugestivas de lesão encefálica. O primeiro animal sintomático foi sacrificado aos 88 dias pós-infecção, o segundo aos 97 dias e o terceiro aos 146 dias. Os animais controles dos respectivos sintomáticos, não apresentaram alterações motoras.

Em nosso estudo, identificamos nos animais infectados manifestações neurológicas como *spinning*, hemiparesia (à direita ou esquerda), torção cervical e/ou de tronco (à direita ou esquerda), ataxia e perda de equilíbrio.

As avaliações das funções neuromotoras são elementos comuns ao exame neurológico veterinário de animais de pequeno porte. Os testes aplicados em nosso estudo direcionaram avaliar o desempenho neuromotor, a função espinocerebelar, as funções do músculo estriado e das áreas do neurônio motor. Deste modo, as observações do comportamento animal caracterizaram a integridade funcional do encéfalo como também as vias neuromusculares dos neurônios motores. Dessa forma a aplicabilidade dos testes ressaltou as funções, advindas de simples observações de sinais para as correspondentes ações das integridades neuromotoras (PINTO *et al.*, 2013).

O protocolo SHIRPA é ferramenta qualitativa e baseada em gradações por escores para rastreamento de funções neurológicas básicas, com diferentes graus de complexidade e especialização, de forma a padronizar o comportamento do animal (PINTO *et al.*, 2013). Tal protocolo integra as funções relacionadas ao músculo estriado esquelético, aos sistemas sensoriais, ao neurônio motor, ao sistema autonômico e às vias espinocerebelares. Em nosso estudo as manifestações neurológicas observadas condizem com alterações características de danos funcionais no SNC. Não há registro na literatura que correlacionem os sinais neurológicos com lesões causadas pela neuroesquistossomose mansoni em modelos murinos.

Nossa pesquisa histo-topográfica do encéfalo identificou ovos e granulomas de *S. mansoni* disseminados nos hemisférios cerebrais direito e esquerdo, em áreas da leptomeninge e parênquima cerebral, especificamente regiões sensório-motoras, visuais e auditivas do córtex cerebral, nas fissuras dos lobos anterior e posterior do cerebelo, no trato olfatório, no III e IV ventrículos, no lobo límbico e no tronco cerebral.

Aloe *et al.* (1996, 2001) relataram que as alterações sensitivas (hiperalgesia) presentes nas patas dos camundongos estudados em suas pesquisas foram atribuídas aos níveis aumentados das moléculas do Fator de Crescimento do Nervo (FCN) no córtex cerebral. Fiore *et al.* (1996, 1997) alegaram que alterações motoras e comportamentais em camundongos com granulomas cerebrais estão associadas à ascite e à astenia, típica em pacientes e camundongos com esquistossomose hepatoesplênica.

Nossos achados mostram danos causados por ovos e granulomas no trato olfatório dos roedores, especificamente nas camadas glomerular e plexiforme externa do bulbo

olfatório. O trato olfatório é responsável pela percepção e identificação de odores. Nos roedores, o olfato também é responsável pela investigação olfatória, ato exploratório do ambiente que o animal está inserido. Lesões nessa região podem causar distúrbios referentes ao comportamento exploratório dos animais (RESBCAL, 2014).

Fiore *et al.* (1996, 1997) explicam que os sucessivos testes que cada animal das suas pesquisas foi submetido, causaram quadros de estresse que desencadearam déficits no ato da investigação olfatória.

As análises das imagens obtidas pela RM apontaram sinais de núcleo hiperdenso envoltos por sinal hipodense nas áreas em que a histologia identificou granulomas no parênquima e leptomeninge do cérebro e cerebelo por toda extensão do encéfalo. Presença de hipersinal e focos de hemorragia, similares aos exames em humanos, foram descritos. Não há relatos na literatura sobre resultados das imagens de RM que correlacionam com as lesões encefálicas pela neuroesquistossomose mansoni murina.

Associadas às lesões granulomatosas, a histologia acusou espessamento leptomeníngeo principalmente nas áreas sensório-motoras, auditivas e visuais do córtex cerebral tanto em hemisfério esquerdo como no direito. Espessamento leptomeníngeo refere-se a injúrias nas áreas da leptomeninge, como ocorre na meningite, hemorragia subaracnóidea e outras doenças. A invasão do parênquima cerebral por tumores pode resultar em crises convulsivas, paresias e outros déficits neurológicos. Nossos resultados demonstraram, pela primeira vez, granulomas na leptomeninge disseminados nos lobos frontal, parietal, límbico, temporal e occipital no córtex cerebral. Não há registros na literatura que relacione espessamento meníngeo aos granulomas na neuroesquistossomose mansoni em camundongos.

Ovos e granulomas de *S. mansoni* foram encontrados no III e IV ventrículos dos animais infectados. Estudo realizado por Garcia *et al.* (2014) objetivaram estudar a progressão tumoral por injeção de células de glioblastoma humanas no ventrículo lateral de camundongos *Swiss* imunossuprimidos. Como resultado, a pesquisa identificou massa tumoral no parênquima cerebral dos camundongos nessas regiões. Com inferência a essa pesquisa, nosso trabalho identifica o pseudotumor esquistossomótico nos ventrículos cerebrais, desenvolvidos de forma espontânea. Esse é o primeiro relato sobre implicações ventriculares relacionadas à neuroesquistossomose mansoni em camundongos.

Identificaram-se hemácias na região subaracnóidea e intraparenquimatosa próximas a arteríolas cerebrais e cerebelares em nossas amostras. Frequentemente a parede das arteríolas apresentaram padrão inflamatório (arterites) de necrose fibrinóide. A proximidade dos ovos e granulomas do *S. mansoni* com as arteríolas sugere que o ingresso destes, no SNC no modelo murino, deu-se por via arteriolar. Para tal relação, não existem relatos na literatura.

Pitella *et al.* (1981, 1985) estudou cérebros humanos dissecados e identificou no interior de artérias cerebrais, ovos de *S. mansoni* envoltos por infiltrado inflamatório mononuclear. Em tais artérias, observou-se rupturas segmentares e alterações do epitélio com aspecto de necrose fibrinóide. Segundo o autor as arterites poderiam relacionar-se ao depósito de imunocomplexos, e as artérias rompidas à passagem da espícula do ovo pela parede do vaso. Nossos achados corroboram com tais resultados.

Pela histologia, o presente estudo identificou granulomas constituídos por macrófagos, eosinófilos, linfócitos e células gigantes. Fibroblastos e depósitos de colágeno focais também estão presentes em alguns dos granulomas. Nesta pesquisa, comprovou-se edema periovular. Evidenciou-se infiltrado granulomatoso epitelióide na leptomeninge, nas fissuras e nos sulcos cerebrais e cerebelares. Os ovos possuíam miracídio, comprovando ovos maduros e viáveis. Aloe *et al.* (1996) apontaram miracídios nos ovos rodeados por granulomas compostos por eosinófilos, basófilos e mastócitos.

Carvalho *et al.* (2017) injetaram suspensão de 20 µL de ovos de *S. mansoni* (concentração de 25,000 ovos/mL) no espaço subaracnoideo da coluna espinal em ratos *Wistar* machos. Cortes seriados da medula espinal foram realizados para análise histológica, porém não foram encontradas lesões granulomatosas.

O camundongo *Swiss Webster* é um modelo heterogênico rotineiramente utilizado em pesquisas laboratoriais. São animais *outbred*, apresentando linhagem com baixíssimo grau de consanguinidade (cerca de 1%), assim como acontece com a espécie humana, ou seja, reproduz as populações naturais. Outro fator importante para a escolha desse animal, é o fato de reproduzir caracteristicamente a fibrose hepática esquistossomótica dos humanos. A via de inoculação escolhida foi a subcutânea pois trata-se de um procedimento usado em laboratórios do mundo inteiro, de simples manuseio técnico e que oferece baixo sofrimento animal.

Em síntese, o presente estudo reproduz o modelo murino *Swiss Webster* na neuroesquistossomose mansoni encefálica tornando-o fundamental nas pesquisas da patogênese do pseudotumor, nas análises de citocinas e quimiocinas pelo líquido, de métodos diagnósticos por imagem da RM e sobre terapêutica em benefício dos pacientes humanos.

Dificuldades encontradas

A limitação financeira impossibilitou mais avaliações histológicas e por imagem de RM nos 25 animais infectados. Isto poderia estender nossos resultados identificando animais assintomáticos para manifestações neurológicas porém com pseudotumor encefálico.

Com a parceria para uso do equipamento de RM para pequenos animais da UFRJ, tivemos que montar novo grupo experimental para uso do protocolo proposto pelo CENABIO/UFRJ. Tal colaboração exigiu relativa pausa nos trabalhos, porém a aquisição das novas imagens deu-se com equipamento mais novo e de qualidade superior.

CONCLUSÕES

7 CONCLUSÕES

1. Esse estudo estabelece como modelo experimental o camundongo *Swiss Webster* para reproduzir a neuroesquistossomose *mansoni* encefálica.
2. A topografia das lesões encefálicas condizem com as regiões responsáveis pelas funções neuromotoras avaliadas.
3. A ressonância magnética revelou a localização das inflamações, confirmadas pela análise histológica.
4. Os achados histológicos confirmaram granulomas epitelióides no SNC dos animais com manifestações neurológicas.

PROPOSIÇÕES

PROPOSIÇÕES

1. Investigar a atuação dos anticorpos no líquido nas fases aguda e crônica da neuroesquistossomose mansoni;
2. Definir os níveis de citocinas e quimiocinas no líquido de animais infectados, com ou sem clínica neurológica;
3. Descobrir marcadores específicos para a neuroinfecção esquistossomótica (PCR, por exemplo);
4. Definir propostas terapêuticas apropriadas para o tratamento da neuroesquistossomose mansoni;
5. Desenvolver pesquisas mais apuradas para diagnóstico da neuroesquistossomose mansoni encefálica experimental com uso da RM;
6. Aprofundar estudos sobre a mielite esquistossomótica, a oftalmopatia esquistossomótica e a miopatia esquistossomótica.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- ACQUARONI, M. *et al.* Mitomycin-treated undifferentiated embryonic stem cells as a safe and effective therapeutic strategy in a mouse model of Parkinson's disease. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 9, n. 97, p. 1-12, 2015.
- ANDRADE, Z. A.; CHEEVER, A. W. Characterization of the murine model of schistosomal hepatic periportal fibrosis ("pipestem" fibrosis). **Int. J. Exp. Pathol.**, v. 74, p. 195-202, 1993.
- ANDRADE, Z. A. Pathogenesis of "pipestem" fibrosis of the liver (Experimental observation on murine schistosomiasis). **Mem Inst Oswaldo Cruz**. v. 82, n. 3, p. 325-334, 1987.
- ANDRADE, Z. A., PINTO, S. C.; OLIVEIRA, R. S. **Orgs. Animais de Laboratório: criação e experimentação** [online]. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, p. 388, 2002. Disponível em: <<http://books.scielo.org>>. Acesso em: 20 jul. 2017.
- ANDRADE, Z. A.; WARREN, K. S. Mild prolonged Schistosomiasis in mice: alterations in host response with time and the development of portal fibrosis. **Trans Roy Soc Med Hyg**, v. 58, p. 53-57, 1964.
- ALOE, L. *et al.* *Schistosoma mansoni* infection enhances the levels of NGF in the liver and hypothalamus of mice. **NeuroReport**, v.5, p. 1030–1032, 1994.
- ALOE, L.; FIORE, M. Neuroinflammatory implication of *Schistosoma mansoni* infection: new information from the mouse model. **Parasitol. Today**, v. 14, p. 314–318, 1998.
- ALOE, L.; MORONI, R.; ANGELUCCI, F.; FIORE, M. Parasitic infection in adult mice induces thermal hyperalgesia: role of NGF and TNF- α . **Psychopharmacology**, v. 134, p. 287–292, 1997.
- ALOE, L.; MORONI, R.; ANGELUCCI, F.; FIORI, M. Role of TNF- α but not NGF in murine hyperalgesia induced by parasitic infection. **Psychopharmacology**, v. 134, p. 287–292, 1997.
- ALOE L.; MORONI, R.; FIORE, M.; ANGELUCCI, F. Chronic parasite infection in mice induces brain granulomas and differentially alters brain nerve growth factor levels and thermal responses in paws. **Acta Neuropathol.**, v. 92, p. 300-305, 1996.
- ALOE, L.; MORONI, R.; MOLLINARI, C.; TIRASSA, P. *Schistosoma mansoni* infection enhances the levels of NGF in the liver and hypothalamus of mice. **NeuroReport**, v. 5, p. 1030-1032, 1994.
- ALVES, W. The distribution of *Schistosoma* eggs in human tissues. **Bull WHO**, v. 18, p. 1092-7, 1958.
- AZEVEDO, D. S. Infecção experimental do camundongo albino pelo *Schistosoma mansoni*. I-estudo comparativo da eficácia de diferentes vias de infecção. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. X, n. 94, p. 15-19, fev., 1976.
- BARSOUM, R. S.; ESMAT, G.; EL-BAZ, T. Human Schistosomiasis: Clinical Perspective: Review. **J. Adv. Res.**, v. 4, p. 433-444, 2013.

