

Universidade Federal de Sergipe
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-graduação em Biologia Parasitária

**Desenvolvimento de modelo experimental de
mielorradiculopatia esquistossomótica**

Tiago Pinheiro Vaz de Carvalho

São Cristóvão

2014

Tiago Pinheiro Vaz de Carvalho

**Desenvolvimento de modelo experimental de
mielorradiculopatia esquistossomótica**

Dissertação apresentada ao Núcleo de Pós-graduação em Biologia Parasitária da Universidade Federal de Sergipe como parte dos requisitos para a obtenção do grau de mestre em Biologia Parasitária

Orientadora: Prof. DSc. Karina Conceição G. M. de Araújo.

São Cristóvão

2014

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE

Carvalho, Tiago Pinheiro Vaz de

C331d Desenvolvimento de modelo experimental de mielorradiculopatia esquitossomótica / Tiago Pinheiro Vaz de Carvalho ; orientador Karina Conceição G. M. de Araújo. – São Cristovão, 2014.

39 f.: il.

Dissertação (mestrado em Biologia Parasitária) – Universidade Federal de Sergipe, 2014.

1. Neuroesquistossomose. 2. Schistosoma mansoni. 3. Esquistossomose – Medula espinhal - Modelos animais. I. Araújo, Karina Conceição Gomes Machado de, orient. II. Título.

CDU 616.995.122



Universidade Federal de Sergipe
 Pró-reitoria de pós-graduação e pesquisa
 Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária
 Telefone 2105.6340 E-mail: probp.ufs@gmail;
 kkkaraujo2006@yahoo.com.br



**Ata da Sessão de Defesa da 18ª Dissertação do
 Curso de Mestrado em Biologia Parasitária/2014**

Ao oitavo dia de maio de dois mil e catorze, com início às oito horas e trinta minutos, realizou-se na sala do NUPEC, Departamento de Biologia, São Cristóvão-Sergipe, a sessão pública de defesa de dissertação de Mestrado em Biologia Parasitária de Tiago Pinheiro Vaz de Carvalho, sob o título “**Desenvolvimento de modelo animal de mielorradiculopatia esquistossomótica.**”, orientado pela Profª. Drª. Karina Conceição Gomes Machado de Araújo (PROBP/UFS). Aberta a sessão, a Profª. Drª. Karina Conceição Gomes Machado de Araújo, Presidente da Banca Examinadora, passou à palavra ao candidato para a apresentação pública de seu trabalho. Em seguida, a Presidente passou a palavra à primeira examinadora, a Profª. Drª. Teresa Cristina de Abreu Ferrari (UFMG) para arguição do candidato, que teve igual período para sua defesa. O mesmo aconteceu com a segunda examinadora, a Profª. Drª. Tatiana Rodrigues de Moura (PROBP/UFS). Ao término da arguição das examinadoras, a Profª. Drª. Karina Conceição Gomes Machado de Araújo agradeceu os comentários e sugestões dos membros da banca. Encerrados os trabalhos, a banca examinadora deliberou sobre a aprovação do candidato. A banca concedeu o parecer APROVADO ao candidato, sendo atendidas as exigências da Instrução Normativa 05/2011/PROBP, da Resolução nº 05/2009/CONEP que regulamenta a apresentação e defesa da Dissertação de Mestrado. Nada mais havendo a tratar, a Coordenadora lavrou a presente ata que será assinada pelos examinadores e pelo candidato.

Cidade Universitária Prof. José Aloísio de Campos, 08 de maio de 2014.

Karina Conceição G.M. de Araújo
 Profª. Drª. Karina Conceição Gomes Machado de Araújo
 Presidente

Teresa Cristina A. Ferrari
 Profª. Drª. Teresa Cristina de Abreu Ferrari
 Examinadora

Tatiana R. de Moura
 Profª. Drª Tatiana Rodrigues de Moura
 Examinadora

Tiago Pinheiro Vaz de Carvalho
 Tiago Pinheiro Vaz de Carvalho
 Mestrando

"Uma fortaleza é construída quando os homens que nela trabalham são fortes como a rocha onde está sendo erguida, sendo assim sua construção é consistente como um empreendedor que busca na criação de sua mente e de seu esforço físico, transformar as rochas de seu trabalho em uma sólida e magnífica fortaleza."

(Vitor Marques)

Agradecimentos

Primeiramente gostaria de agradecer à minha orientadora Karina Conceição por ter me aceitado como orientando e guiado por toda a jornada acadêmica e profissional. Um exemplo de pessoa dentro e fora da universidade, seu prazer pela docência e pesquisa é cativante. Agradeço também à Josimari de Santana pela orientação, crucial para minha iniciação em estudos laboratoriais além de ser outro grande exemplo de profissional. Sinto-me honrado em ser orientado e ter trabalhado em conjunto com estas duas profissionais.

Sinceros desejos às famílias NUPEGEOS, LAPENE e FIOCRUZ-PE por todo apoio e companheirismo dado. Não há dúvida que a amizade sobrepõe a parceria acadêmica. Um agradecimento em especial à Kamilla Mayara e Wheverton Nascimento por todo suporte que me foi dado, apesar de jovens, possuem muita maturidade e não há dúvida que a carreira já está traçada com louvor. Agradeço também ao PROBP, por dar toda a base técnica e formação. Desde a secretaria e coordenação, até ao corpo docente, sempre solícito.

Além da vertente profissional, há a vertente pessoal e todas as pessoas que atuaram direta ou indiretamente no meu sucesso. Agradeço à minha família e amigos por toda a compreensão, paciência e suporte emocional. Inúmeras vezes precisei abdicar minha presença em prol da pesquisa. Agradeço a minha mãe Simone e meu pai Ney, além de minha tia Silvana, avós Maria Anita e José Pinheiro e minha namorada Cecília além dos amigos da pós-graduação e extensão universitária. Uma formação *stricto sensu* não depende apenas do desenvolvimento de pesquisas e docência, vai muito mais além e essas pessoas estruturaram meu pilar emocional.

Ademais, agradeço a todos que não foram citados, mas merecem meu sincero muito obrigado!

Desenvolvimento de modelo experimental de mielorradiculopatia esquistossomótica

Tiago Pinheiro Vaz de Carvalho¹; Karina Conceição Gomes Machado de Araújo²; Josimari Melo de Santana³

- 1- Programa de Pós-graduação em Biologia Parasitária, Universidade Federal de Sergipe.
- 2- Departamento de Morfologia, Universidade Federal de Sergipe.
- 3- Departamento de Fisioterapia, Universidade Federal de Sergipe.

RESUMO

Mielorradiculopatia esquistossomótica (MRE) é uma forma grave de apresentação da esquistossomose, em que a medula espinhal é acometida por espécies de *Schistosoma*. Este estudo teve como objetivo o desenvolvimento de modelo animal de MRE causada pelo *S. mansoni*, além de caracterizar as alterações sensoriais e motoras ocasionadas pelo depósito de ovos do *S. mansoni* na medula espinhal e correlacionar os aspectos sensoriais, motores e histológicos nos animais em função do tempo. Realizou-se testes de sensibilidade mecânica, comportamentais e posterior eutanásia em duas séries (infectada e controle) de animais divididas em seis grupos com 5 ratos *Wistar* machos cada nos 5^o, 10^o, 20^o e 30^o dias da pós-infecção. Os grupos experimentais foram anestesiados com halotano e injetou-se uma suspensão de ovos de *S. mansoni* no espaço subaracnóideo. Os animais controle foram submetidos ao mesmo procedimento, porém com administração de solução tampão-fosfato (PBS). A medula espinhal foi removida, submetida a análise histológica entre T10 e L5. Constatou-se redução na sensibilidade mecânica superficial, da sensibilidade térmica e da força muscular ocasionadas pelos ovos do *S. mansoni* na medula espinhal; Observou-se alterações no tecido nervoso de 25% dos animais após a infecção de *S. mansoni*. O modelo desenvolvido mostrou-se satisfatório para avaliação das alterações funcionais em ratos *Wistar*, podendo ser útil para estudos da etiopatogenia da MRE.

Palavras-chave: Neuroesquistossomose; *Schistosoma mansoni*; Modelos Animais; Hiperalgisia;

Development of experimental model of schistosomal myeloradiculopathy

Tiago Pinheiro Vaz de Carvalho¹; Karina Conceição Gomes Machado de Araújo²; Josimari Melo de Santana³.

- 1- *Postgraduate Program in Parasitic Biology, Federal University of Sergipe.*
- 2- *Department of Morphology, Federal University of Sergipe.*
- 3- *Department of Physical Therapy, Federal University of Sergipe.*

ABSTRACT

Schistosomal myeloradiculopathy (SMR) is a severe form of presentation of schistosomiasis, in which the spinal cord is affected by species of Schistosoma. This study aimed to develop an animal model of SRM caused by S. mansoni, and characterize the sensory and motor changes caused by the deposition of eggs of S. mansoni in the spinal cord and correlate the sensory aspects, engines and histological animals in function of time. Held mechanical sensitivity tests, behavioral and subsequent euthanasia in two series (infected and control) animals divided into six groups of five male Wistar rats each in 5, 10, 20 and 30 days post-infection. The experimental groups were anaesthetized with halothane and injected with a suspension of S. mansoni eggs in the subarachnoid space. Control animals underwent the same procedure, but with phosphate buffer solution administration (PBS). The spinal cord was removed, subjected to histological analysis of T10 and L5. It was observed reduction in surface mechanical sensitivity, thermal sensitivity and muscle strength caused by the eggs of S. mansoni in the spinal cord; Changes observed in nervous tissue of 25% of the animals following infection of S. mansoni. The model proved to be suitable for evaluation of functional changes in rats and may be useful for pathogenesis studies of MRE.