- BARSOUM, R. The kidney in schistosomiasis. In: Floege, Johnson, Feehally, editors. **Comprehensive clinical nephrology**, 4th ed. St Louis, USA: Elsevier; 2010; p. 654–61.
- BOGEN, S. A. *et al.* In situ analysis of cytokine responses in experimental murine schistosomiasis. **Lab. Invest.**, v. 73, p. 253–258, 1995.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Diretrizes técnicas do Programa de Controle da Esquistossomose**, 3. ed., Brasília, 2012.
- CALABRESI, P.; ABELMANN, W. H. Porto-caval and portopulmonary anastomoses in Laennec's cirrhosis and in heart failure. **Journal of Clinical Investigation**, v. 36, p. 1257-1265, 1957.
- CAPRON, A.; DESSAINT, J. P.; CAPRON, M.; JOSEPH, M.; TORPIER, G. Effector mechanisms of immunity to Schistosomes and their regulation. **Immunological. Rev.**, v. 61, p.41-66, 1982.
- CARVALHO, O. S.; COELHO, P. M. Z.; LENZI, H. L. **Schistosoma mansoni e esquistossomose: uma visão multidisciplinar**. Editora FIOCRUZ, p. 1124, 2008. Disponível em: <<http://books.scielo.org>>. Acesso em: 22 set. 2017.
- CARVALHO, S. L. **Fibrose e outras lesões hepáticas em camundongos isogênicos ("inbred") desnutridos e eutróficos, infectados com Schistosoma mansoni**. 2004. Dissertação (Mestrado em Anatomia Patológica). Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2004.
- CHEEVER, A. W. A comparative study of *Schistosoma mansoni* infections in mice, gerbils, multimammate rats and hamster. II-Qualitative pathological differences. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 14, p. 227-238, 1965.
- CHEEVER, A. W.; DUVALL, R. H. Single and repeated infections of grivet monkeys with *Schistosoma mansoni*: parasitological and pathological observations over a 31-month period. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 23, p. 884-894, 1974.
- CHEEVER, A. W. *Schistosoma japonicum*: the pathology of experimental infection. **Exp. Parasitol.**, v. 59, n. 1, p. 1-11, 1985.
- COLÉGIO BRASILEIRO DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (COBEA). **Manual para técnicos em bioterismo**. São Paulo, v. 1, p. 3-5, 1990.
- COUTINHO, E. M. *et al.* The use of protein hydrolysate improves the protein intestinal absorption in undernourished mice infected with *Schistosoma mansoni*. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 35, n. 6, p. 585-590, 2002.
- COUTINHO, E. M.; SOUZA, M. M.; SILVA, L. M.; CAVALCANTI, C. L.; ARAUJO, R. E.; BARBOSA, J. R.; FRANCELINO, A. A.; CHEEVER, A. W.; ANDRADE, Z. A. Pathogenesis of schistosome "pipestem" fibrosis: a low-protein diet inhibits the development of "pipestem" fibrosis in mice. **Int. J. Exp. Path.**, v. 78, p. 337-342, 1997.
- COUTO, F. F. B. **Estudo da resistência do Schistosoma mansoni sambon, 1907 ao praziquantel**. 2014. 78 f. Tese (Doutorado em ciências). Centro de Pesquisas René Rachou/FIOCRUZ, Belo Horizonte, 2014.

- COUTO, J. L. A. Esquistossomose murina associada à desnutrição: alterações histopatológicas no fígado, baço e jejuno. **Rev. Patol. Trop.**, v. 36, n. 1, p. 54-66, jan-abr., 2007.
- CRAM, E. B.; FILES, V. S. Experimental mammalian infection with the schistosomes of man. i. laboratory animals as a source of supply of adult schistosomes and their ova. **Nat. Inst. Health Bull.**, v. 189, p. 101-105, 1947.
- DE WITT, W. B.; WARREN, K. S. Hepato-splenic schistosomiasis in mice. **Am. J. Trop. Med. & Hyg.**, v. 8, p. 440-446, 1959.
- EDINGTON, G. M.; NWABUEBO, I.; JUNAID, T. A. The pathology of schistosomiasis in Ibadan, Nigeria with special reference to the appendix, brain, pancreas and genital organs. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 69, n. 1, p. 153-6, 1975.
- EDUNGBOLA, L. D.; CHA, Y. N.; BUEDING, E.; SCHILLER, E. L. Granuloma formation around exogenous eggs of *Schistosoma mansoni* and *Schistosoma japonicum* in mice. **Afr J Med Med Sci**, v. 11, n. 2, p. 75-9, 1982.
- 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. Immunity**, v. 69, p. 2532-2536, 1995.
- FAUST, E. C. An inquiry into the ectopic lesions in schistosomiasis. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. s1-28, Issue 2, p.175-199, mar. 1948.
- FERRARI, T. C. A. A laboratory test for the diagnosis of neuroschistosomiasis. **Neurol. Res.**, v. 32, n. 3, p. 252-261, 2010.
- FERRARI, T. C. A. *et al.* Clinical and immunological study of schistosomal myeloradiculopathy. **Ann Trop Med Parasitol**, v. 87, n. 3, p. 295-297, 1993.
- _____. Clinical characterization of neuroschistosomiasis due to *Schistosoma mansoni* and its treatment. **Acta Tropica**, v.108, p. 89–97, 2008.
- _____. Estimation of the local synthesis of immunoglobulin G (IgG) in the central Nervous System of patients with spinal cord schistosomiasis by the IgG index. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 93, p. 558-559, 1999.
- _____. Involvement of Central Nervous System in the Schistosomiasis. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 99, p. 59-62, 2004a. (Suplemento 4)
- _____. Spinal-cord involvement in the hepato–splenic form of *Schistosoma mansoni* infection. **Ann Trop Med Parasitol**, v. 95, n. 6, p. 633-635, 2001.
- FERRARI, T. C. A. **Abordagem diagnóstica da mielopatia causada pelo *Schistosoma mansoni*: imunodiagnóstico em líquido pela técnica de Elisa.** 1997. Tese (Doutorado em Medicina) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo horizonte, 1997.
- FERRARI, T. C. A.; MOREIRA, P. R. R. Neuroschistosomiasis: clinical, symptoms and pathogenesis. **Lancet Neurol.**, v. 10, p. 853–864, 2011.

FERREIRA, F. T. **Sensibilidade e especificidade do teste rápido na urina (POC-CCA) e avaliação da morbidade da esquistossomose mansônica em região de baixa prevalência.** 2016. 78 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde). Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2016.

FIORE, M.; ALLEVA, E.; MORONI, R.; ALOE, L. Infection with *Schistosoma mansoni* in mice induces changes in nociception and exploratory behavior. **Physiol Behav**, v. 65, p.347–353, 1998.

FIORE, M.; CARERE, C.; MORONI, R.; ALOE, L. Passive avoidance response in mice infected with *Schistosoma mansoni*. **Physiol Behav**, v. 75, p. 449– 454, 2002.

FIORE, M.; ALOE, L., Neuroinflammatory implication of *Schistosoma mansoni* infection in the mouse. **Arch. Physiol. Biochem.**, v. 109, p. 361–364, 2001.

FIORE, M.; MORONI, R.; ALLEVA, E.; ALOE, L. *Schistosoma mansoni*: influence of infection on mouse behavior. **Exp Parasitol**, v. 83, p. 46–54, 1996.

FIORE, M.; MORONI, R.; ALLEVA, E.; ALOE, L. *Schistosoma mansoni*: schistosomiasis induces neurobehavioral deficits in adult mice. **Exp Parasitol**, v. 83, p. 45–58, 1996.

FIORE, M.; MORONI, R.; ALOE, L. Removal of the submaxillary salivary glands and infection with the trematode *Schistosoma mansoni* alters exploratory behavior and pain thresholds in female mice. **Physiol. Behav.**, v. 62, p. 399–406, 1997.

FONSECA, C. G. **O papel da proteína prion celular na progressão do glioblastoma num modelo de camundongo imunocompetente.** 2016. 125 f. Tese (Doutorado em Ciências Morfológicas). Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2016.

FUGIWARA, M.; MAKINO, M.; WATANABE, H. *Schistosoma mansoni*: induction of severe glomerulonephritis in female BXSB mice following chronic infection. **Exp Parasitol**, v. 65, p. 214-221, 1998.

GARCIA, C. *et al.* **The orthotopic xenotransplant of human glioblastoma successfully recapitulates glioblastoma-microenvironment interactions in a non-immunosuppressed mouse model.** Disponível em: <doi:10.1186/1471-2407-14-923>. Acesso em 12 Jun 2017.

GARCIA, E. G. Clinical studies on schistosomiasis japonica in the Philippines a review. **Southeast Asean J. Trop. Med. Pub. HLTH**, v. 7, n. 2, p. 247-251, 1976.

GBD compare, 2010. **Institute for Health Metrics and Evaluation.** Global Health Data Exchange. Disponível em: <http://vizhub.healthdata.org/gbd-compare/>. Acesso em 19/06/2017.

GELFAND, M. Schistosomiasis in South Central Africa. Capetown, South Africa. **Post Graduate Press**, p. 194-202, 1950.

GUIDE FOR THE CARE AND USE OF LABORATORY ANIMALS. **National Research Council**, Washington, D.C., 2011.

GUI, M.; KUSEL, J. R.; SHI, Y. E.; RUPPEL, A. **Schistosoma japonicum and S. mansoni: comparison of larval migration patterns in mice**. Disponível em: <<https://doi.org/10.1017/S0022149X0001378X>>. Acesso em: 1 jun. 2017.

HATCHER, J. P.; JONES, D. N.; ROGERS, D. C. *et al.* Development of SHIRPA to characterize the phenotype of gene-targeted mice. **Behav Brain Res**, v.125, n.1-2, p. 43-47, 2001.

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

KATZ, N. **Terapêutica experimental e clínica na esquistossomose mansoni**. 2005. 79 f. Tese (Doutorado em Ciências da Saúde). Fundação Oswaldo Cruz/ Centro de Pesquisas René Rachou, Belo Horizonte, Minas Gerais, 2005.

KVASVIG, J. D. The effect of parasitic infection on cognitive performance. **Parasitol Today**, v. 4, p. 206–208, 1988.

LAMBERTUCCI, J. R. A esquistossomose mansoni em Minas Gerais. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 20, n. 1, p.47-52, 1987.

LAMBERTUCCI, J. R. *et al.* Cervical spinal cord schistosomiasis. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 35, n. 5, p. 543-544, set-out, 2002.

LAMBERTUCCI, J. R. *et al.* Mielorradiculopatia esquistossomótica. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 37, n. 3, p. 261-272, mai-jun, 2004.

LAMBERTUCCI, J. R. *Schistosoma mansoni*: pathological and clinical aspects. In: Jordan P, ed. **Human Schistosomiasis**. Wallingford: cab international, p. 195-235, 1993.

LAMBERTUCCI, J. R.; BARRAVIERA, B. Esquistossomose mansônica: estudo clínico. **J. bras. med.**, v.67, n. 3, p. 59-100, 1994.

LAMBERTUCCI, J. R.; VOIETA I.; SILVEIRA, I. D. O. S. Cerebral schistosomiasis mansoni. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 41, p. 693–694, 2008.

LAMBERTUCCI, J. R.; SILVA, L. C. S.; AMARAL, R. S. do; Guidelines for the diagnosis and treatment of schistosomal myeloradiculopathy. Artigo de revisão. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 40, n. 5, p. 1-8, 2007.

LAMBERTUCCI, J. R.; SILVA, L. C. S.; VOIETA, I. Esquistossomose mansônica. In: COURA JR. **Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, Cap.76, p. 931-946, 2005.

LAMBERTUCCI, J. R.; SOUZA-PEREIRA, S. R.; CARVALHO, T. A. Simultaneous occurrence of brain tumor and myeloradiculopathy in schistosomiasis mansoni: case report. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 42, p. 338-341, 2009.

LIU, H.; LIM, C. C. T.; FENG, X.; YAO, Z.; CHEN, Y.; SUN, H.; CHEN, X. MRI in Cerebral Schistosomiasis: Characteristic Nodular Enhancement in 33 Patients. *Neuroradiology*, **Am J Roentgenol**, v. 191, p. 582–588, 2008.

- LOPES, E. R. *et al.* Patologia das principais doenças tropicais no Brasil. In: BOGLIOLO, L. (Org.). **Patologia**. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara, Koogan, 2006. p. 1337-1359.
- MACHADO, A. **Neuroanatomia funcional**. 2 ed. São Paulo: Atheneu, 2005.
- MAHMOUD, A. A. F. Esquistossomose. In: **Tratado de Medicina Interna**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 2127-2132, 1997.
- MANES, M. *et al.* Caracterização fenotípica do camundongo mutante equilíbrio que apresenta alterações motoras e do sistema vestibular. In: XXIV semana do vpt, 2016, São Paulo. **Revista de educação continuada em medicina veterinária e zootecnia. São Paulo: conselho regional de medicina veterinária**, v. 14. p. 64-64, 2015.
- MASUYA, H.; INOUE, M.; WADA, Y. *et al.* Implementation of the modified SHIRPA protocol for screening of dominant phenotypes in a large-scale ENU mutagenesis program. **Mamm Genome**, v. 16, n.11, p. 829-37, 2005.
- MATAS, S. L. A. Neuroesquistossomose. **Revista de Neurociências**, v. 9, n. 1, p. 27-31, 2001.
- METWALI, A. *et al.* IL-2 contributes to the IL-5 response in granulomas from mice infected with *Schistosoma mansoni*. **J. Immunol**, v. 150, p. 536–542, 1993.
- MOORE, D. V.; YOLLES, T. K.; MELENEY, H. E. A comparison of common laboratory animals as experimental hosts for *Schistosoma mansoni*. **J parasitol**, v. 35, p. 156-170, 1949.
- MORAES, R. G. *Schistosoma mansoni*. In: MORAES, R. G.; GOULART E. G.; Brazil, R. (Org.). **Parasitologia & Micologia Humana**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 191-197, 2008.
- MOST, H.; KANE, C. A. Schistosomiasis of the central nervous system experiences in World War II and a review of the literature. **Archives of neurology and Psychiatry**, v. 59, n. 2, p. 141-183, 1948.
- NOYA, B. A. *et al.* Schistosomiasis in America. **Neglected Tropical Diseases – Latin America and the Caribbean, Neglected Tropical Diseases** (DOI 10.1007/978-3-7091-1422-3_2). Acesso em: 20 de março de 2018.
- OTONI, A. **Perfil de quimiocinas na urina e no soro de pacientes com a glomerulopatia da esquistossomose mansônica hepatoesplênica**. 2011. 114 f. Tese (Doutorado em Infectologia e Medicina Tropical). Universidade federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2011.
- PARENTI, M. D. *et al.* Cerebral Schistosomiasis Caused by *Schistosoma haematobium*: Case Report. **Clinical Infectious Diseases**, v. 18, p. 354-7, 1994.
- PELLEGRINO, J.; KATZ, N. Experimental chemotherapy of *Schistosoma mansoni*. **Adv Parasitol.**, v. 6, p. 233-91, 1968.
- PELLEGRINO J.; SIQUEIRA A. F. Técnica de perfusão para colheita de *Schistosoma mansoni* em cobaias experimentalmente infestadas. **Rev. Bras. Malar.**, v. 8, p. 589-597, 1956.

PEREIRA, F. E. L. Inflamações. In: BOGLIOLO, L. (Org.). **Patologia**. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara, Koogan, 2006. p. 130-174.

PEREIRA, T. S. **Participação da via do hedgehog na fibrose hepática da esquistossomose mansoni humana e murina experimental**. 2015. 153 f. Tese (Doutorado em patologia humana). Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz/FIOCRUZ, Salvador, 2015.

PINTO, Wladimir Bocca Vieira de Resende; SOUZA, Paulo Victor Sgobbi de; KO, Gui Mi. Exame neurológico do camundongo. **RESBCAL**, São Paulo, v.2, n.3, p. 222-227, 2013.

PITTELLA, J. E. H.; PEIXOTO, M. A. Brain involvement in hepatosplenic schistosomiasis mansoni. **Brain**, v. 104, p. 621-632, 1981.

PITTELLA, J. E. H. Vascular changes in cerebral schistosomiasis mansoni: a histopathological study of fifteen cases. **Am J Trop Med Hyg**, v. 34, n. 5, p. 898-902, 1985.

PITTELLA, J. E. H. *et al.* Tumoral form of cerebral schistosomiasis mansoni. A report of four cases and a review of the literature. **Clin Neurol Neurosurg**, v. 98, p. 15–20, 1996.

PITTELLA, J. E. H. Neuroschistosomiasis. **Brain Pathology**, v. 7, p. 649-662, 1997.

PITTELLA, J. E. H. The relation between involvement of the centnervous system in schistosomiasis mansoni and the clinical form of the parasitosis. A review. **J Trop Med Hyg**, v. 94, p. 15–21, 1991.

PRATA, A. Infection with *S. mansoni*. In **Schistosomiasis, epidemiology, treatment and control**. p.105–127. 1982.

QUEIROZ, A. C. O envolvimento do sistema nervoso central na esquistossomose mansônica. **Revista de patologia tropical**, v. 3, p. 255-261. 1974.

REYES, V. A; YOGORE, M. G. Studies on cerebral schistosomiasis. **J Philipp Med Assoc**, v. 40, p. 87-100, feb. 1964.

RITCHIE, L. S.; GARSON, S.; KNIGHT, W. B. The biology of *Schistosoma mansoni* in laboratory rats. **J Parasitol**, v. 49, p. 571-577, 1963.

ROGERS, D. C.; PETERS, J.; MARTIN, J. E.; NICHOLSON, S. J.; WITHERDEN, A. S.; HEFEZPARAST, M. *et al.* SHIRPA, a protocol for behavioral assessment: validation for longitudinal study of neurological dysfunction in mice. **Neurosci Lett.**, v. 306, n. 1-2, p. 89-92, 2001.

ROSS, A. G.; McMANUS, D. P.; FARRAR, J. HUNSTMAN, R. J.; GRAY, D. J.; LI, Y. Neuroschistosomiasis. **J neurol**, v. 259, n. 1, p. 22–32, 2012.

ROUQUAYROL, M. Z.; ALMEIDA-FILHO, N. **Epidemiologia e Saúde**, 6. ed. Rio de Janeiro: Medsi, 2003.

SALEH, S.; HAMDY, M. A. Testicular lipids and serum FSH of mice in experimental Schistosomiasis mansoni. **Egypt J Bilharz.**, v. 6, n. 1-2, p. 51-59, 1979.

- SANTOS, A. G. A. **Perfil clínico e epidemiológico dos portadores de mielorradiculopatia esquistossomótica atendidos no Hospital das Clínicas de Pernambuco**. 2006. Dissertação (Mestrado em Patologia) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2006.
- SANTOS, A. M. **Achados da ressonância magnética no encéfalo de portadores jovens da forma hepatoesplênica da esquistossomose, sem sintomas neurológicos**. 2006. 87 f. Dissertação (Mestrado em Cirurgia). Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2006.
- SCRIMGEOUR, E. M.; GAJDUSEK, D. C. Involvement of the central nervous system in *Schistosoma mansoni* and haematobium infection. **Brain**, v. 108, p.1023–1038, 1985.
- SILVA, L. C. S. *et al.* Schistosomiasis mansoni – Clinical features. **J Gastroenterol Hepatol**, v. 28, n. 1, p. 30-39, 2005.
- SILVA, L. M.; OLIVEIRA, C. N.; ANDRADE, Z. A. Experimental neuroschistosomiasis: inadequacy of the murine model. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 97, p. 599-600, 2002.
- SIQUEIRA, L. M. V. **Diagnóstico da esquistossomose mansoni em áreas de baixa transmissão: avaliação de diferentes técnicas (KATO-KATZ, gradiente salínico, PCR-ELISA e qPCR) antes e após intervenção terapêutica**. 2015. 122f. Tese (Doutorado em Ciências). Fundação Oswaldo Cruz/ Centro de Pesquisas René Rachou, Belo Horizonte, Minas Gerais, 2015.
- SOUSA-PEREIRA, S. R. **Contribuição das quimiocinas no diagnóstico da mielorradiculopatia esquistossomótica**. 2006. 101 f. Dissertação (Mestrado em Infectologia e Medicina Tropical) - Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais, 2006.
- STIREWALT, M. A.; HACKEY, J. R. Penetration of host skin by cercariae of *Schistosoma mansoni*. I - Observed entry into skin of mouse hamster, rat, monkey and man. **J Parasitol**, v. 42, p.565-580, 1956.
- STIREWALT, M. A.; KUNTZ, R. E.; EVANS, A. S. The relative susceptibilities of the commonly-used laboratory mammals to infection by *Schistosoma mansoni*. **Am. J. Trop. Med.**, v. 31, p. 57-82, 1951.
- VAN DER WERF, M. J. *et al.* Quantification of clinical morbidity associated with schistosome infection in sub-Saharan Africa. **Acta Trop**, v. 89, p. 125-139, 2003.
- VALE, T. C. *et al.* Neuroschistosomiasis mansoni literature review and guidelines. **The Neurologist.**, v. 18, p. 333-342, 2012.
- VALE, T. C. *et al.* *Schistosoma mansoni* encephalomyelitis. **Arch Neurol.**, v. 68, p. 1200–1201, 2011.
- WARREN, K. S. Experimental pulmonary schistosomiasis. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 58, p. 228-233, 1964.
- WARREN, K. S.; PETERS, P. A. Comparison of penetration and maturation of *Schistosoma mansoni* in hamsters, mouse, guinea pig, rabbit and rat. **Am J Trop Med Hyg**, v. 16, p. 718 -722, 1967.

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

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Elimination of schistosomiasis in low transmission areas: Report of the WHO informal consultation.** Salvador, Bahia, 18-19 Aug. 2008. Geneva, 2009.

ANEXOS

ANEXO I - Monitoramento clínico: protocolo SHIRPA modificado

Identificação do animal	Nº _____(grupo)	Presente	Ausente
Atividade motora geral			
Contorsão de tronco			
Torção cervical (à Direita ou Esquerda)			
Torção de tronco (à Direita ou Esquerda)			
Reflexo de fuga			
Paralisia de Trem posterior (ataxia)			
Reflexo de Endireitamento (equilíbrio)			
Tônus muscular			
Força de agarrar			
Ataxia			
Convulsões			
Resposta à Estimulações			
Isolamento do grupo			
Cianose			
Spinning			

Fonte: PINTO, Wladimir Bocca Vieira de Resende; SOUZA, Paulo Victor Sgobbi de; KO, Gui Mi. Exame neurológico do camundongo. **RESBCAL**, São Paulo, v.2, n.3, p. 222-227, 2013.



LICENÇA

LW-54/14

Comissão de Ética no
uso de Animais

Certificamos que o protocolo (P-28/14.2), intitulado:

“NEUROESQUISTOSSOMOSE EXPERIMENTAL: IDENTIFICAR A FREQUÊNCIA DE OVOS E DE GRANULOMAS DE SCHISTOSOMA MANSONI NO CÉREBRO DE CAMUNDONGOS INFECTADOS PELO VERME E CORRELACIONAR O LOCAL DA LESÃO NEUROLÓGICA COM A PRESENÇA DE MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS”, sob a responsabilidade de **PATRÍCIA MARTINS PARREIRAS** atende ao disposto na Lei 11794/08, que dispõe sobre o uso científico no uso de animais, inclusive, aos princípios da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL). A referida licença não exige a observância das Leis e demais exigências legais na vasta legislação nacional.

Esta licença tem validade até 13/10/2018 e inclui o uso total de:

Mus musculus

- 150 fêmeas de Swiss Webster, Peso: 20 gramas;

Mus musculus

- 150 fêmeas de BALB/C, Peso: 20 gramas.

Rio de Janeiro, 13 de outubro de 2014.

Octavio Augusto França Presgrave
Coordenador da CEUA/Fiocruz

CRUZ
Octavio A. F. Presgrave
Coordenador
FIOCRUZ



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Senhor(a) Professor(a) José Roberto Lambertucci,

Após análise de sua solicitação de avaliação do projeto NEUROESQUISTOSSOMOSE EXPERIMENTAL: IDENTIFICAR A FREQUÊNCIA DE OVOS E DE GRANULOMAS DE SCHISTOSOMA MANSONI NO CÉREBRO DE CAMUNDONGOS INFECTA, submetido a esta comissão pelo protocolo 377 / 2014, a CEUA decidiu **aprovar** a sua solicitação.

Justificativa: Aprovado na reunião do dia 30/03/2015.

Para acessar ao seu projeto clique no link:

<https://www.ufmg.br/bioetica/cetea/ceua/>

Belo Horizonte, 31/03/2015.

Atenciosamente.

Sistema CEUA-UFMG

<https://www.ufmg.br/bioetica/cetea/ceua/>

APÊNDICES

APÊNDICE I

Tabelas dos camundongos que relaciona a manifestação neurológica e o local das lesões encefálicas.

Camundongo 01:

Tabela 4 – Correlação entre a manifestação neurológica apresentada pelo camundongo 01 e a área de lesão granulomatosa, laboratório de patologia/UFMG, janeiro/2017 a julho/2017 (HE hemisfério esquerdo, HD hemisfério direito).

Manifestação Neurológica	Topografia Encefálica											
	Trato Olfatório		Lobo Límbico		Área Somato-motora		Fissuras do córtex cerebelar		Tronco encefálico		III Ventrículo	IV Ventrículo
	HE	HD	HE	HD	HE	HD	HE	HD	HE	HD		
Spinning	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	-	-
Torção de cabeça à direita	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-
Torção de cabeça à esquerda	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Torção de tronco à direita	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-
Torção de tronco à esquerda	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hemiparesia à direita	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hemiparesia à esquerda	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-
Ataxia	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-
Equilíbrio	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	-	-
Contorção	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	-	-

Fonte: autor, 2018.

Camundongo 02:

Tabela 5 - Correlação entre a manifestação neurológica apresentada pelo camundongo 02 e a área de lesão granulomatosa, laboratório de patologia/UFMG, janeiro/2017 a julho/2017 (HE hemisfério esquerdo, HD hemisfério direito).