Key-words: Neuroschistosomiasis; Schistosoma mansoni; Models, Animal; Hyperalgesia.

Lista de Abreviaturas

MRE - Mielorradiculopatia esquistossomótica

SNC - Sistema nervoso central

D5 - 5º dia experimental

D10 - 10º dia experimental

D20 - 20º dia experimental

D30 - 30º dia experimental

PBS - Solução estéril tampão-fosfato

C1 - 1ª vértebra cervical

L4 - 4ª vértebra lombar

L5 - 5ª vértebra lombar

L6 - 6ª vértebra lombar

Lista de Figuras

Figura 1.	20
Figura 2.	24
Figura 3.	25
Figura 4.	26
Figura 5.	26
Figura 6.	26

Lista de Tabelas

Tabela 1.	24
Tabela 2.	25
Tabela 3.	25

Sumário

1. Introdução	13
2. Justificativa	14
3. Revisão de Literatura	14
4. Hipótese	20
5. Objetivos	20
6. Métodos	20
7. Resultados	25
8. Discussão	29
9. Conclusão	32
10. Referências	32
Anexo 1	40

1.Introdução

A esquistossomose é uma das doenças parasitárias mais prevalentes no mundo (ZHANG, 2010). Embora o aparelho digestivo seja o habitat natural do nematódeo, as formas ectópicas são comumente observadas, incluindo aquelas que acometem o sistema nervoso central, sendo esta apontada como uma das principais causas entre as mielopatias não traumáticas. A mielorradiculopatia esquistossomótica (MRE) é uma forma grave de apresentação da esquistossomose, em que o sistema nervoso é acometido pelo parasito, particularmente pelo *Schistosoma mansoni* e *S. haematobium* (STEINMANN, 2006).

A patogenia da MRE ainda permanece desconhecida. Os dados mais conclusivos sugerem que a resposta inflamatória é desencadeada pelo depósito dos ovos no tecido nervoso que desencadeia a formação de granulomas ou massas expansivas. O diagnóstico da MRE por meio de análise do líquido cefalorraquidiano é uma ferramenta que está em desenvolvimento e sua padronização facilitará a identificação precoce de casos de MRE (Ferrari, 2010).

O principal obstáculo ao desenvolvimento de um modelo animal para a MRE é o desenvolvimento de um protocolo de infecção que retrate com fidedignidade a etiopatogenia da doença. Na revisão de Fiore e Aloe (2001), os ratos com neuroesquistossomose apresentaram hiperalgesia em decorrência da formação de granuloma (FIORE, 2001). Outro estudo do mesmo grupo indicou que o modelo murino de infecção pode ser utilizado para estudar os mecanismos da neuroesquistossomose em humanos (FIORE, 1996). Recentemente, em um estudo chinês foi apresentado um modelo experimental de esquistossomose cerebral. Os pesquisadores infectaram coelhos com ovos de *S. japonicum* associaram as manifestações clínicas à análise morfológica e patogenia da neuroesquistossomose. Os resultados foram satisfatórios para a esquistossomose cerebral e cruciais para o desenvolvimento de novos estudos (PENG WANG, 2011).

2. Justificativa

A esquistossomose mansônica é endêmica em diversas regiões tropicais e subtropicais do mundo, inclusive no estado de Sergipe. Ademais, no Brasil existe a crescente descoberta de novos casos de MRE, entretanto, pouco se sabe sobre esta forma medular. Considerando que a MRE é uma doença de difícil diagnóstico, que muitas vezes é feito por exclusão, e que existem lacunas em sua fisiopatologia, é necessário o desenvolvimento de pesquisas em modelos animais para a MRE. Apesar do desenvolvimento crescente de pesquisas sobre a MRE, são escassos estudos envolvendo experimentação com modelo animal desta doença. O desenvolvimento de um modelo experimental para a doença em questão possibilitaria a realização de estudos sobre a fisiopatologia da doença e suas conseqüências orgânicas, para posterior contribuição no estabelecimento de diagnósticos, tratamentos farmacológico e fisioterapêutico, melhorando a sobrevida de pacientes com MRE. Há economia de tempo, recursos humanos e recursos financeiros, além de aumentar a variedade de pesquisas acerca da neuroesquistossomose.

3. Revisão de Literatura

3.1. Esquistossomose Mansônica

A esquistossomose mansônica representa um grave problema de saúde pública, acometendo cerca de 78 países com uma estimativa populacional de 249 milhões de infectados e 745 milhões de residentes em área endêmica, principalmente em comunidades rurais com expansão para os centros urbanos, relacionada com precárias condições de higiene e inadequados recursos sanitários. No Brasil, há condições ideais para o desenvolvimento e crescente expansão da doença tais como, elevadas temperaturas, precipitações, presença de hospedeiros intermediários (WHO, 2014). Um dos estados com a maior prevalência de esquistossomose no Brasil é o estado de Sergipe, segundo dados do ministério da saúde, a média de prevalência de esquistossomose é acima de 15% (Ministério da Saúde, 2009). Mais recentemente, Rollemberg e colaboradores observaram que dos 75 municípios sergipanos, o programa de controle de esquistossomose obteve dados relativos a 42 municípios em

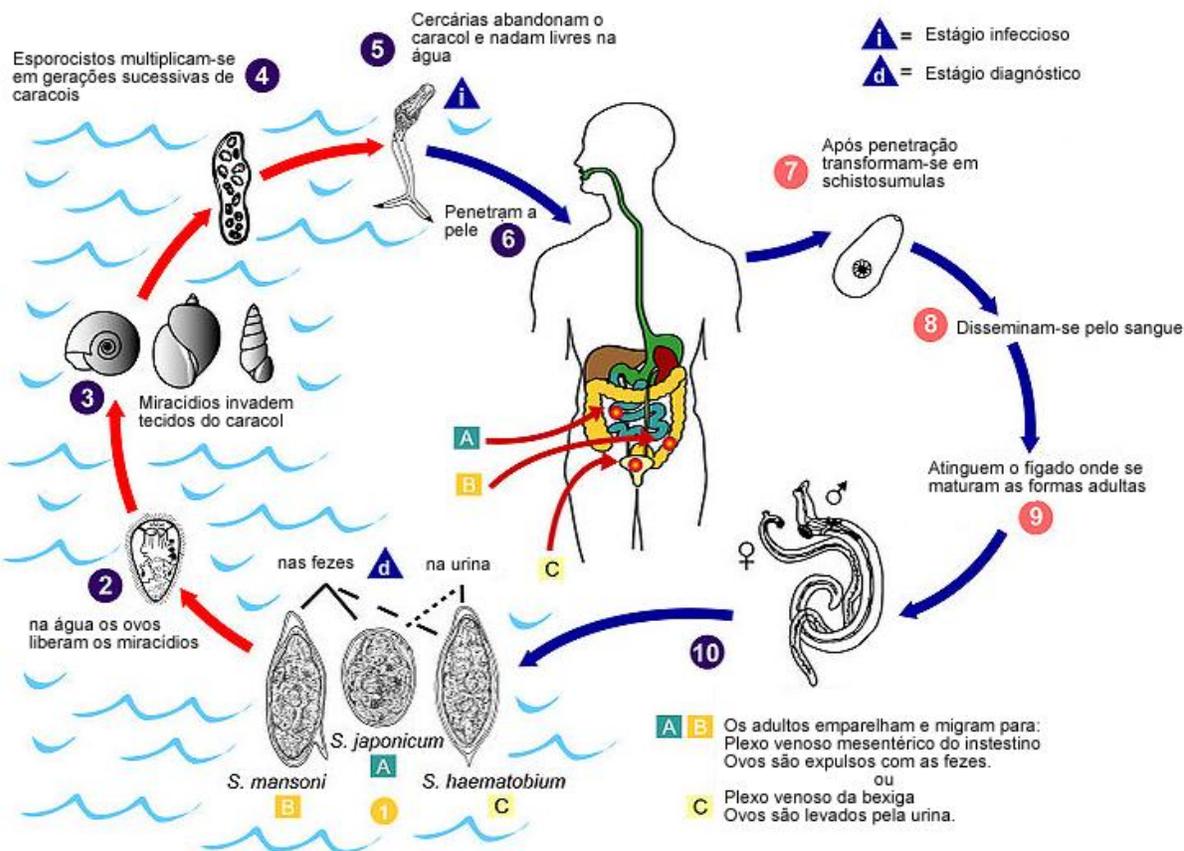
2005, 46 em 2006, 48 em 2007 e 37 em 2008. Em todos os anos, 100% dos municípios analisados tiveram resultados positivos para o *S.mansoni*(Rollemberg, 2011).

A doença é causada por um parasita trematódeo do gênero *Schistosoma*, tendo como principais agentes etiológicos o *S. mansoni*, o *S. haematobium* e o *S. japonicum*(PORDEUS, 2008). Dentre essas espécies, o *S. mansoni* tem sido especialmente estudado devido a sua importância na saúde pública e sua ampla distribuição geográfica. No Brasil, os principais hospedeiros intermediários são os caramujos *Biomphalaria glabrata*, *B. tenagophila* e *B. straminea*. Esses moluscos encontram-se em regiões onde há coleções de água doce, tais como barragens, áreas de irrigação, rios, lagos, lagoas e brejos (YOSHIOKA, 2002).

O ciclo de contaminação da esquistossomose se inicia quando os ovos do parasita são eliminados através das fezes do indivíduo infectado, sendo disseminados no ambiente. Na água doce, os ovos de *S. mansoni* eclodem em algumas horas, libertando suas larvas, os miracídeos. Estas larvas adentram no caramujo do gênero *Biomphalaria* para se multiplicar em centenas de cercárias, em cerca de quatro a seis semanas. As cercárias são as formas infecciosas para o homem, e emergem dos caramujos em condições especiais de luz e temperatura, podendo sobreviver na água por até 72 horas (BENNET, 1997).

As cercárias em contato com a pele do hospedeiro através da água se transformam rapidamente em esquistossômulo, atingindo a circulação sanguínea e passando pelo coração, pulmões e fígado. Apenas os que chegam ao sistema porta-hepático podem se desenvolver até a fase adulta, onde se acasalam e migram para as vênulas da parede intestinal que é seu habitat definitivo. Neste local, as fêmeas depositam seus ovos que obstruem e desorganizam o fluxo sanguíneo local juntamente com a extrusão dos ovos para o tecido circundante (REY, 1992).

ESQUISTOSSOMOSE



Fonte: Centro de Controle de Doenças e Prevenção Esquistossomose

Figura 1. Ilustração do ciclo da esquistossomose.

3.2. Mielorradiculopatia Esquistossomótica

Dentre as mielites não traumáticas ou não neoplásicas a incidência de mielites decorrentes de esquistossomose permeia de cinco e seis por cento dos casos (SPINA-FRANÇA, 1980). Todavia, quando são realizadas necropsias a prevalência é seis vezes maior, estudos post-mortem identificaram uma prevalência entre 20% e 30% dos pacientes com esquistossomose tiveram comprometimento medular e a frequência de pacientes assintomáticos é de 3 a 4 vezes maior que sintomáticos (ANDRADE, 1986). Das formas neurológicas da esquistossomose, a MRE é a mais frequente, com aproximadamente 800 casos relatados desde sua descrição inicial em meados dos anos 30 (FERRARI, 2008). Por ser uma doença de diagnóstico com caráter presuntivo, acredita-se na subnotificação dos casos (LAMBERTUCCI, 2007; FERRARI, 1997), em

um estudo realizado em Pernambuco, foram identificados 139 casos de MRE, sendo 39,5% de áreas endêmicas e 60,5% de áreas não endêmicas (ARAÚJO, 2010).

O principal mecanismo de lesão neurológica dá-se com a deposição de ovos no sistema nervoso. A circulação de ovos no sistema venoso pode ocasionar as formas ectópicas da esquistossomose, dentre elas, a mais incapacitante é a MRE. A intercomunicação do sistema mesentérico inferior ao sistema venoso espinhal que é a porta de entrada dos ovos de *S. mansoni* no sistema nervoso central. Os ovos seguem o trajeto venoso em direção ao plexo avalvular de Batson, plexo com pressão em torno de zero que facilita o fluxo retrógrado ao longo da medula espinhal (BRUIJNING, 1964; CAROD ARTAL, 2004; KATCHANOV, 2010). Esta região faz comunicação das veias intercostais com as veias ilíacas internas, lombares e sacrais (VAN DER KUIP, 1999).

Relatos da literatura afirmam que esforços físicos, manobras de valsalva ou qualquer outra forma de aumento de pressão intra-abdominal podem desencadear a MRE (UEKI 1995; PAZ, 2002; SILVA 2004). Há, também, a possibilidade de eliminação direta dos ovos nos vasos medulares, devido à migração anormal dos vermes adultos. Esta hipótese é reforçada, pois, ocasionalmente, encontraram-se vermes adultos enfileirados dentro dos vasos vertebrais (PAZ 2002; CAROD ARTAL, 2004). Machado afirma que havendo carga parasitária adequada no sistema porta, acontece a passagem de ovos e, até mesmo, de parasitas adultos para o sistema venoso intrarraqueano (MACHADO, 1993).

Galvão considera quatro tipos de acometimento da medula espinhal e das raízes nervosas lombares e sacrais: a) os granulomas intratecais; b) as mielites, do tipo transversal ou não; c) alterações do tipo meningiomieloradiculares; d) alterações predominantemente radiculares (GALVÃO, 1994). De acordo com Ferrari, o comprometimento mielorradicular foi apresentado em 54% dos casos (FERRARI, 1997). Mais recentemente, Araújo e colaboradores apresentaram que 90% dos casos estudados possuíam forma mielorradicular (ARAÚJO, 2006). As lesões medulares na esquistossomose se distribuem, preferencialmente, nos segmentos inferiores torácicos, lombossacros, com características de cone medular e cauda equina (PEREGRINO,

2002). Apesar de raras, são possíveis lesões em níveis mais altos como T2-T3 (BRITO, 1992).

A patogenia da MRE ainda permanece desconhecida. Os dados mais conclusivos sugerem que a resposta inflamatória é desencadeada através da fixação dos ovos no tecido nervoso que desencadeia a formação de granulomas ou massas expansivas. O diagnóstico da MRE através do líquido cefalorraquidiano é uma ferramenta que está em desenvolvimento e sua padronização facilitará a identificação precoce de casos de MRE (Ferrari, 2010). Um estudo de 2011 identificou a presença de imunocomplexos contendo antígenos de esquistossomose no líquido cefalorraquidiano de pacientes com MRE, indicando que estes imunocomplexos circulantes foram produzidos dentro do sistema nervoso central dos pacientes (Ferrari, 2011). Há casos que encontraram ovos no tecido medular sem qualquer reação inflamatória. O estudo de Silva (2004) sugere que a infecção esquistossomótica pode desencadear um processo autoimune que gera vasculite e isquemia no SNC (SILVA, 2004).

Em se tratando de manifestações clínicas, a MRE apresenta uma tríade inicial característica: dor lombar, alterações de sensibilidade em membros inferiores (MMII) e disfunção urinária com percentuais acima de 95% (PEREGRINO, 2002). Estas manifestações ocorrem na fase aguda ou subaguda da doença, havendo a piora progressiva dos sinais e sintomas em média de 15 dias, todavia, há casos em que a evolução do quadro é lenta e sua instalação se dá ao longo de meses ou anos. A MRE é uma lesão neurológica parcial e não traumática e, a depender do nível que os ovos se instalam, diversos sintomas e incapacidades podem ocorrer, em sua grande maioria, a tríade inicial permanece e surgem sintomas como a disfunção vesical, déficit de força em MMII e impotência sexual com percentuais de 12%, 7% e 0,7% (SILVA, 2004). Eventualmente, há uma melhora clínica espontânea decorrente da diminuição do processo inflamatório e modulação do granuloma.

3.3. Modelos Experimentais

O principal obstáculo no desenvolvimento de um modelo animal para a MRE é o desenvolvimento de um protocolo de infecção que retrate com fidedignidade a fisiopatologia da doença. O primeiro achado de deposição de ovos no sistema nervoso central (SNC) ocorreu por volta de 1970 quando Cheever e Duvall identificaram a formação de granulomas associada à encefalite e convulsões em macacos do gênero *Cercopithecus* (CHEEVER, 1974). Já o desenvolvimento de modelos em murinos permeia a década de 90, mais especificamente em 1996 quando Aloe e colaboradores encontraram ovos de *S. mansoni* com agregação granulomatosa em cérebros de camundongos. Os espécimes estudados apresentaram redução da expressão do fator de crescimento nervoso (ALOE, 1996). Em decorrência desse achado, Fiore identificou distúrbios comportamentais em camundongos infectados com ovos de *S. mansoni*, este fato está associado com as alterações no fator de crescimento neural e citocinas induzidas pelos granulomas (FIORE, 1996). Uma das possíveis falhas entre estes dois estudos, é que ambos não indicam a frequência que os ovos atingiram o SNC. Posteriormente, Silva e colaboradores (2002) infectaram 39 camundongos com diferentes cargas parasitárias de cercárias e não encontraram nenhum sinal clínico ou histológico de acometimento do SNC. Eles concluíram que o modelo murino simulando a infecção por *S. mansoni* em humanos é inadequado para estudos experimentais sobre a neuroesquistossomose.