Manifestação Neurológica	Topografia Encefálica											
	Trato Olfatório		Lobo Límbico		Área Somato-motora		Fissuras do córtex cerebelar		Tronco encefálico		III Ventrículo	IV Ventrículo
	HE	HD	HE	HD	HE	HD	HE	HD	HE	HD		
Spinning	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-
Torção de cabeça à direita	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-
Torção de cabeça à esquerda	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Torção de tronco à direita	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Torção de tronco à esquerda	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hemiparesia à direita	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-
Hemiparesia à esquerda	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-
Ataxia	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+
Equilíbrio	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+
Contorção	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Fonte: autor, 2018.

Camundongo 03:

Tabela 6 – Correlação entre a manifestação neurológica apresentada pelo camundongo 03 e a área de lesão granulomatosa, laboratório de patologia/UFMG, janeiro/2017 a julho/2017 (HE hemisfério esquerdo, HD hemisfério direito).

Manifestação Neurológica	Topografia Encefálica											
	Trato Olfatório		Lobo Límbico		Área Somato-motora		Fissuras do córtex cerebelar		Tronco encefálico		III Ventrículo	IV Ventrículo
	HE	HD	HE	HD	HE	HD	HE	HD	HE	HD		
Spinning	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-
Torção de cabeça à direita	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-
Torção de cabeça à esquerda	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Torção de tronco à direita	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Torção de tronco à esquerda	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
Hemiparesia à direita	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hemiparesia à esquerda	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ataxia	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Equilíbrio	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
Contorção	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Fonte: autor, 2018

Tabela 7 – Identificação de ovos e granulomas nas diversas regiões do encéfalo de três camundongos infectados com 50 cercárias de *S. mansoni* via subcutânea, analisados no departamento de patologia da UFMG, no período de janeiro a setembro de 2017.

TOPOGRAFIA	Caso		Controle		p
	n	%	n	%	
Lobo límbico	2	8,0	0	0,0	0,490
Área sensório-motor do córtex cerebral	3	12,0	0	0,0	0,235
Área visual do córtex cerebral	2	8,0	0	0,0	0,490
Área auditiva do córtex cerebral	2	8,0	0	0,0	0,490
Fissuras do córtex cerebelar	1	4,0	0	0,0	0,999
Tronco encefálico	2	8,0	0	0,0	0,490
III Ventrículo	1	4,0	0	0,0	0,999
IV Ventrículo	2	8,0	0	0,0	0,490

Fonte: autor, 2018.

Ovos sem reação inflamatória foram encontrados em diversas regiões do encéfalo

Tabela 8 - Identificação de ovos nas diversas regiões do encéfalo de três camundongos infectados com 50 cercárias de *S. mansoni* via subcutânea, analisados no departamento de patologia da UFMG, no período de janeiro a setembro de 2017.

TOPOGRAFIA	Caso		Controle		p
	n	%	n	%	
Trato olfatório	2	8,0	0	0,0	0,490
Lobo límbico	3	12,0	0	0,0	0,235
Área sensório-motor do córtex cerebral	1	4,0	0	0,0	0,999
Área visual do córtex cerebral	2	8,0	0	0,0	0,490
Área auditiva do córtex cerebral	2	8,0	0	0,0	0,490
Fissuras do córtex cerebelar	2	8,0	0	0,0	0,490

Fonte: autor, 2018.

APÊNDICE II

Tetes para o delineamento experimental :

Teste 1.

Infecção dos animais com cercárias e formação dos grupos experimentais

Foram adotados quatro grupos para o desenvolvimento desse estudo. No grupo experimental (G1), composto por 37 camundongos, houve infecção com 50 cercárias da cepa LE de *S. mansoni*, em cada camundongo. Nesse grupo, removeu-se o cérebro após eutanásia para análise histológica.

No grupo experimental (G2), também compostos por 37 camundongos, houve infecção também com 50 cercárias em cada camundongo. Nesse grupo, o encéfalo foi dissolvido em 60 mL a 4% de solução de hidróxido de potássio (KOH) para contagem dos ovos, de acordo com Cheever (1970), especificando quantitativamente o número de ovos no SNC.

No grupo experimental (G3), também composto por 37 camundongos, a infecção foi com 110 cercárias afim de constatar se com essa quantidade de cercárias os animais desenvolveriam a neuroinfecção ou simplesmente morreriam. No grupo controle (G4), composto por 40 camundongos, não houve infecção.

Cada animal foi identificado com brincos de diferentes números. Planejou-se o acompanhamento dos camundongos por até 180 dias após a infecção.

Aos 70, 140 e 180 dias pós-infecção, três camundongos de cada grupo foram eutanasiados. Durante o desenvolvimento do experimento, qualquer animal dos grupos G1, G2 e G3 que apresentaram sintomatologia característica de neurolesão, ou seja, alteração motora, dissecou-se o encéfalo para realização das análises histopatológicas. Se algum camundongo do G4 apresentasse

alterações motoras, seria realizada também dissecação do encéfalo para análise histopatológica e conseqüente investigação da referida sintomatologia.

Devido ao ineditismo do estudo e ao caráter pioneiro da metodologia proposta, os cálculos foram realizados baseados nas proporções estimadas de camundongos com neuroesquistossomose submetidos ao procedimento. Calculando-se tendo em vista uma precisão absoluta de 10%, nível de significância de 5% e uma proporção estimada de 15% de animais com neuroesquistossomose, determinou-se 37 camundongos (LWANGA & EMESHOW, 1991) nos grupos G1, G2 e G3 e 40 animais no grupo G4. Para experimento com camundongos *BALB/C* consideramos 151 animais a serem utilizados no experimento, seguindo a mesma formação de grupos e delineamento experimental proposto para os *Swiss Webster*. Foram aplicados os mesmos cálculos amostrais propostos para o grupo *BALB/C*, concluindo 151 animais para o experimento. Ao todo, 302 camundongos das linhagens *Swiss Webster* e *BALB/C* foram utilizados.

Como resultados, 24 animais apresentaram sinais sugestivos de neurolesão (tabela 1). Oito animais do G3 e cinco do G1 (*Swiss Webster*), possuíam hemorragias disseminadas à macroscopia. Um camundongo do G3 e um do G1 (*BALB/C*) também apresentaram hemorragias no encéfalo (tabela 2). O tempo pós-infecção para surgimento das manifestações clínicas foi em média 2 meses e 15 dias. Realizou-se histologia em 5 animais, que confirmaram presença de ovos e granulomas.

Tabela 10 – Resultado de animais com sinais clínicos sugestivos de neurolesão.

Nº de cercárias utilizadas	BALB/C	SWISS WEBSTER
110 cercárias	4	12
50 cercárias	1	7

Nota: animais com sinais clínicos;
Fonte: autor, 2017.

Tabela 11 – Quantidade de animais que possuíam hemorragias encefálicas.

Nº de cercárias utilizadas	BALB/C	SWISS WEBSTER
110 cercárias	1	8
50 cercárias	1	5

Fonte: autor, 2017.

Sobre as contagens de ovos (G2) de cada linhagem, aos 70 dias pós-infecção, em 1 (*Swiss Webster*) animal cujo cérebro foi submetido a digestão por KOH, foram encontrados 2 ovos de *S. mansoni*. Aos 140 dias 1 camundongo *Swiss Webster* apresentou 45 ovos e 1 camundongo BALB/C, 7 ovos. Aos 180 dias, não haviam animais para estudo, pois os mesmo morreram até esta data.

Teste 2.

Uso da ressonância magnética para investigação das lesões encefálicas.

Cinquenta camundongos *Swiss Webster* foram definidos para execução desse experimento. Vinte e cinco animais formaram o “grupo infectado” e vinte e cinco compuseram o “grupo controle”. A infecção foi realizada por via subcutânea com 50 carcárias da cepa LE de *S. mansoni*. Foi estabelecida a data de 2 meses e 15 dias pós-infecção para realização das imagens de RM e em seguida a eutanásia dos animais para confecção das lâminas e estudo histológico dos encéfalos.

Como resultados, restaram 15 animais infectados para realização das imagens. Nove camundongos apresentaram lesões disseminadas por todo encéfalo. A histologia comprovou presença de ovos e granulomas no encéfalo dos animais. Nenhum camundongo apresentou sintomatologia característica de neurolesão.

APÊNDICE III

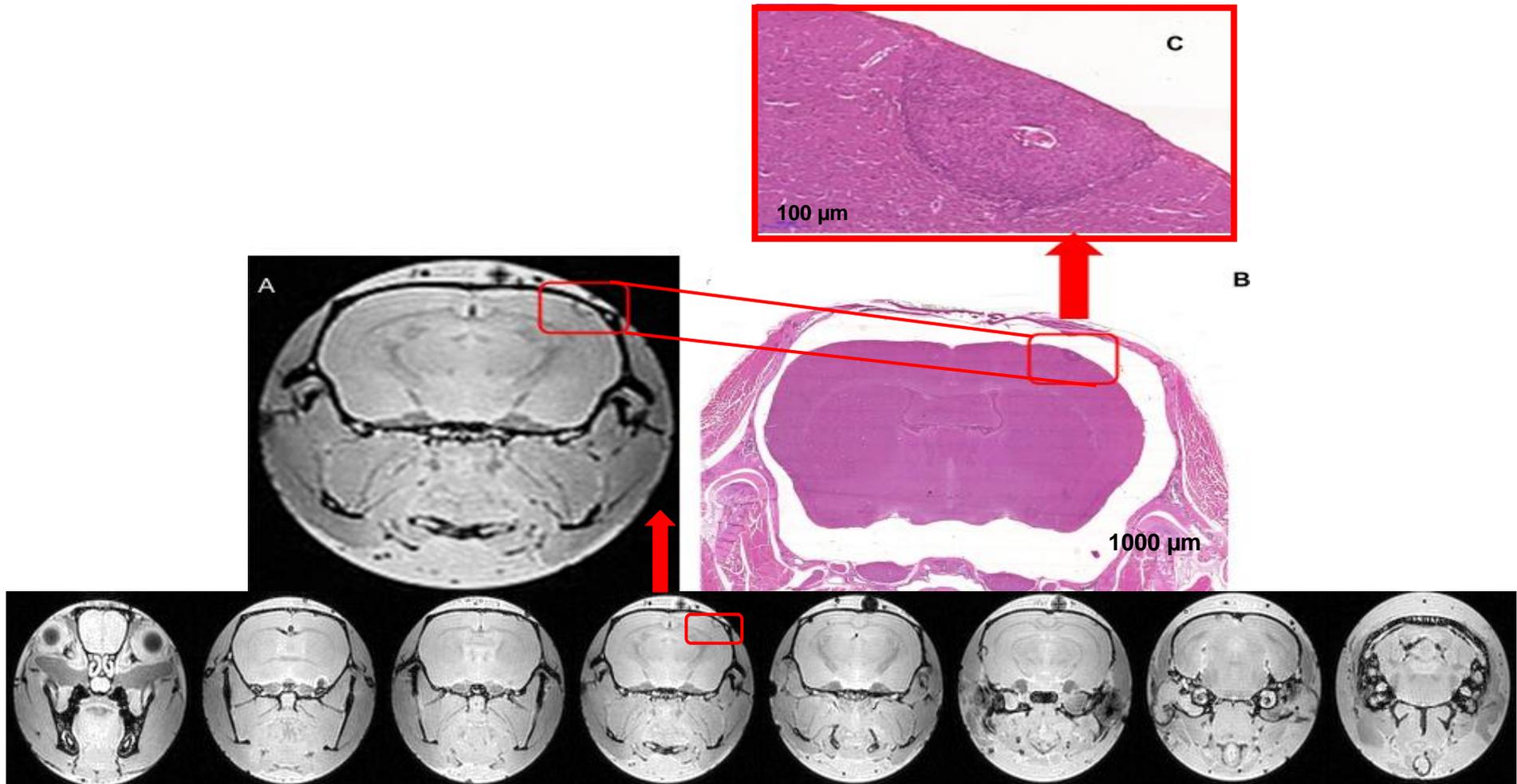


Figura 10 – Lesão granulomatosa no encéfalo de camundongo infectado com cercarias de *S. mansoni*. A. Lesão nodular no hemisfério cerebral em torno do ovo do parasito. Corte coronal na área sensoriomotora. A. Ressonância magnética com ponderação em T1 com núcleo hiperdenso rodeado com sinal hipodenso. B e C. Cortes histológicos corados pela hematoxilina e eosina (HE). Em B visão panorâmica da mesma região vista em A, mostrando volumoso granuloma esquistossomótico. C. aumento maior do granuloma mostrado em B, o qual contém ovo do parasito e comprime o parênquima cerebral adjacente. Fonte: autor, 2018. 100