Em 2011, Wang e colaboradores estabeleceram um modelo de neuroesquistossomose como ferramenta de análise morfológica, observação clínica além de investigação sobre a imunologia e patogênese da reação inflamatória. Infectou-se o cérebro de coelhos com ovos de *S. japonicum* e baseados nas manifestações clínicas realizaram a eutanásia 3, 5, 7, 10, 20 e 30 dias após a cirurgia de estereotaxia. A análise histológica apresentou todas as fases da fisiopatologia: início do processo inflamatório com aumento progressivo ao longo dos dias, agregação de neutrófilos, granulócitos e eosinófilos, formação de granuloma ao redor dos ovos e modulação do granuloma. A técnica simulou os mesmos sinais e sintomas da

doença em menor prazo e com maior padronização do grupo experimental, ideal para estudos em ambiente controlado (PENG WANG, 2011).

4. Hipótese

O modelo experimental de mielorradiculopatia esquistossomótica através da inoculação intratecal de ovos de *S. mansoni* é viável em ratos *Wistar*.

5. Objetivos

5.1 Geral:

Desenvolver modelo animal para a mielorradiculopatia esquistossomótica.

5.2 Específicos:

Identificar alterações na sensibilidade mecânica superficial e a sensibilidade térmica ocasionada pelos ovos do *S. mansoni* na medula espinhal;

Identificar alterações na força ocasionada pelos ovos do *S. mansoni* na medula espinhal.

Correlacionar os aspectos sensoriais e motores dos animais em função do tempo.

Identificar alterações histológicas no tecido nervoso produzidas pela inoculação de ovos de *S. mansoni* no espaço subaracnóideo.

6. Métodos

6.1 Delineamento do estudo

O estudo foi do tipo experimental, controlado e cego. A viabilidade do experimento foi assegurada.

6.2 Animais

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal desta Universidade (CEPA/UFS) com o protocolo 11/2013. Após a aprovação do comitê foi solicitado ao Biotério Central da Universidade Federal de Sergipe 50 ratos

Wistarmachos pesando entre 300 e 500 gramas. Todos os procedimentos seguiram as normas estabelecidas pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL).

Durante todo o período, os animais foram mantidos em rack ventilada com mini-isoladorese tiveram livre acesso à água e ração padrão para roedores. As salas de manutenção dos animais e experimentação, localizadas no Laboratório de Pesquisa em Neurociências (LAPENE, Hospital Universitário/UFS) possuem luminosidade controlada com ciclo claro-escuro de 12/12 h (luz das 6 às 18 horas) e temperatura de $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$. Após o termino dos procedimentos experimentais os animais foram eutanasiados por meio de uma injeção intraperitoneal na dose de 150 mg/kg de tiopental sódico (Cristália, SP, Brasil). As carcaças foram acondicionadas em sacos para resíduo infectante e coletadas pelo setor responsável por esses resíduos no Hospital Universitário (HU).

Os critérios de inclusão e exclusão foram adotados com base no protocolo de Rodrigues e Galvão (Rodrigues NR, 1999, Galvão PEC, 2003).

6.3 Critérios de inclusão:

- Ratos da espécie *Wistar*;
- machos adultos jovens (de 8 a 12 semanas de vida);
- peso entre 300 e 500 gramas;
- condição geral e motricidade normais.

6.4 Critérios de exclusão:

- Óbito imediatamente após lesão;
- anomalias da medula espinhal na área lesada observada macroscopicamente;
- autofagia ou mutilação entre os animais;
- lesão da dura-máter na experimentação.

6.5 Grupos

Realizaram-se duas séries experimentais. As séries “infectado” e “controle” foram divididas em seis grupos de acordo com os dias em que se aplicaram os testes comportamentais e posterior eutanásia: 5º (D5), 10º (D10), 20º (D20) e 30º (D30) dias experimentais, que correspondem, respectivamente, aos grupos G10, G20 e G30. Cada um dos seguintes grupos foi composto por cinco animais (Figura 2).

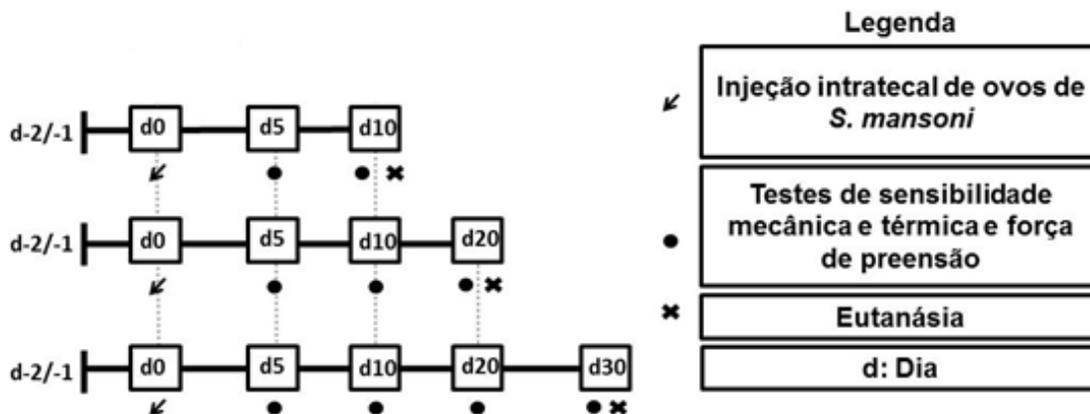


Figura 2. Linha do tempo do procedimento experimental.

6.6 Acompanhamento dos animais

Desde o momento da aquisição no Biotério Central da Universidade Federal de Sergipe (UFS) até o término do experimento, os ratos foram pesados diariamente.

6.7 Obtenção de ovos de *S. mansoni*

Os ovos de *S. mansoni* foram retirados a partir de fígados de camundongos seguindo o protocolo de obtenção de ovos de *S. mansoni* do Laboratório do Serviço de Referência em Esquistossomose da Fundação Oswaldo Cruz, Recife. O protocolo consiste em diversas etapas de centrifugação e utilização de enzimas para separar o tecido hepático dos ovos de *S. mansoni*. É importante que o material esteja em temperatura próxima dos 4°C e recebendo a mínima quantidade de luz para que os ovos não eclodam, além de utilizar material siliconizado para reduzir a fixação dos ovos nas vidrarias (anexo 1). O Serviço de Referência em Esquistossomose da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) de Recife forneceu todo o material.

6.8 Processo de infecção com ovos de *S. mansoni*.

O grupo experimental foi anestesiado com tiopental sódico via intraperitoneal, injetou-se uma suspensão de ovos de *S. mansoni* de 20 μ L (concentração de 25.000 ovos/mL) no espaço subaracnóideo de cada rato, utilizando uma seringa de 1mL. Os animais controles foram submetidos ao mesmo procedimento com a administração de solução estéril tampão-fosfato (PBS).

A injeção intratecal é uma técnica de inoculação de substâncias na coluna vertebral. Caracteriza-se por ser de rápida execução, com alta reprodutibilidade, fácil aplicabilidade e que exige pequenas doses de anestésicos para sua utilização (HYLDEN, 1980). É uma técnica segura que não causa efeitos colaterais ao animal, diferentemente da canulação intratecal. Comprovou-se que a canulação aumenta a resposta nociceptiva de ratos por aumentar a reação inflamatória crônica da medula espinhal (ALMEIDA, 2000).

O procedimento de injeção intratecal consiste em anestésiar o animal e inocular uma agulha entre as vértebras L4 e L5 ou L5 e L6, ao final da medula espinhal e início da cauda equina. Usualmente há um reflexo de retirada de cauda que indica a correta inoculação. De acordo com Hylden e Wilcox não há nenhuma evidência de comprometimento motor no procedimento de injeção intratecal. Após a administração de morfina via intratecal, a função medular foi restituída em 98,8% nos primeiros cinco minutos pós experimento, seguido por 0,8% da função cerebelar, 0,4% da função cerebral. Após 20 minutos todas as funções se apresentaram bem estruturadas (HYLDEN, 1980).

6.9 Testes comportamentais

Os animais que receberam os ovos de *S. mansoni* e o grupo controle foram submetidos aos testes de sensibilidade mecânica e térmica e de força muscular no D0, D5, D10, D20 e D30.

6.9.1 Sensibilidade mecânica

A sensibilidade mecânica foi avaliada através do aparelho Analgesímetro Digital (*Insight*[®], Ribeirão Preto, SP, Brasil). Uma ponteira acoplada ao cabeçote do Analgesímetro Digital foi pressionada por cinco vezes seguidas na superfície plantar das patas traseiras e retirado assim que o animal retirasse a pata diante do estímulo. A média aritmética das cinco aplicações foi registrada como limiar mecânico secundário e a diferença de valores em diferentes momentos do experimento foi considerada para avaliação das oscilações do limiar (GOPALKRISHNAN, 2000).

6.9.2 Sensibilidade térmica

Para avaliação do limiar térmico foi utilizado o *Hot Plate*(*Insight*[®], Ribeirão Preto, SP, Brasil). Nesse teste, foi considerado como latência de resposta, o período que os animais permaneceram sobre uma chapa metálica aquecida ($50\pm 0,5^{\circ}\text{C}$) até reagirem ao estímulo térmico, caracterizado pelo comportamento de levantar ou lambear as patas (TITA, 2001). Esta avaliação dá informações sobre a latência, uma vez que o reflexo de retirada da cauda é caracterizado pela integração medular e supra medular (MITCHELL, 1977).

6.9.3 Força de preensão

Os possíveis efeitos motores promovidos pela inoculação de ovos de *S. mansoni* foram avaliados através do *Grip Strength Meter*(*Insight*[®], São Paulo, SP, Brasil). O teste de força de preensão constitui um método não invasivo amplamente utilizado e projetado para avaliar a força dos membros dos ratos. Este baseia-se na tendência natural do animal para agarrar uma barra ou grade quando suspenso pela cauda. Um transdutor de força mede o pico de força de tensão (em gramas). O objetivo do teste é avaliar o tônus neuromuscular e/ou força muscular dos membros anteriores e posteriores ao mesmo tempo ou separadamente. Alterações na força de preensão tem sido interpretadas como evidências de aumento ou redução da força muscular (ISHIYAMA, 2004, MAHMOOD, 2010).

O teste foi realizado em um animal de cada vez, sendo obtidas para cada animal três medidas com intervalo de 5 minutos entre as mensurações. Foi escolhido o maior valor entre as três medidas de cada animal.

6.9.4 Análise histológica

Os animais dos grupos infectado e controle foram eutanasiados no D5, D10, D20, D30 administrando-se tiopental sódico via intraperitoneal na dose de 150mg/kg, conforme as regras e regulamentações do Comitê de Ética em Pesquisas Animais da Universidade Federal de Sergipe. A medula espinhal, contendo todo o estojo ósseo e os músculos paravertebrais foi removida e armazenada em frascos contendo formol a 10%.

O segmento medular de T10 a L5 foi submetido a cortes histológicos em criostato no plano sagital com intervalo de 5µm, fixado em lâminas de vidro e corado por meio da técnica de hematoxilina-eosina. As alterações histológicas foram avaliadas quanto à presença de ovos e/ou granulomas além de agregados de células inflamatórias.

6.9.5. Análise estatística

Para avaliar a variação dos resultados dos testes neurofuncionais ao longo do tempo empregou-se o teste não paramétrico de Mann Whitney. Quando os grupos controle e experimental apresentaram valores estatisticamente significativos ($p < 0,05$) na mesma análise, realizou-se o teste de Anova de Friedman para se avaliar a diferença intragrupos, seguido do teste de Dunn.

7. Resultados

Alguns animais dos grupos G20 e G10 experimentais apresentaram atividade espasmódica nas duas primeiras horas após a injeção intratecal. Houve alterações estatisticamente significativas no G20 experimental em todos os testes realizados quando comparados ao grupo controle. O teste de sensibilidade tátil feito com o analgesímetro digital evidenciou redução da sensibilidade com valores oscilando de 31,1g/f a 60,1g/f na pata direita e de 28,9g/f a 64,4g/f ($p < 0,05$) na pata esquerda (Figura 4). Observou-se hipossensibilidade térmica, com valores de 4 a 9,8 segundos no

G20experimental ($p < 0,05$) (Figura 4). Quanto à força, o G20 experimental apresentou valores médios de 2079,6g a 1014,4g ($p < 0,05$) o que implica afirmar que houve redução de força muscular (Figura 5).

Tabela 1.Variação da sensibilidade tátil ao longo do tempo nos grupos experimental e controle.

Grupos	Sensibilidade tátil (média, g/f)			
	Experimental	p	Controle	p
G30 pata direita	37,2	0.1338	38,2	0.2178
G30 pata esquerda	37,0	0.0663	39,2	0.4060
G20 pata direita	52,0	0.0663	45,8	0.2000
G20 pata esquerda	45,2	0.0120*	48,6	0.3545
G10 pata direita	47,9	0.5216	39,5	0.9537
G10 pata esquerda	49,1	0.1821	51,5	0.1242

*Resultado estatisticamente significante

De acordo com o teste de Dunn houve diferença significativa no G20 pata esquerda entre os dias 20 e 0 ($p = 0.0197$).

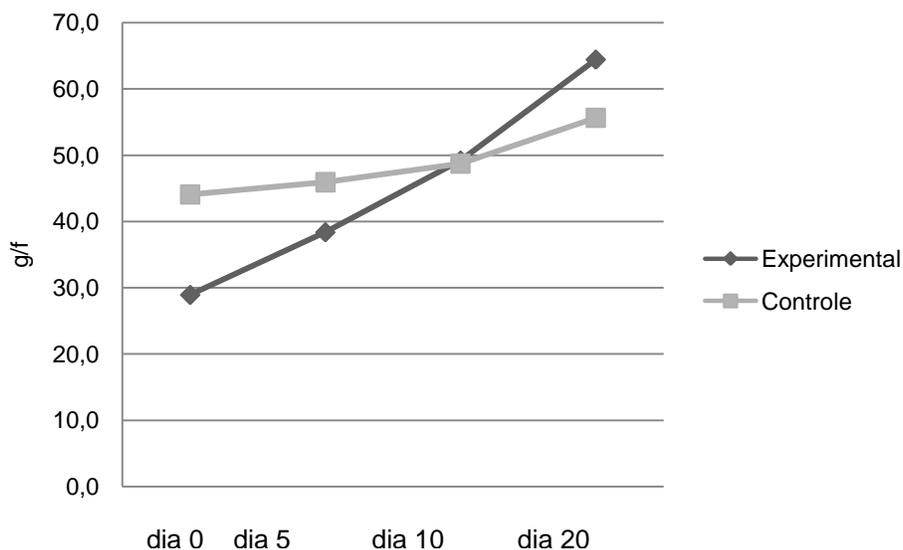


Figura 3. Comparação das medidas da sensibilidade tátil da pata esquerda ao longo do tempo nos grupos G20 experimental e controle.

Tabela 2.Variação da sensibilidade térmica ao longo do tempo nos grupos experimental e controle.

Grupos	Sensibilidade térmica (média, seg)			
	Experimental	p	Controle	p
G30	5,92	0.0377*	6,08	0.0731
G20	7,3	0.0036*	6,6	0.0816
G10	6,4	0.9907	6,4	0.1296

*Resultado estatisticamente significante

De acordo com o teste de Dunn houve diferença significativa no G20 experimental: entre os dias 5 e 0 ($p = 0.0291$); entre os dias 20 e 0 ($p = 0.0423$).

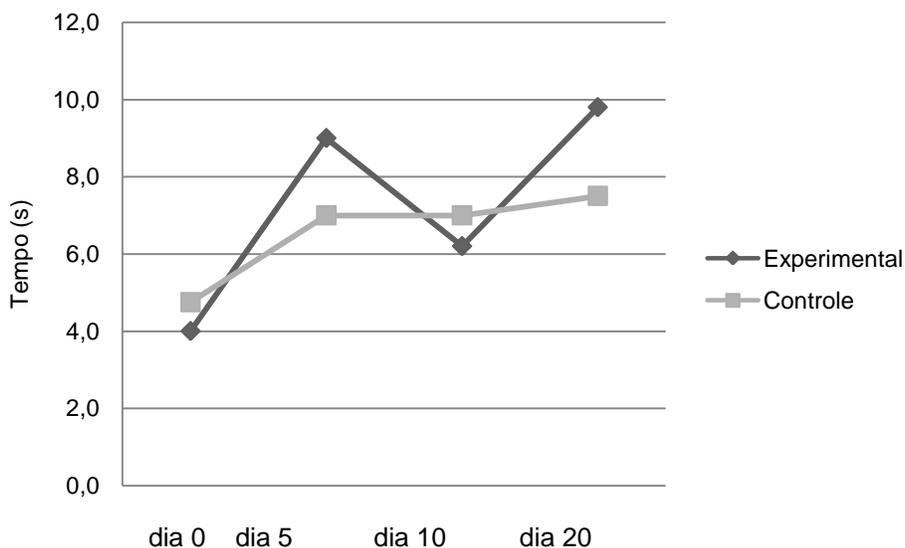


Figura 4. Comparação da variação de sensibilidade térmica nos grupos G20 experimental e controle ao longo do tempo.

Tabela 3.Variação da força muscular ao longo do tempo nos grupos experimental e controle.

Grupos	Força muscular (média, g)			
	Experimental	p	Controle	p
G30	1997,1	0.2914	1892,4	0.4281
G20	1584,4	0.0226*	1373,0	0.0944
G10	1752,4	0.9537	1879,8	0.3673

*Resultado estatisticamente significativo

De acordo com o teste de Dunn houve diferença significativa no G20 nos dias 20 e 10 ($p = 0.0423$).