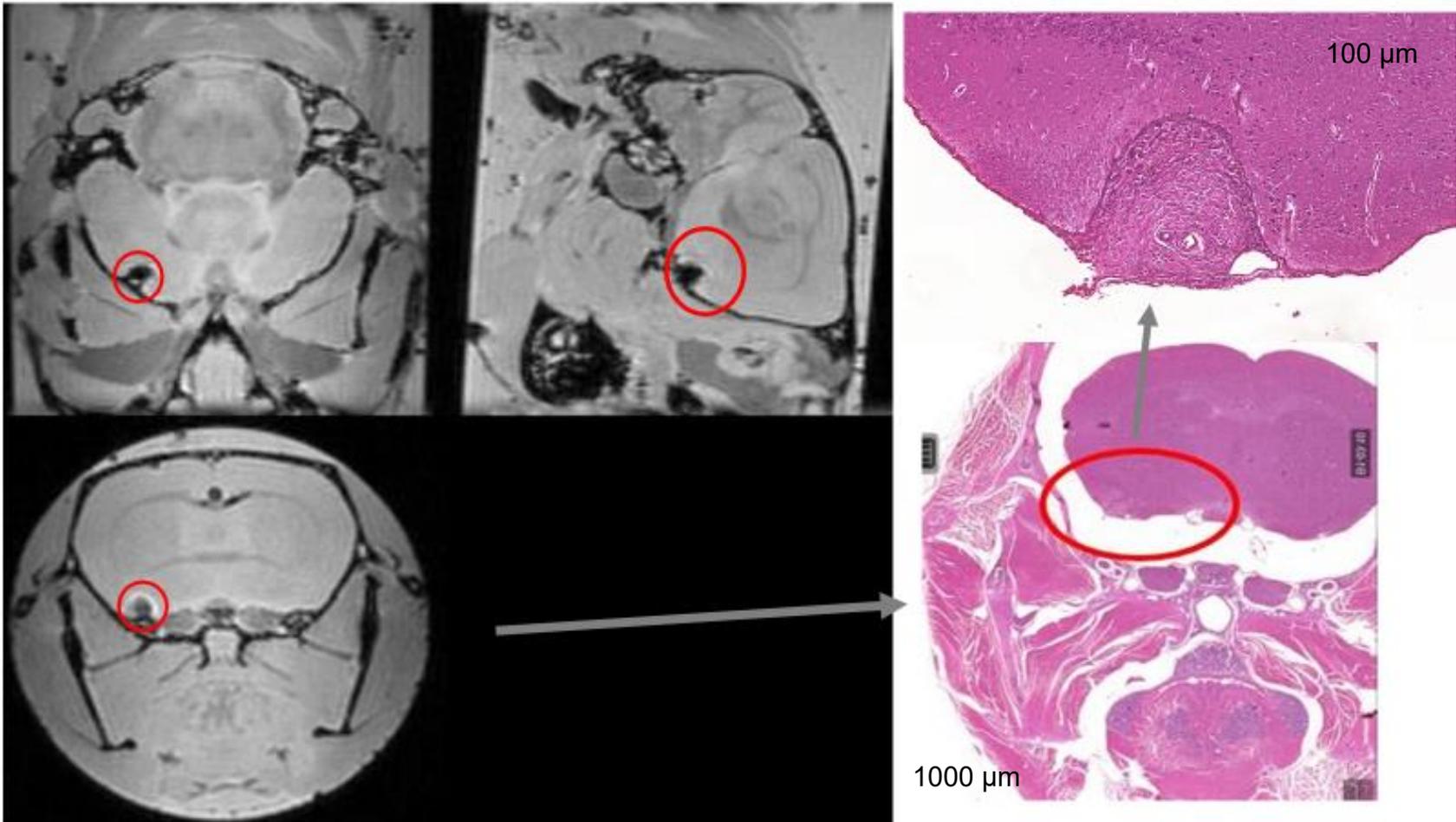


Figura 11 – Cortes seriados do encéfalo do camundongo. Imagens de RM mostrando a lesão em diferentes cortes na ponderação em T1. Lesão nodular no hemisfério cerebral em torno do ovo do parasito. Os cortes acusam área do lobo límbico (área do córtex do piriforme). Cortes histológicos corados pela hematoxilina-eosina (HE).
Fonte: autor, 2018.



Figura 12 – Encéfalo de camundongo infectado com cercarias de *S. mansoni*. A. Imagens da convexidade encefálica. B. Imagem da base do encéfalo. Em ambas, existem focos de hemorragias disseminadas recentes na superfície dos lobos cerebrais.
Fonte: autor, 2018.

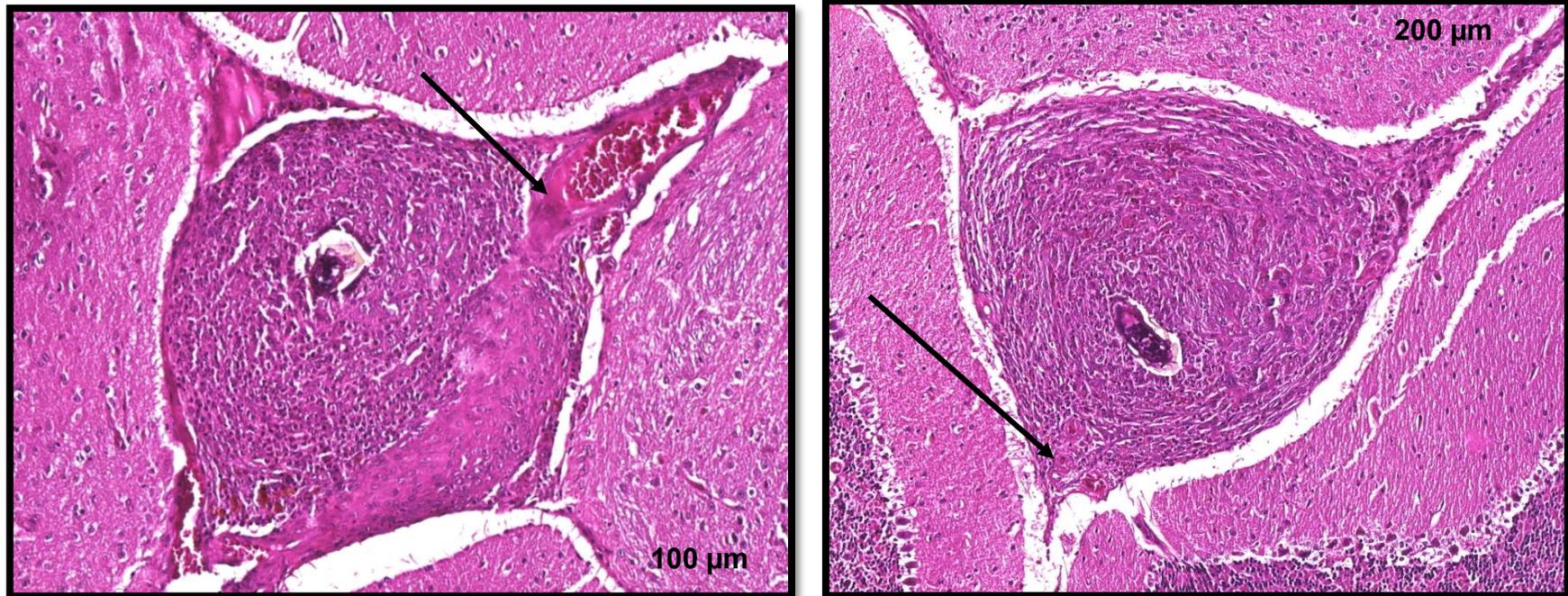


Figura 13 – Ovos de *S. mansoni* no cérebro de camundongos sintomáticos próximos á arteríolas cerebrais com necrose fibrinóide (seta).
Fonte: autor, 2018.

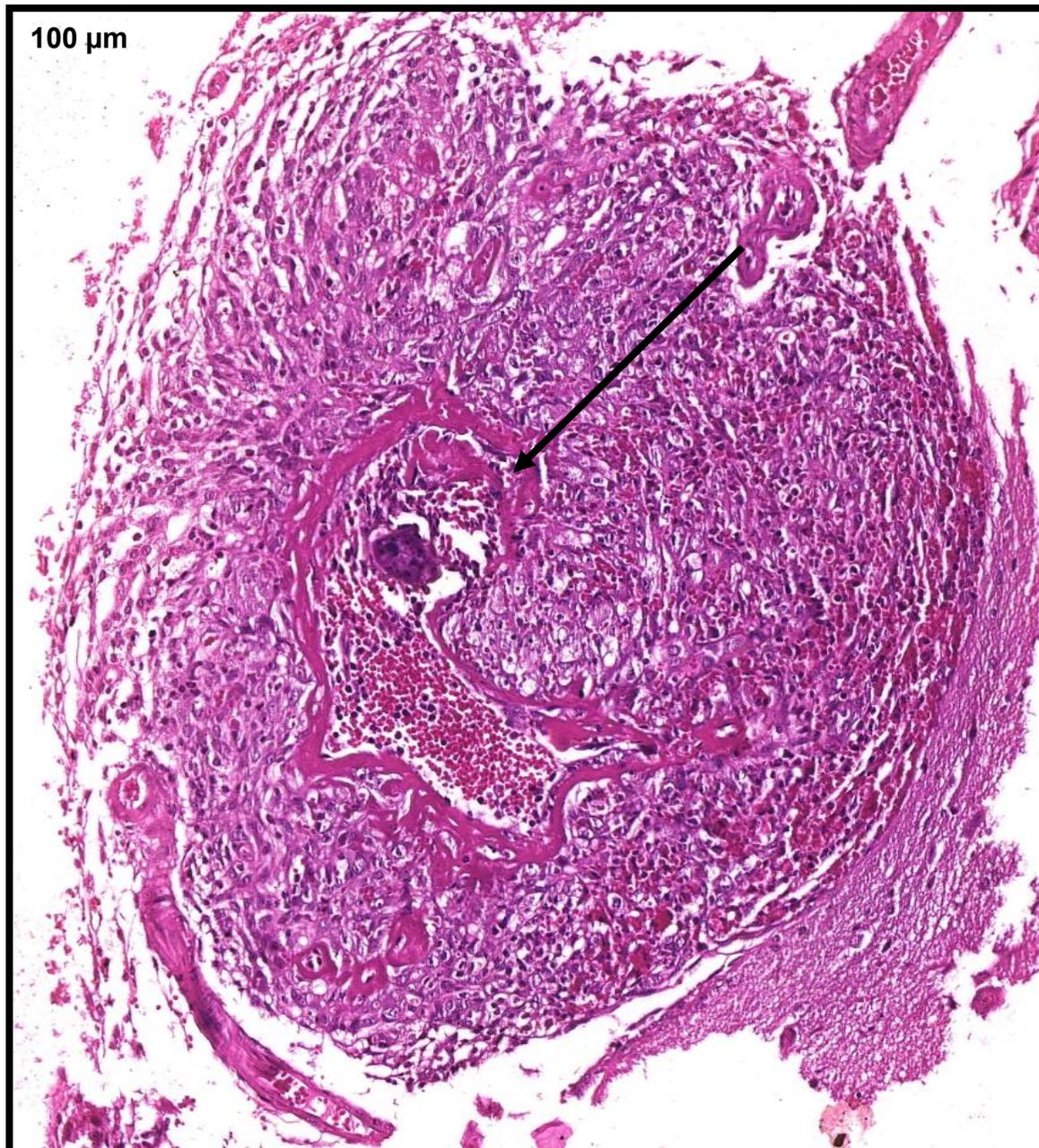


Figura 14 – Granuloma em torno de ovo de *S. mansoni* (seta). Artéria cerebral com necrose fibrinóide e ruptura da parede, onde o ovo tem contato com o tecido nervoso (cerebrelo).
Fonte: autor, 2018.

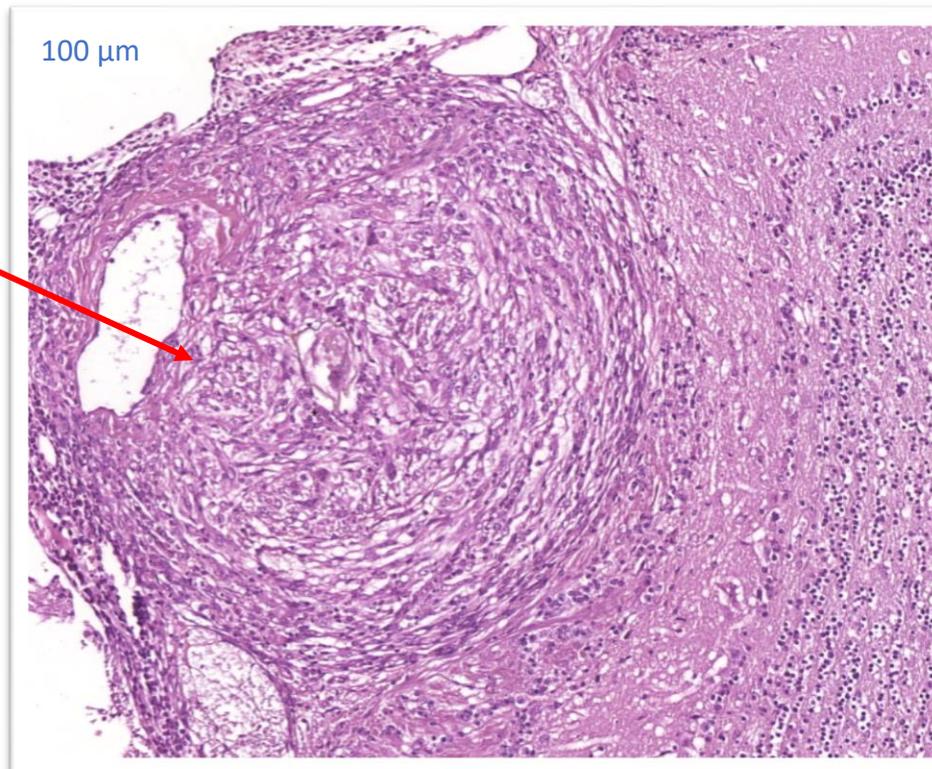
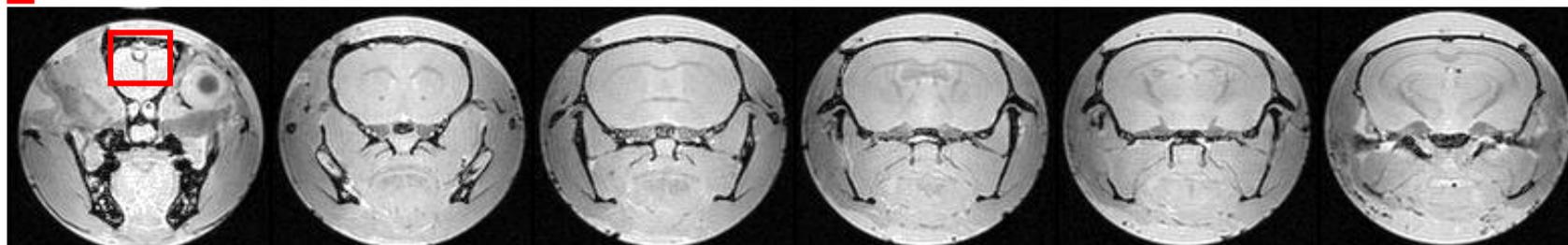


Figura 15 - Corte histológico mostrando lesão no trato olfatório. No detalhe, granuloma parcialmente fibrosado em torno de ovo do *S. mansoni*. Imagens da RM em ponderação em T1. Fonte: autor, 2018.



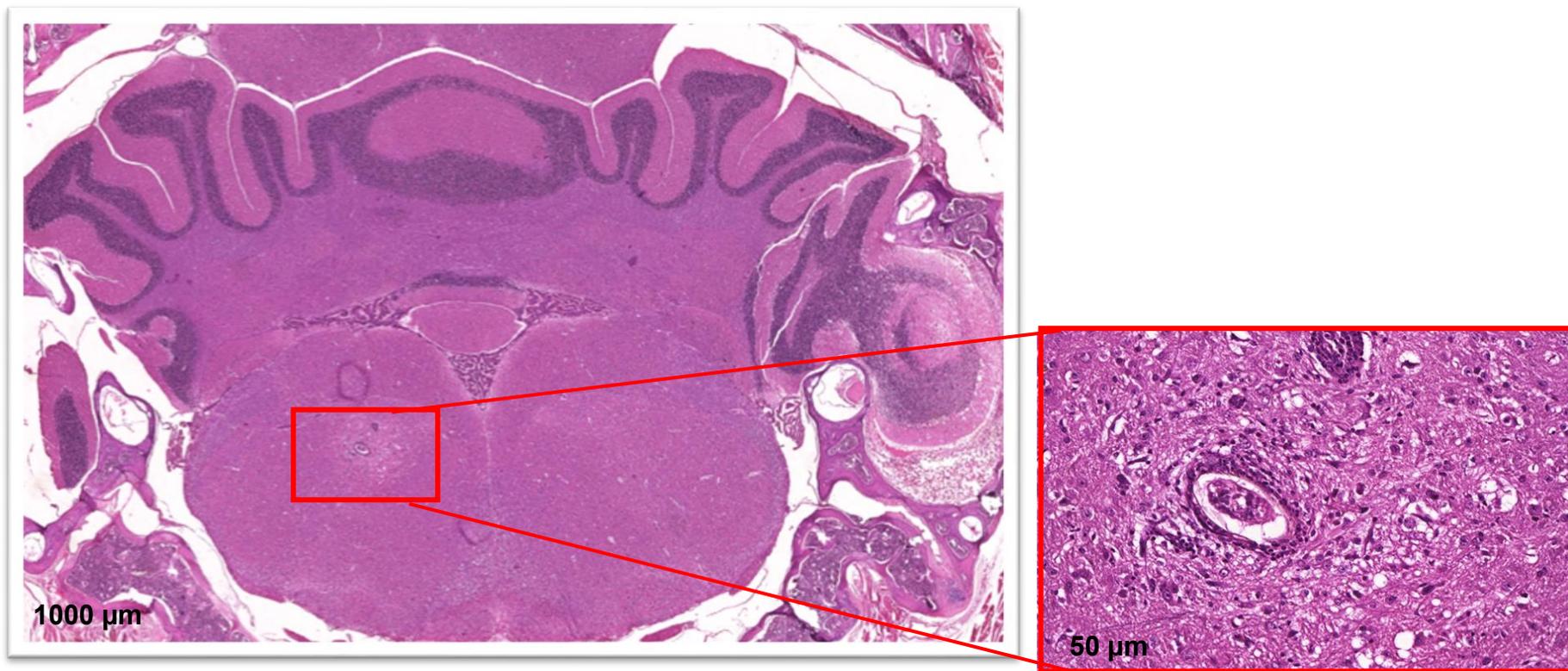


Figura 16 – Ovo de *S. mansoni* com discreta reação granulomatosa, em cérebro de camundongo infectado com 50 cercárias.
Fonte: autor, 2018.

PAPER IN ENGLISH

Murine model of neuroschistosomiasis mansoni: clinical, histological and magnetic resonance imaging studies

Thiago Andre A. Fidelis^{1,2}, Paulo Marcos Zech Coelho², Patricia Parreiras², Fernanda Tovar-Moll³, Fernanda Meireles³, Geraldo Brasileiro Filho⁴, José Roberto Lambertucci¹

1 Department of Internal Medicine, Division of Infectology and Tropical Medicine, School of Medicine, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.; 2 Schistosomiasis Laboratory, Rene Rachou Research Center, Oswaldo Cruz Foundation (Fiocruz), Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.; 3 CENABIO/Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brazil; 4 Department of Pathology, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

Received:2018 / Revised:2018 / Accepted: 2018
© The Author(s) 2018.

ABSTRACT

The schistosomiasis mansoni infection is responsible for 3.6% of the worldwide estimated causes of death and the central nervous system can be affected. In humans, the eggs of this helminth have been found in the leptomeninges, cerebral cortex, basal ganglia, choroid plexus, cerebellum and spinal cord. Neurological manifestations, histology and magnetic resonance imaging of neuroschistosomiasis mansoni in humans serve as our chief reference points for the examination of the experimental infections in murine model. In this study, experimental infection of *S. mansoni* cercariae in mice aims to demonstrate the presence of granulomas in the brain and correlate to the clinical, histologic, and magnetic resonance findings. Twenty five *Swiss-webster* mice were infected subcutaneously, and followed for 160 days post-infection. Another group of twenty five mice were not infected and kept as controls. Images were obtained in the different planes by magnetic resonance. Histological samples were stained by Hematoxylin and Eosin (HE) to examine *S. mansoni* eggs, granulomas and inflammatory lesions. The results showed neurological manifestations as head and chest tilt, (to the left or right side), hemiparesis, ataxia, body contortion, loss of balance and spinning, induced by granulomas in several regions of the central nervous system, and vascular changes associated with haemorrhages. The MRI indicated multiple irregular nodule dispersed associated with oedema. These findings indicate that the murine model subcutaneously infected by *S. mansoni* cercarie may be used for studying mechanisms leading to human neuroschistosomiasis.

Keywords: Schistosomiasis · Schistosomiasis mansoni · Neuroschistosomiasis murine model · Encephalitis · Neuroinfection

INTRODUCTION

The World Health Organization estimates that between 200 and 300 million people worldwide are infected with *Schistosoma spp.* and that 800 million people in the world are at risk of infection. In Brazil, approximately 8 million people are infected with *Schistosoma mansoni* and 800 million are exposed to infection (NAFTALE *et al.*, 2000; LAMBERTUCCI, 2012, 2014). (5)

Central Nervous System (CNS) involvement in schistosomiasis can occur during acute primary infections, but as the disease becomes chronic, neurological complications can occur as the newly forming of granulomas are smaller, shrunken and fibrotic (ALOE *et al.*, 1996; LAMBERTUCCI *et al.*, 2014). (2,5)

In the year of 1944, 800 people from Asia and attended at Moore General Hospital (North Caroline - United States of America) approximately 2% (160 people) developed cerebral complications attributed to schistosomiasis japônica (MOST, 1948). In Zimbabwe, Gelfand (1950) found *S. haematobium* eggs in the digested brains of 56% (28 people) of 50 patients with *S. haematobium* infection of the bladder. Alves (1958) found that in 28% of 150 unselected autopsy cases *S. haematobium* eggs were detected in the brain (PARENTI *et al.*, 1994). (9)

Neurological manifestations of schistosomiasis are caused by an increase in intracranial pressure, and the focal signs are triggered by the masses produced by granulomas, often in the productive phase with slight fibrosis, which suggested that the chronic phase of infection. The initial signs and symptoms include headache, focal or generalized seizures, ataxia, nystagmus, nausea and vomiting, intracranial hypertension and various neurological deficits (LAMBERTUCCI 2012, 2014). (5)

For many years, we have observed evidence of brain disease (hemiplegia, spinning and urinary retention) in mice infected with *Schistosoma mansoni*, but these mice were considered to have other diseases, such as labyrinthitis or cerebral infections.

Therefore, the relationship between microscopic findings and the neurological signs of encephalic involvement, such as hemiparesia, spinning, head tilt, chest tilt, ataxia, and balance could be established in this study.

Aloe *et al.* (1996) described eggs, both with and without granuloma formation, in *CD-1* mice infected with 60 *S. mansoni* cercariae (Puerto Rican strain). However, the mice did

not present the signs of brain disease. Additionally, Silva et al. (2002) observed very few eggs in the brains of small percentages of *BALB/c*, *C57BL/6* and *Swiss* albino mice that were infected once or five times with 30-50 cercariae (Feira de Santana strain) and concluded that the model was not suitable for studying neuroschistosomiasis (LAMBERTUCCI *et al.*, 2014). (2, 7,5)

Magnetic resonance imaging (MRI) is a non-invasive diagnostic technique that can readily detect gross features of brain tissue in order to exclude neurosurgical causes such as tumor or stroke. As observed in humans affected by brain schistosomiasis, we decided to apply, in this research, the MRI technics to verify the lesions associated to encephalic neuroschistosomiasis in the animal model.

Given these limited findings, we decided to further investigate murine neuroschistosomiasis, trying to answer these questions: (1). Identify the topography and granulomatous lesion; (2). Does the presence of brain granulomas in mice cause neuromotor deficits as described in humans; (3). Correlate the neurological manifestations to the sites of brain injury; (4). To describe the changes in the magnetic resonance image of the brain and to correlate with the encephalic lesions.

Our present findings indicate that chronic schistosomiasis in mice results in the granulomatous lesions in the CNS, proven by magnetic resonance imaging and presented neuromotor changes in subcutaneously infected animals.

MATERIALS AND METHODS

Mice and infection

Swiss-webster male mice, weighing approximately 20 g, were obtained from Oswaldo Cruz Foundation (Belo Horizonte, Brazil), and maintained under standard conditions. At 6 weeks of age, mice were infected subcutaneously with 50 cercariae of a LE strain of *S. mansoni*, maintained at the René Rachou Institute (Minas Gerais, Brazil) by passage in *Mus musculus* albino mice and in *Biomphalaria glabrata* snails. The origin and maintenance of the *S. mansoni* used in this study have been described previously by Pellegrino & Katz, 1968. All mice, infected and control animals, were provided with food and water *ad libitum*, under the 12-h light/12-h dark cycle, temperature $22 \pm 1^\circ\text{C}$ and air humidity of

40–50%.

At 88, 97 and 146 days post-infection, euthanasia procedures was performed (n=2/group), by CO₂ gas chamber, according to the guidelines and principles of the Brazilian Council on Animal Care and were approved by the local Institutional Animal Care Committees at the Federal University of Minas Gerais and the Rene Rachou Research Institute (FIOCRUZ/MG, Brazil). The *ex vivo* samples had a catheter placed into the right heart and perfused by a fixative solution of 10% paraformaldehyde (PFA). The worm recovery, was carried out as per the technique prescribed by Pellegrino and Siqueira (1956).

Clinical monitoring

SHIRPA protocol for phenotype assessment designed as a series of individual tests that gives data regarding the integrated function of cortical arousal, cerebral locomotor control, and neuromuscular function. Such test-specific performance is directly comparable between animals, over time, and between groups. The locomotor parameters, such as head and body rotation, absence of escape reaction, paresis, loss of balance reflex, altered muscle tone, ataxia and spinning were applied.

Magnetic Resonance Imaging

Mouse heads were removed and immersed in 10% PFA for more than 48 hours. To preserve the shape of the brains during imaging, the brains were left inside the skull. The experiments were performed on a 7T magnetic resonance scanner (MRI System 7T/210 ASR Horizontal Bore Magnet, Agilent Technologies). *Ex vivo* brain images were obtained using 3D T1 GRE (TR/TE: 370ms / 5ms, MATRIX: 128 x 96 x 96, FA: 35°, NEX: 13, FOV: 20 x 15 x 15 (mm), acquisition time: 12h 18 min), coronal MULTI ECHO (TE/TR: 3000ms / 9 ms, 3 ECHOS, NEX: 30, MATRIX: 128 x 128, FOV: 15 x 15 (mm), SLICES: 30, SLICE THICKNESS: 0,5 mm, no GAP, acquisition time: 3h12 min).