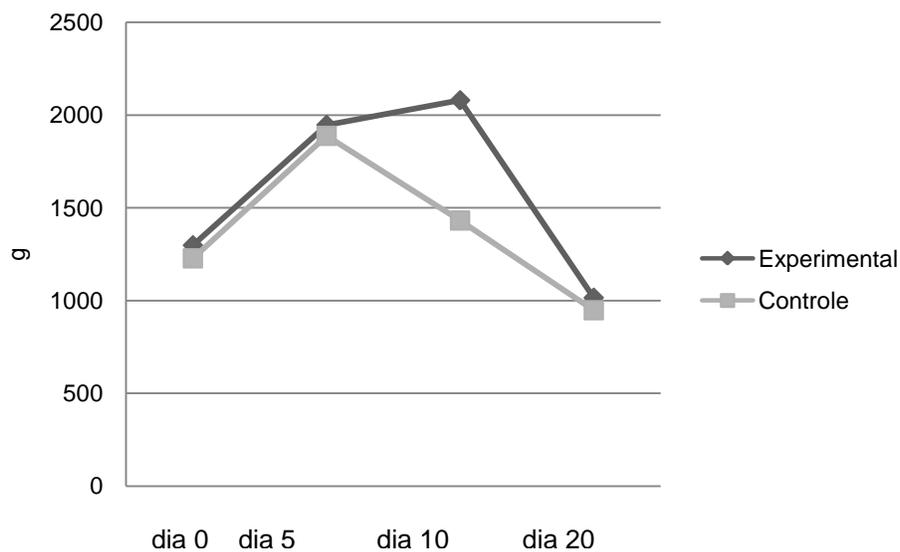


Figura 5. Comparação da variação da força muscular ao longo do tempo nos grupos G20 experimental e controle.



Figura 6. Corte sagital da medula espinhal evidenciando ovo de *S. mansoni* em animal do G20 experimental (hematoxilina-eosina, 400x).

8. Discussão

Um dos grandes desafios no desenvolvimento de modelos animais é simular todos os aspectos da doença em um ambiente fechado e tornar os resultados reprodutíveis. Em artigo de revisão, Fouad e colaboradores comentam que a realização de testes funcionais em modelos animais de lesão medular é passível de muitas falhas e há inúmeras variáveis que podem interferir no resultado final. Dentre elas cita-se a variabilidade do modelo de lesão, os tipos de animais utilizados, variabilidades influenciadas pelo comportamento, atividade espontânea e variedade dos dias de teste (FOUAD, 2013).

Não é surpreendente, mas a perda da função nem sempre é proporcional à gravidade da lesão espinhal. Conseqüentemente, não há linearidade entre extensão da lesão e recuperação funcional do animal (SCHUCHT, 2002; HURD, 2013). A função motora não é determinada por uma única via, mas por uma rede adaptativa, incluindo vias reflexas, proprioceptivas, de geração de padrão, mielinizadas e amielínicas que juntas permitem alto grau de compensação por meio de circuitos neurais após a lesão no SNC, colaborando para a não linearidade da recuperação (FOUAD, 2013).

No presente estudo, as manifestações clínicas foram semelhantes às aquelas observadas no homem. Cerca de 97,5% dos pacientes com MRE apresentam alterações de sensibilidade de membros inferiores e com a evolução da doença manifestam fraqueza nesses membros (PEREGRINO, 2002; FERRARI, 2004). A comparação dos resultados dos testes de sensibilidade e de força muscular no D0 do experimento não evidenciou diferenças estatisticamente significativas, comprovando a homogeneidade da amostra.

Houve redução significativa da sensibilidade térmica na pata esquerda dos animais do G20 experimental em relação aos controles. Conforme ilustrado na Figura 3, observa-se aumento progressivo do limiar sensitivo nos animais, sugerindo que com a progressão da doença houve decréscimo da sensibilidade tátil. A distribuição assimétrica das alterações sensitivas e motoras é comum na MRE em humanos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

Na Figura 4 observa-se aumento no tempo de resposta ao calor entre D0 e D5 com posterior redução até D10, quando se observa nova progressão deste tempo até atingir seu pico máximo aos 20 dias pós-infecção. Este achado sugere redução na percepção térmica do animal que agregada à redução de sensibilidade tátil conferem a redução sensorial comumente observada na MRE. O mesmo grupo (G20 experimental) apresentou redução significativa da força muscular. De acordo com a Figura 5, nos dias 0, 5 e 10 pós-infecção, foi evidenciado aumento da força de preensão que é justificado não pelo incremento de força, mas, pelo quadro agudo inflamatório que eleva o estresse do animal e sua resposta de preensão. Todavia, com a progressão da doença observa-se diminuição da força muscular, percebido entre os dias 10 e 20, compreendendo as fases subaguda e crônica em ratos *Wistare* corroborando com os achados literários (PITTELLA, 1997; PITTELLA, 2003; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

O *GripStreght Meter* fornece uma medida de força muscular (SALA-ROCA, 2002) e a alteração observada nos testes indica redução no componente contrátil muscular e sinais proprioceptivos interferindo na força do animal e em suas habilidades, já o *Hot Plate* é utilizado para avaliar a atividade antinociceptiva central (ARSLAN, 2010) e o analgesímetro digital detecta efeitos nociceptivos locais e sistêmicos (CUNHA, 2004). Esta redução na capacidade de perceber estímulo doloroso interfere no sistema de proteção, importante componente para o mecanismo de defesa do organismo, quando este está envolvido em situações de emergência (CALLIET, 1999). A lesão gerada pelos ovos de *S. mansoni* interferiu nas respostas sensitivas e motoras dos animais, prejudicando a propriocepção e o desempenho de atividades motoras. Em humanos, estes déficits afetam a marcha, equilíbrio estático e dinâmico, além das atividades funcionais, reduzindo a qualidade de vida do indivíduo e trazendo consequências não só para o paciente, quanto ao seu nicho familiar (VAN TUIJL, 2002; WESSELS, 2010).

As manifestações neurológicas da MRE surgem nas fases iniciais (forma aguda ou subaguda), com piora progressiva e acumulativa de sinais e sintomas, instalando-se o quadro clínico neurológico completo geralmente em 15 dias. Ocasionalmente, essa

evolução pode ser lenta e ocorrer ao longo de meses e anos (JOUBERT, 1990; HARIBHAI, 1991). Sua patogenia ainda permanece desconhecida, entretanto, a principal resposta inflamatória é apresentada em resposta à deposição dos ovos no tecido nervoso (LIVRAMENTO, 1985; PITTELLA, 1991; PITTELLA, 1997; SUCHET, 1987). A maioria das reações é desencadeada pela presença de massas expansivas ou granulomas, todavia, há diversos casos em que não houve expressão clínica (QUEIROS, 1974; LUYENDIJK, 1975; POLAN, 1999).

Na figura 6 observa-se a presença de ovo de *S. mansoni* na região da comissura anterior da medula espinhal ao nível do cone medular, todavia, não há um agregado inflamatório ao redor desses ovos. A análise histológica revelou ovos em aproximadamente 25% dos animais, nos quais eram dos grupos que apresentaram manifestações clínicas significativas (G20 e G30). Há a possibilidade das formas assintomáticas, alguns autores afirmam que a deposição assintomática de ovos do *S. mansoni* no encéfalo revelou-se mais comum do que a forma sintomática da doença (SCRIMGEOUR, 1985; PITTELLA, 1991; PITTELLA, 1997; LAMBERTUCCI, 2007). Durante a fase inicial, há um processo de necrose de coagulação ao redor do ovo, região onde se observa agregados de macrófagos, células epitelióides e células gigantes com infiltrado inflamatório rico em eosinófilos e linfócitos. Ao longo da cronicidade da doença há a infiltração de fibroblastos com encapsulamento do ovo por processo fibrótico, porém, em alguns casos necropsiados encontram-se ovos no tecido medular sem qualquer reação inflamatória (BUDZILOVICH, 1964).

Apenas os segmentos da medula espinhal entre T10 e L5 foram estudados, respeitando-se a predileção dos ovos por atingirem níveis mais inferiores (SILVA, 2002b; BRAGA, 2003; ARAÚJO, 2010). No entanto, não se pode descartar a possibilidade da presença de ovos em níveis mais superiores e/ou em raízes medulares, meninges ou formando granulomas intratecais (GALVÃO, 1994), estruturas nas quais não se realizou análise histológica. Todavia, faz-se necessário dar continuidade à pesquisa de ovos em outras áreas do sistema nervoso central.

Os sinais clínicos só foram evidentes a partir do D10 e a maioria dos sinais e sintomas surgiram a partir dos dias 20 e 30. Talvez, se a linha do tempo fosse estendida e ocorressem reinfecções, os sinais clínicos fossem mais exuberantes. São necessários estudos posteriores para aprimorar o modelo animal, quer seja sensibilizando o sistema imune dos ratos e fazendo reinfecções, quer seja utilizando-se mais instrumentos de avaliação e escalas padronizadas de lesão medular, além da inserção de ferramentas de análises de citocinas e marcadores imunológicos.

9. Conclusão

Com base nas observações do presente experimento, conclui-se que:

O modelo desenvolvido mostrou-se satisfatório para avaliação das alterações funcionais em ratos *Wistar* após a infecção com ovos de *S. mansoni*.

Foi possível identificar alterações na sensibilidade mecânica superficial, na sensibilidade térmica e força muscular ocasionadas pela presença de ovos de *S. mansoni* na medula espinhal;

Identificaram-se alterações histológicas no tecido nervoso após a infecção com ovos de *S. mansoni*.