For each dataset, the images were visually inspected for artifacts. For image processing, the MRlcro software (<http://www.mccauslandcenter.sc.edu>) was

used to measure and compare the lesions dimensions with findings in histopathology.

Histological analysis

Imaging was done, brain and skull was immersed in 7 % nitric acid for decalcification. After 1 day (24 h), the whole skull was sectioned in 2-3 mm thick slices, and dove in 7% nitric acid for 24 h for complete decalcification. After that, the fragments were sectioned in 1.1 mm thick slices, each one placed in a parafiin block (10-11 blocks for each animal). Serial 4 μ m sections (obtained from 40-60 μ m intervals between each) from all paraffin blocks were stained with Hematoxylin and Eosin (HE). For each animal, 18-20 g weighing, sections were examined in light microscope, looking for any morphological lesion, especially schistosoma eggs and/or granulomas.

The right hemisphere of each animal's skull was stained with Nankin® ink for identification.

Brain topography

Was performed using Allen brain atlas, data portal (<http://mouse.brain-map.org/static/atlas>).

Statistical analysis

When significant differences were obtained, comparisons between groups were carried out by Fisher's test. Analyzes were performed in the STATA 12.0 software (Stata Corporation, College Station, Texas) at 5% level of significance.

RESULTS

Neurological alterations appeared at 88, 97 and 146 days post-infection. Euthanasia occurred immediately after the emergence of the neurological signs.

Neurological manifestations

The neuromotor alterations were head and chest tilt, right and left paresis, imbalance reflexes, ataxia and rotational motion (spinning) (Table 1) (Figure 1).

Table 1 – Neurological manifestation observed in three mice infected with 50 cercariae in FIOCRUZ/Brazil laboratory, 2016-2017

NEUROLOGICAL MANIFESTATIONS	Infected		Control		<i>p</i>
	n	%	n	%	
Spinning	3	12,0	0	0,0	0,235
Head tilt (right side)	2	8,0	0	0,0	0,490
Head tilt (left side)	1	4,0	0	0,0	0,999
Chest tilt (right side)	2	8,0	0	0,0	0,490
Right hemiparesis	1	4,0	0	0,0	0,999
Left hemiparesis	2	8,0	0	0,0	0,490
Ataxia	3	12,0	0	0,0	0,235
Imbalance	3	12,0	0	0,0	0,235

MRI evaluation

MRI images enhanced abnormalities in encephalic parenchyma of the symptomatic animals in comparison to the control mice images. The histopathological features present in these infected mice revealed the tumor mass caused by the granulomatous reaction (Figure 2). On MRI there were signs suggesting hemorrhages inside the brain (Table 2).

Tabela 2 – MRI topography of encephalic lesions attributed to *S. mansoni* eggs and granulomatous reaction, of three infected mice subcutaneously, CENABIO/UFRJ*, 2016 - 2017.

TOPOGRAFIA	Infected		Control		<i>p</i>
	n	%	n	%	
Limbic lobe	2	8,0	0	0,0	0,490
Sensoriomotor area (cerebral cortex)	3	12,0	0	0,0	0,235
Visual area (cerebral cortex)	2	8,0	0	0,0	0,490
Auditory area (cerebral cortex)	1	4,0	0	0,0	0,999
Fissures of cerebellar cortex	2	8,0	0	0,0	0,490
Brainstem	2	8,0	0	0,0	0,490
III Ventricle	1	4,0	0	0,0	0,999
IV Ventricle	1	4,0	0	0,0	0,999

*Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brazil.

Histological brain topography

Morphological examination of serial coronal brain sections showed *S. mansoni* eggs or granulomas found in the olfactory tract, limbic lobe, cerebral cortex, cerebellum cortex, brain stem, III and IV ventricles (Table 3). The granulomas were localized in proximity to arteries, suggesting that the ova gain access to the CNS via the arterial system. Red blood cells were also observed in some brain areas.

Tabela 3 - Topography of brain lesions attributed to *S. mansoni* eggs, Department of Pathological Anatomy/Faculty of Medicine/UFMG*, 2016 - 2017.

TOPOGRAPHY OF LESIONS	Infected		Control		<i>p</i>
	n	%	n	%	
Olfactory tract	2	8,0	0	0,0	0,490
Limbic lobe	3	12,0	0	0,0	0,235
Sensorialmotor area (cerebral cortex)	3	12,0	0	0,0	0,235
Visual area (cerebral cortex)	2	8,0	0	0,0	0,490
Audictory area (cerebral cortex)	1	4,0	0	0,0	0,999
Fissures cerebellar cortex	2	8,0	0	0,0	0,490
Brainstem	2	8,0	0	0,0	0,490
III Ventricle	1	4,0	0	0,0	0,999
IV Ventricle	2	8,0	0	0,0	0,490

*Universidade Federal de Minas Gerais, Brazil.

Histological analysis

Eggs of *S. mansoni* were disseminated in the right and left cerebral hemispheres, in regions of the leptomeninges, cerebral and cerebellar parenchyma and brainstem. In all samples, the eggs reached the encephalon by arteriolar system (Figure 3).

Ova surrounding the epithelioid granulomatous infiltrate were most frequent in the leptomeninges, fissures and ventricles, both in the brain and in the cerebellum. *S. mansoni* eggs with low inflammatory reaction were common in the cerebral and cerebellar parenchyma. All the eggs observed had miracidium, proving recent deposition in the encephalon.

The inflammatory exudate cells were made of macrophages, eosinophils, lymphocytes. Fibroblasts and areas with collagen deposits were also present (Figure 3).

DISCUSSION

Swiss Webster mice subcutaneously infected with 50 cercariae of the *S. mansoni* LE strain, presented the following neurological manifestations: spinning, hemiparesis, cervical and chest tilt (right and left), ataxia, loss of balance and body contortion. MRI image showed morphological changes of the encephalon with bilateral focal hypersignal. The results corroborate with brain lesions, confirmed by histology. Three samples presented viable eggs of *S. mansoni* near arterioles and red blood cells.

This is the first description of relationship between brain lesions and neurological signs in *Swiss-webster* murine model infected subcutaneously with *S. mansoni* cercariae.

Andrade et al. (2002) concluded that experimental *Schistosoma mansoni* model of *Swiss-webster* mice was not suitable for experimental neuroschistosomiasis. However, the design of their study was based on the digestion of mice organs; the entire encephalus was digested in 60ml of a 4% potassium hydroxyde solution for the counting of eggs. Microscopic search of eggs were collected after sedimentation for several hours. The design of our study differs entirely from the above reported. Moreover, mice presented neurological alterations after 88 days of infection in our experiment, whereas in the previous study, mice were sacrificed 31, 40 and 52 days after cercariae injection.

Animals were observed until 160 days post infection. At that time, 3 mice (12%) presented neurological manifestations suggestive of brain injury. The first symptomatic animal was sacrificed at 88 days post-infection, the second at 97 days and the third at 146 days. The control animals of the respective symptomatic did not present neurological alterations.

Qualitative SHIRPA protocol was applied based on gradations by scores to track basic neurological functions (PINTO *et al.*, 2014). Such protocol integrates the functions related to skeletal striated muscle, sensory systems, motor neuron, autonomic system and spinocerebellar pathways. The neurological

manifestations are consistent with characteristic changes of central nervous system (CNS) functional damages.

Histo-topographic survey of the mice brain identified granulomatous lesions disseminated in the cerebral hemispheres, in sensorimotor, somatosensory, visual and auditory cerebral cortex areas, cerebellum fissures, olfactory tract, III and IV ventricles, limbic lobe and brainstem. Associated to granulomatous lesions were observed leptomeningeal thickening in cerebral cortex. The microscopic picture is characterized by granulomas constituted by macrophages, eosinophils, lymphocytes and giant cells around the ova. Fibroblasts and focal collagen are also present (Figure 5).

Aloe *et al.* (1996, 2001) described schistosome eggs in histological sections from the brain of mice and reported that mice with *S. mansoni* periovular granulomas in the brain showed decrease of nervous growth factor expression. Based on such findings, Fiore *et al.* (1996, 1997) reported that mice infected with *S. mansoni* exhibited behavioral disturbances, probably associated with modifications in the levels of nerve growth factor and cytokines induced by granulomas. These two reports did not indicate how frequently *S. mansoni* eggs reach the CNS of the mouse. There was also no sign of neurologic involvement.

The MRI image suggesting haemorrhages are described herein. There are no reports about MRI image that correlate with brain lesions by neuroschistosomiasis mansoni in the murine model (Figure 4).

Haemorrhages in the subarachnoid and intraparenchymal in the cerebral and cerebellar regions were identified by histological samples. The proximity of eggs and granulomas of *S. mansoni* to the arterioles suggests that the penetration into the CNS in the murine model occurred via the arteriolar route. Often the arteriole wall presented an inflammatory pattern (arteritis) of fibrinoid necrosis (Figure 3).

Pitella *et al.* (1981, 1985) studied human brains and identified within the cerebral arteries *S. mansoni* eggs surrounded by mononuclear inflammatory cells. Herein we observed segmental ruptures and alterations of the epithelium with arterial

fibrinoid necrosis (Figures 10, 11).

In summary, the present study demonstrates that the infection of *Swiss-webster* mice by *S. mansoni* cercariae develops a neurological disease quite similar to the neuroschistosomiasis described in humans.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to acknowledge funding from the CAPES, CNPq, FAPEMIG and the CENABIO (Nacional Center of Bioimage) for use of its facilities". The author would like to thank Dr. Marcelo Henrique Mamede and Eduardo Paulino, both professors from Federal University of Minas Gerais, for the images of neuropathological lesions used in this paper, and to thank Dr. Fausto Edmundo Pereira, from Federal University of Espirito Santo, for critical discussion of this subject. This work is part of the PhD Thesis of Thiago Andre A. Fidelis. The author would also like to acknowledge a large body of researchers from Rene Rachou Intitute Research Center in Minas Gerais.

REFERENCES

1. Aloe L, Moroni R, Angelucci F, Fiore M (1997) Role of TNF- α but not NGF in murine hyperalgesia induced by parasitic infection. *Psychopharmacology (Berl)* 134:287–292. doi: 10.1007/s002130050451
2. Aloe L, Moroni R, Fiore M, Angelucci F (1996) Chronic parasite infection in mice induces brain granulomas and differentially alters brain nerve growth factor levels and thermal responses in paws. *Acta Neuropathol* 92:300–305. doi: 10.1007/s004010050522
3. Fiore M, Aloe L (2001) Neuroinflammatory Implication of *Schistosoma Mansoni* Infection in the Mouse. *Arch Physiol Biochem* 109:361–364. doi: 10.1076/apab.109.4.361.4247
4. Lambertucci JR, Fidelis TA, Pereira TA, Coelho PMZ, Araujo N, de Souza MM, Brasileiro Filho G, Pereira FEL, Antunes CM (2014) Brain schistosomiasis in mice experimentally infected with *Schistosoma mansoni*. *Rev Soc Bras Med Trop* 47:251–253. doi: 10.1590/0037-8682-0083-2013
5. Aloe L, Pathophysiology B, Superiore I, Elena R (1996) *Schistosoma mansoni* : Influence of Infection on Mouse Behavior flukes that infect humans are *Schistosoma man-* may escape host immune reactions by releasing. 54:46–54
6. Silva LM, De Oliveira CN, Andrade ZA (2002) Experimental neuroschistosomiasis - Inadequacy of the murine model. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 97:599–600. doi: 10.1590/S0074-02762002000400028
7. Vale TC, De Sousa-Pereira SR, Ribas JGR, Lambertucci JR (2012) Neuroschistosomiasis mansoni: Literature Review and Guidelines. *Neurologist* 18:333–342. doi: 10.1097/NRL.0b013e3182704d1e
8. Pollner, JH, Schwartz A, Kobrine A and Parenti DM (1994) Cerebral Schistosomiasis Caused by *Schistosoma haematobium*: Case Report. *Clinical Infectious Diseases* 1994;18:354-7.
9. Pittella, JEH, Lana-Peixoto M. (1981) Brain involvement in hepatosplenic schistosomiasis mansoni. *Brain* 104: 621-632.
10. Pittella, JEH (1985) Vascular changes in cerebral schistosomiasis mansoni: a histopathological study of fifteen cases. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 34(5): 898-902

FIGURES

A.



B.



Figure 1. A. Swiss Webster mice infected with 50 cercariae of *S. mansoni*. The animal presented head tilt for the left side. B. Mice not infected (control), with habitual posture.

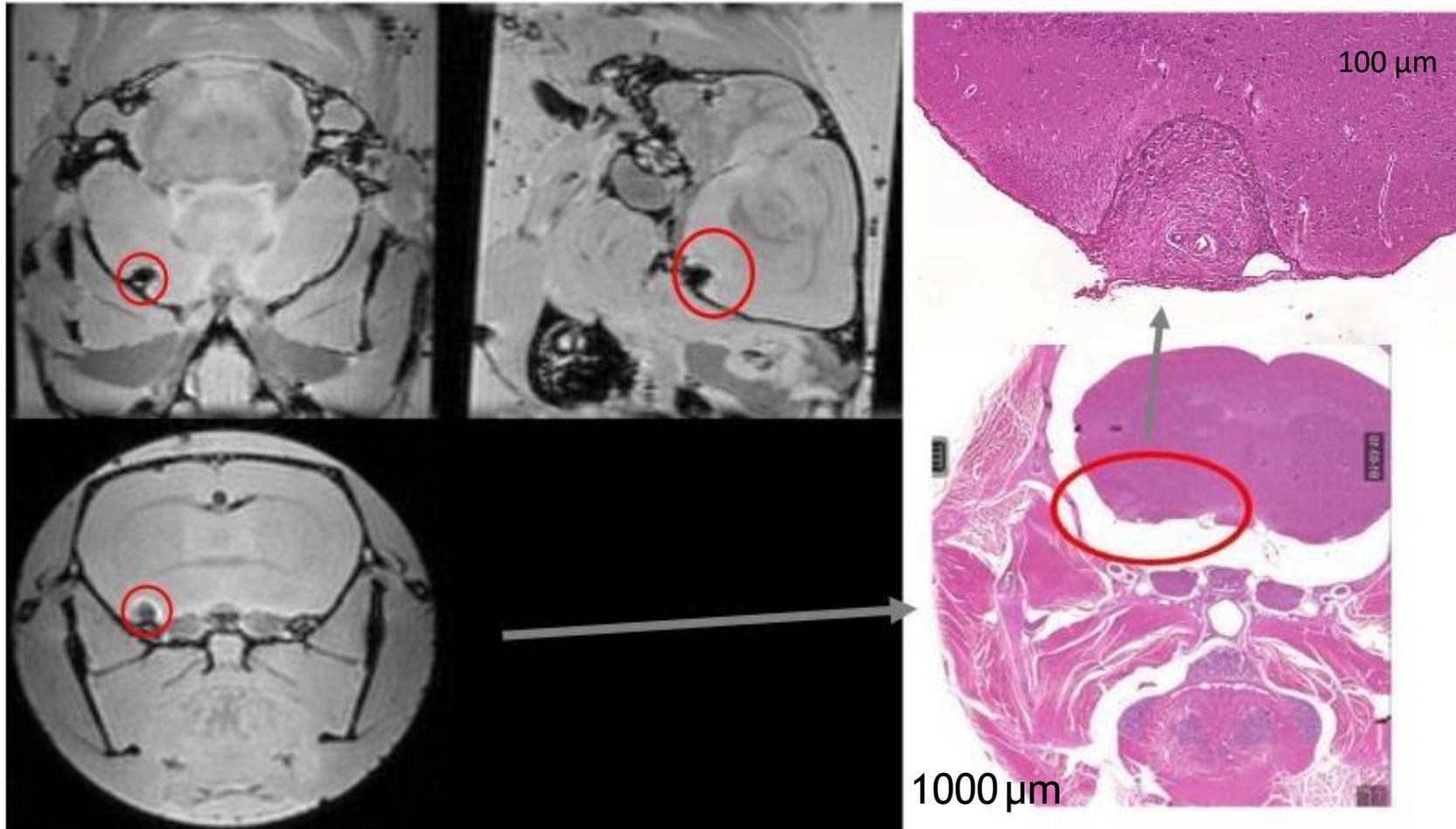


Figure 2 – Serial brain slices from the brain of the mouse, showing lesions due to *S. mansoni*. T1-weighted sequences images. Nodular lesion surrounding the parasite egg (HE), located in the piriform area.

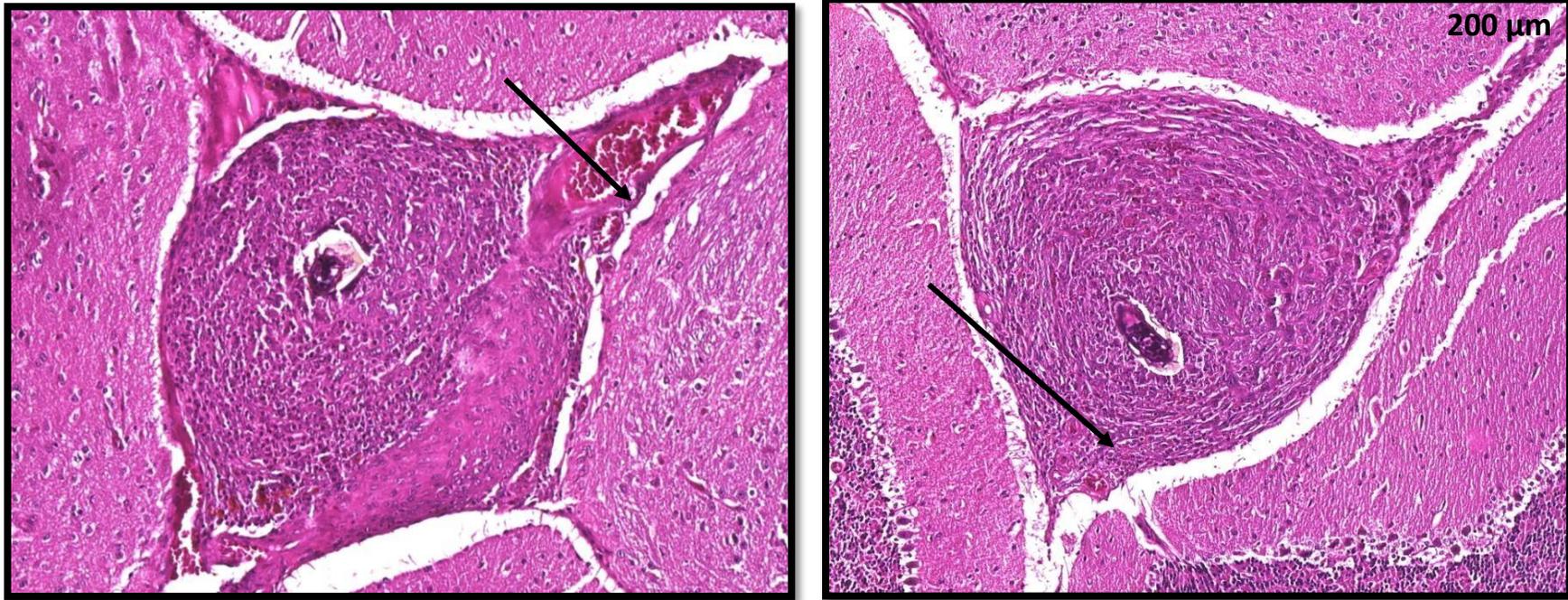


Figura 3 – *S. mansoni*'s eggs in the brains tissue from symptomatic mice. Arrows shown arteritis and fibrinoid necrosis.

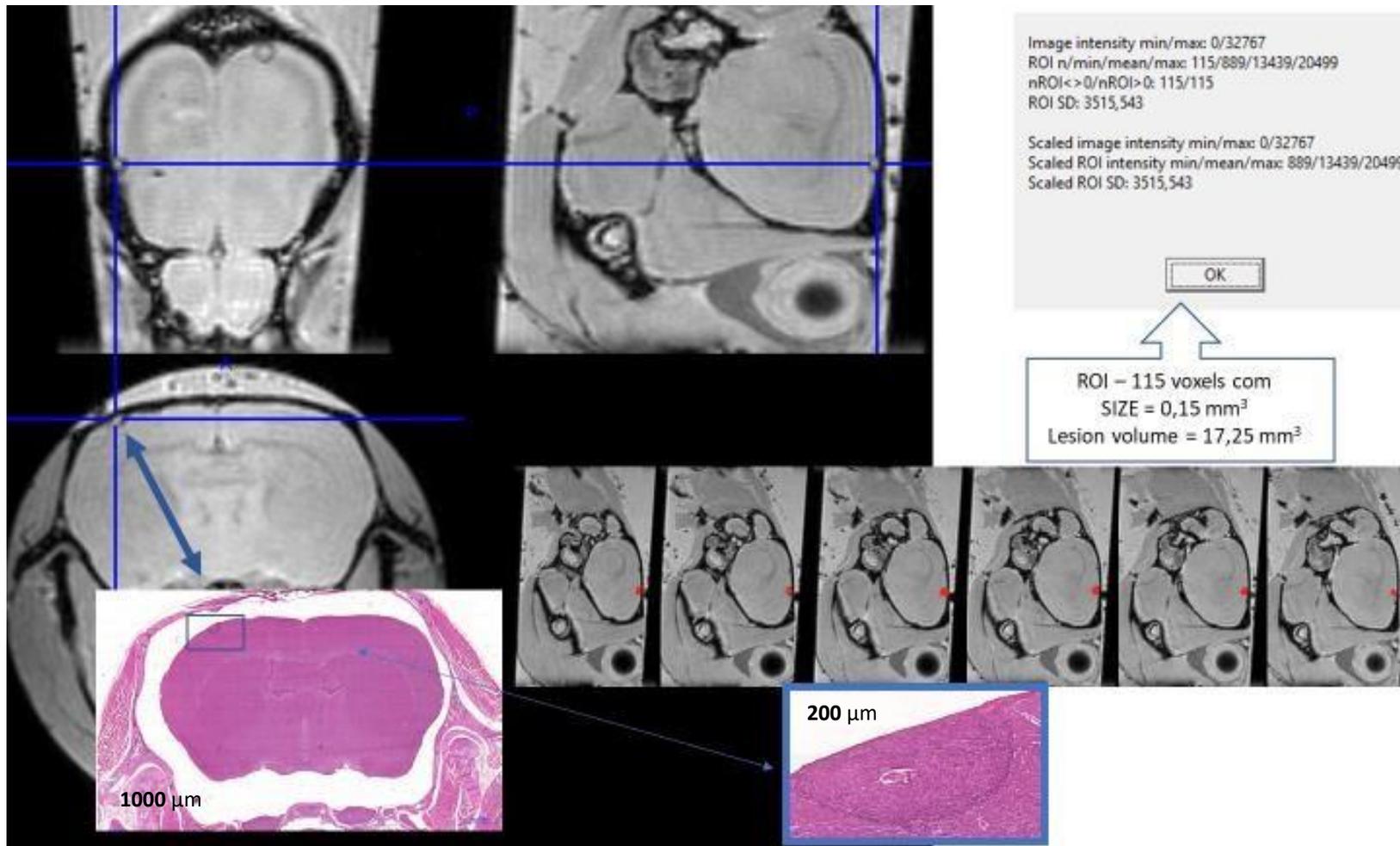


Figura 4 - T1-weighted sequences images, demonstrating the volume of the lesion.

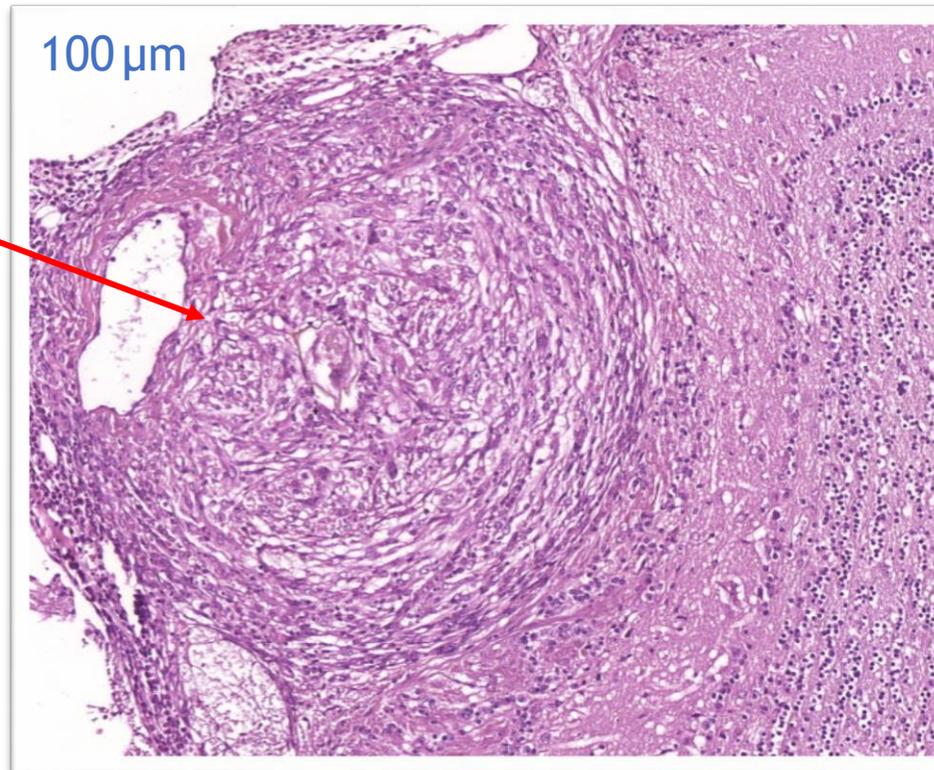


Figura 5 –
Histological slice
of the olfactory
tract (HE). T1-
weighted
sequences images
showing the MRI
lesion