10. Referências

ALMEIDA, F. R. C.; SCHIVO, I. R. S.; LORENZETTI, B. B.; FERREIRA S. H. Chronic intrathecal cannulation enhances nociceptive responses in rats. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*: v. 33, p. 949-956, 2000.

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, n. 3, p. 300-5, set. 1996.

ANDRADE, A. N. Neuroesquistossomose. *Arq Neuropsiquiatr*: v. 44, p. 275-279, 1986.

ARAÚJO, K. C. G. M.; SILVA, C. R.; BARBOSA, C. S.; FERRARI, T. C. A. Clinical-epidemiological profile of children with schistosomal myeloradiculopathy attended at the

Instituto Materno-Infantil de Pernambuco. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v. 101(Suppl. I), p. 149-156, 2006.

ARAÚJO, K. C. G. M.; SILVA, C. R.; SANTOS, A. G. A.; BARBOSA, C. S.; FERRARI, T. C. A. Clinical-epidemiologic profile of the schistosoma myeloradiculopathy in Pernambuco, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v. 105(4), p. 454-459, July 2010.

ARSLAN, R.; BEKTAS, N.; OZTURK, Y. Antinociceptive activity of methanol extract of fruits of *Capparis ovate* in mice. *J Ethnopharmacol*: v. 131, p.28–32, 2010.

BENNET; PLUM. *Tratado de Medicina Interna*. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 1997.

BRAGA, B. P.; COSTA JUNIOR, L. B. da; LAMBERTUCCI, J. R. Magnetic resonance imaging of cerebellar schistosomiasis mansoni. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, [S.l.], v. 36, p. 635-636, 2003.

BRITO J. C. F.; et al. Neuroesquistossomose Medular. Avaliação clínico laboratorial de 5 anos. *Arquivos de Neuropsiquiatria*: v. 50, n. 2, 1992.

BRUIJNING C. F. The mechanism of the passage of the *Schistosoma mansoni* egg through the wall of the blood vessel. *Trop Geogr Med*: v. 16, p. 159–63, 1964.

BUDZILOVICH, G. N.; MOST, H.; FEIGIN, I. Pathogenesis and latency of spinal cord schistosomiasis. *Archives of Pathology*: v. 77, p. 383-388, 1964.

CALLIET, R. Dor: Mecanismos e Tratamentos. Porto: Artmed, 1999.

CAROD ARTAL, F. J.; VARGAS, A. P.; HORAN, T. A.; MARINHO, P. B.; COELHO COSTA, P. H. *Schistosoma mansoni* myelopathy: clinical and pathologic findings. *Neurology*: v. 64, p. 388-91, 2004.

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.

CUNHA, T.M. et al. An electronic pressure-meter nociception paw test for mice. *Braz J Med Biol Res* [online]: v.37, n.3, p. 401-407, 2004. ISSN 1414-431X.

FERRARI, T. C. A. Abordagem Diagnóstica da Mielorradiculopatia Causada pelo *Schistosoma mansoni*: Imunodiagnóstico em Líquor pela Técnica de Elisa. 1997. 207 p. Tese - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte. 1997.

FERRARI, T. C. A.; MOREIRA, P. R. R.; CUNHA, A. S. Spinalcordschistosomiasis: a prospectivestudyof 63 cases emphasizingclinicalandtherapeuticaspects. *J ClinNeurosci*: v. 11, p. 246–53, 2004.

FERRARI, T. C. A.; MOREIRA, P. R. R.; CUNHA, A. S. Clinicalcharacterizationofneuroschistosomiasisdueto *Schistosoma mansoni* and its treatment. *Acta Tropical*: v. 108, p. 89–97, 2008.

FERRARI, T. C. A. A laboratory test for the diagnosis of neuroschistosomiasis. *Neurological Research*: v. 32 (3), 2010.

FERRARI, T. C. A.; FARIA, L. C.; VILAÇA, T. S.; CORREA, C. R.; GÓES, A. M. Identification and characterization of immune complexes in the cerebrospinal fluid ofpatients with spinal cord schistosomiasis. *Journal of Neuroimmunology*: v. 230, p. 188–190, 2011.doi:10.1016/j.jneuroim.2010.08.016

FIORE, M.; ALOE, L. Neuroinflammatory implication of *S. mansoni* infection in the mouse. *Arch PhysiolBiochem*: v. 109, n. 4, p. 361-4, out. 2001.

FIORE, M.; MORONI, R.; ALLEVA, E.; ALOE, L. *Schistosoma mansoni*: influence of infection in mouse behavior. *ExperParasitol*: v. 83, p. 46-54, 1996.

GALVÃO, A. C. R. Neuroinfecção. *Como eu trato Neuroesquistossomose*. Cap. 49. São Paulo: Clínica Neurológica HC/FMUSP, 1994.

GALVÃO, P. E. C. *Avaliação funcional e histológica do efeito da oxigenioterapia hiperbárica em ratos com lesão medular contusa*. 2003. Dissertação - Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2003.

GOPALKRISHNAN, P.; SLUKA, K. A. Effect of Varying Frequency, Intensity, and Pulse Duration of Transcutaneous Electrical Nerve Stimulation on Primary Hyperalgesia in Inflamed Rats. *Arch Phys Med Rehabil*: v. 81, Jul. 2000.

HARIBHAI, H. C.; BHIGJEE, A. I.; BILL, P. L. A.; PAMMENTER, M. D.; MODI, G.; HOFFMANN, M.; KELBE, C.; BECKER, P. Spinal cord schistosomiasis: a clinical, laboratory and radiologic study, with a note on therapeutic aspects. *Brain*: v. 114, p. 709-726, 1991.

HYLDEN, J. L. K.; WILCOX, G. L. Intrathecal Morphine in mice: a new technique. *European Journal of pharmacology*: v. 67, p. 313-314, 1980.

HURD, C.; WEISHAUPT, N.; FOUAD, K. Anatomical correlates of recovery in single pellet reaching in spinal cord injured rats. *Exp. Neurol.* v. 247, p. 605–614. doi:10.1016/j.expneurol.2013.02.013. 2013

ISHIYAMA, T; et al. Riluzole slows the progression of neuromuscular dysfunction in the wobblers mouse motor neuron disease. *Brain Research*: v.1019, n. 1-2, p. 226-236, Set. 2004.

JOUBERT, J.; FRIPP, P. J.; HAY, I. T.; DAVEL, G. H.; VAN GRAAN, E. S. J. Schistosomiasis of the spinal cord – underdiagnosed in South Africa? *South African Medical Journal*: v. 77, p. 297-299, 1990

KATCHANOV, J.; NAWA, Y. Helminthic invasion of the central nervous system: Many roads lead to Rome. *Parasitology International*: v. 59, p. 491–496, 2010.

LAMBERTUCCI, J.R.; SILVA, L.C.; DO AMARAL, R. S. Guidelines for the diagnosis and treatment of schistosomylmyeloradiculopathy. *Rev Soc Bras Med Trop*: v. 40, p. 574-581, 2007.

LIVRAMENTO, J. A.; MACHADO, L. R.; SILVA, L. C.; SPINA-FRANÇA, A. Síndrome do líquido cefalorraqueano na neuroesquistossomose. *Arquivos de Neuropsiquiatria*: v. 45, p. 372-377, 1985.

LUYENDIJK, W.; LINDEMAN, J. Schistosomiasis (bilharziasis) mansoni of the spinal cord simulating an intramedullary tumor. *SurgicalNeurology*.v. 4, p. 457-460, 1975

MACHADO, L. R. *Esquistossomose do Sistema Nervoso*. Conduas em Neurologia. São Paulo: Associados, 1993. 210 p.

MAHMOOD, D.; et al. Comparison of antinociceptive and antidiabetic effects of sertraline and amitriptyline on streptozotocin-induced diabetic rats. *Human& Experimental Toxicology*. v. 29, n. 10, p. 881-886, Out. 2010.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. Guia de vigilância epidemiológica e controle da mielorradiculopatia esquistossomótica / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. – Brasília: Ministério da Saúde. 32 p. 2006. ISBN 85-334-1260-6

MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. DEPARTAMENTO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA. Guia de vigilância Epidemiológica. 7. ed. – Brasília :Ministério da Saúde. 816 p. 2009. ISBN 978-85-334-1632-1.

MITCHEL, D.; HELLON, R. F. Neuronal and behavioural responses in rats during noxious stimulation of the tail. *Proceedings of the royal Society of London. Series B, Containing Papers of a Biological Character*. Great Britain: Royal Society, v. 197, n. 1127, p. 169-194, Maio. 1977.

PAZ, J. A.; VALENTE, M.; CASELLA, E. B.; DIAS, M. J. M. Spinal Cord Schistosomiasis in children: analysis of seven cases. *Arquivos de neuropsiquiatria*: v. 60, n. 2, jun. 2002.

PENG WANG, DAN WANG, SHI-JIE CHEN, MING-CAN WU, XIANG-LIN CHENG, JUN-CHUAN LI, TING-XUAN CHEN, ZHAN-SHENG ZHU. Establishment of a cerebral schistosomiasis experimental model in rabbits. *Neurosci Bull*: v. 27, n. 2, p. 91–98. Abr. 2011.

PEREGRINO, A. J. P.; PUGLIA, P. M. K.; NÓBREGA, J. P. S.; LIVRAMENTO, J. A.; DIAS, M. J. M.; SCAFF, M. Esquistossomose Medular: análises de 80 casos. *Arquivos de Neuro-psiquiatria*: v. 60, n. 3 A, set. 2002.

PITTELLA, J. E. H. The relation between involvement of the central nervous system in Schistosomiasis mansoni and the clinical forms of the parasitosis: a review. *Journal of Tropical Medicine and Hygiene*: v. 94, p. 15-21, 1991.

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

PITTELLA, J. E. H. Neuroschistosomiasis. In: Misra UD, Kalita J, Shakir RA, eds. Tropical neurology. Georgetown: Landes Bioscience: p. 300–24, 2003.

POLAM, S.; DI JOHN, D.; DE CARLO, R.; STRAUSS, R.; VADDE, N. A snail tale. *The Pediatric Infectious Disease Journal*: v. 18, p. 173-174, 1999.

PORDEUS LC, AGUIAR LR, QUININO LRM, *et al.* A ocorrência das formas aguda e crônica da esquistossomose mansônica no Brasil no período de 1997 a 2006: uma revisão de literatura. *Epidemiol. Serv. Saúde*: v.17, n.3, p.163-175, set. 2008.

QUEIROS, A. C. O envolvimento do sistema nervoso central na esquistossomose mansônica. *Revista de Patologia Tropical*: v. 3, p. 255-261, 1974.

REY L. *Bases da parasitologia Médica*. 1 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1992.

RODRIGUES NR. *Padronização da lesão medular espinhal em ratos Wistar*. 1999. Tese - Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo. 1999.

ROLLEMBERG, C. V.; SANTOS, C. M.; SILVA, M. M.; SOUZA, A. M.; ALMEIDA, J. A.; ALMEIDA, R. P. JESUS, A. R. Aspectos epidemiológicos e distribuição geográfica da esquistossomose e geo-helmitos, no Estado de Sergipe, de acordo com os dados do Programa de Controle da Esquistossomose. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*: v. 44, n.1, p. 91-96, 2011.

SALA-ROCA, J. et al. Effects of chronic dysthyroidism on activity and exploration. *Psychology & Behavior*, v. 77, n. 1 p. 125-133, 2002.

SCHUCHT, P.; RAINETEAU, O.; SCHWAB, M. E.; FOUAD, K. Anatomical correlates of locomotor recovery following dorsal and ventral lesions of the rat spinal cord. *Exp.Neurol*: v. 176, p. 143–153 .doi:10.1006/exnr.2002. 7909. 2002.

SCRIMGEOUR, E. M.; GAJDUSEK, D. C. Involvement of the central nervous system in *Schistosomamansonii* and *S. haematobium* infection: a review. *Brain*: v. 108, p.1023-1038, 1985.

SILVA, L. M.; OLIVEIRA CN, ANDRADE ZA. Experimental Neuroschistosomiasis - Inadequacy of the Murine Model. *MemInst Oswaldo Cruz*: v. 97, n. 4, p. 599-600, Jun. 2002a.

SILVA, L. C. S.; KILL, C. M.; LAMBERTUCCI, J. R. Cervical spinal cord schistosomiasis. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, [S.l.], v. 35, p. 543-544, 2002b.

SILVA, L. C. S.; MACIEL, P. E.; RIBAS, J. G. R.; PEREIRA, S. R. S.; SERUFO, J. C.; ANDRADE, L. M.; ANTUNES, C. M.; LAMBERTUCCI, J. R. Mielorradiculopatia esquistossomótica. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*: v. 37, n. 3, p. 261-272, mai./jun. 2004.

SLUKA, K. A.; KALRA, A.; MOORE, S. A. Unilateral intramuscular injections of acidic saline produce a bilateral, long-lasting hyperalgesia. *MuscleNerve*: v. 24, p. 37–46, 2001.

SPINA-FRANÇA, A.; SALUM, P. N. B.; LIMONGI, J. C. P.; BERGER, A.; LOSSO, E. R. Mielopatias: aspectos diagnósticos. *ArqNeuropsiquiatr*: v. 38, p. 360-366, 1980.

STEINMANN, P.; KEISER, J.; BOS, R.; TANNER, M.; UTZINGER, J. Schistosomiasis and water resources development: systematic review, meta-analysis, and estimates of people at risk. *Lancet Infect Dis*: v. 6, p. 411–25, 2006.

SUCHET, I.; KLEIN, C.; HORWITZ, T.; LALLA, S.; DOODHA, M. Spinal cord schistosomiasis: a case report and review of the literature. *Paraplegia*:v. 25, p.491-496, 1987

TITA, B.; ABDEL-HAQ, H.; VITALONE, A.; MAZZANTI, G.; SASO, L. Analgesic properties of *Epilobium mangustifolium*, evaluated by the hot plate test and the writhing test. *IIFarmaco*: v. 56, p. 341–343, 2001.

UEKI, K.; PARISI, J. E.; ONOFRIO, B. M. *S. mansoni* infection involving the spinal cord: Case report. *Journal of Neurosurgery*: v. 82, p. 1065-1067, 1995.

VAN DER KUIP, M.; HOOGLAND, P. V.; GROEN, R. J. Human radicular veins: regulation of venous reflux in the absence of valves. *Anat Rec*: v. 254, p. 173–80, 1999.

VAN TUIJL, J. H.; JANSSEN-POTTEN, Y. J.; SEELEN, H. A. Evaluation of upper extremity motor function tests in tetraplegics. *Spinal Cord*: v. 40, n. 2, p.51-64, 2002.

WESSELS, M.; LUCAS, C.; ERIKS, I.; DE GROOT, S. Body weight-supported gait training for restoration of walking in people with an incomplete spinal cord injury: a systematic review. *J Rehabil Med*: v. 42, p. 513-9, 2010.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Schistosomiasis. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs115/en/>. Acesso em: 21 de mar. 2014.

YOSHIOKA L, et al. Schistosoma mansoni: estudo da Patogenia da Linhagem de Santa Rosa (Campinas, SP, Brasil) em Camundongos. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*: v. 35, n. 3, p. 203-207, 2002.

ZHANG, Y. et al. Control of neglected tropical diseases needs a long-term commitment. *BioMed Center Medicine*: v. 8, p. 67, 2010.

Anexo 1

Protocolo de obtenção de SEA a partir de fígados

- a. Escolher somente fígados com muitos granulomas
- b. Separar 20 fígados por vez. Retirar, com bisturi ou equivalente, todo o tecido vascular, vesícula e colédoco. Reservar somente os lóbulos limpos.
- c. Picar em pequenos pedaços e adicionar 300 mL de NaCl 1,7%
- d. Triturar no liquidificador por 5 minutos. Em velocidade média
- e. Peneirar em peneira de 16 mesh. Lavar a peneira com salina
- f. Centrifugar a 2000 rpm por 5 minutos para diminuir o volume para 50 mL
- g. Adicionar 300 mL de fosfato bisódico 0,06N + tripsina 0,1%
- h. BM 37° durante 3 horas sob agitação constante
- i. Filtrar em peneira de 16 mesh.
- j. Centrifugar 3000 rpm durante 5 minutos. Desprezar o sobrenadante.
- k. Lavar o sedimento com NaCl e centrifugar.
- l. Lavar o sedimento com PBS 0,05 M. Centrifugar.
- m. Ressuspender o sedimento em solução de PBS + glicose 0,1% + colagenase 0,05% *over night* a 4°C
- n. No dia seguinte, leva-se o erlenmeyer para incubação por 3 horas no Banho Maria 37 ° sob agitação.
- o. Centrifugar por 5 minutos 3000 rpm para retirar a colagenase
- p. Lavar com PBS + EDTA 0,1 M por 2 vezes (centrifugando).
- q. Peneirar em peneira de 150 mesh. Empurrar o material com jatos de PBS EDTA. Usar um bequer grande com a peneira por cima.
- r. Centrifugar a 3000 rpm para concentrar o filtrado.

s. Ressuspender o sedimento em PBS EDTA e começar um ciclo de centrifugações a baixa rotação (800 rpm X 5 minutos) para favorecer a descida dos ovos.

t. Até ficar com o sobrenadante límpido e um sedimento preto cheio de ovos.

u. Como ainda não estão totalmente limpos, pode guardá-los na geladeira.

v. No outro dia, separar os ovos (pretos) através de precipitação em placas de petri. Isto é: Colocar 2mL do sedimento rico em ovos em placas de petri e rotar suavemente esta. Os ovos se separam dos restos de tecidos. Coletar os ovos com pipeta Pasteur de plástico

w. Uma vez limpos, concentrar e guardar até uso

OBSERVAÇÕES

- USAR MATERIAL de laboratório SILICONIZADO. Os ovos se aderem facilmente ao plástico e vidro
- De preferência, o material rico em ovos deve ser mantido no gelo para evitar a eclosão dos miracídios. Estes são os que formam o SEA