

## DESENVOLVIMENTO DA ESQUISTOSSOMOSE NO MODELO DO HAMSTER

Manuela dos Santos Caldas<sup>1</sup>  
Zilton de Araújo Andrade<sup>2</sup>

**Resumo:** A infecção pelo *Schistosoma mansoni* num animal susceptível desencadeia, após cerca de 08 semanas, uma reação granulomatosa (granulomas esquistossomóticos). Na esquistossomose a reação granulomatosa se forma em resposta à liberação de produtos do miracídio. O fígado é o órgão mais atingido e o mais estudado nessas infecções, mas o presente trabalho procura observar reações em outros órgãos tais como: intestino, rim, baço e pulmão. O presente trabalho consistiu em reproduzir a infecção pelo *S. mansoni* no hamster, como treinamento para a reprodução do ciclo vital do parasito, e para o estudo histopatológico dos principais aspectos da esquistossomose no dito hospedeiro. Na metodologia, foram utilizados 05 hamsters dourados (*Cricetus auratus*) do sexo feminino com peso variável entre 120g e 155g, que foram infectados com 100 cercárias da cepa de Belo Horizonte e sacrificados após 08 semanas de infecção. Algumas técnicas foram utilizadas como: infecção do hamster, exame parasitológico de fezes, contagem de ovos nos tecidos, e a técnica de imunofluorescência para identificação de antígenos nos tecidos. Os resultados do presente estudo demonstraram que todos os animais ficaram infectados (positivos ao exame parasitológico). O fígado mostrou-se com lesões, com alguns granulomas espalhados pelo parênquima hepático e também com alguns granulomas pluriovulares envolvidos por células epitelióides, bem delimitados. No tecido pulmonar foi detectado um granuloma periovular. Os rins exibiram estrutura histológica dentro dos limites normais. O baço apresentou-se congesto, mas sem reação de polpa branca, com manutenção da mesma dentro dos limites normais. Já o intestino, principalmente do animal de número 05, demonstrou ter sido atingido nas camadas muscular e serosa, indicativo de infecção forte com granulomas no intestino delgado e grande quantidade de ovos na mucosa.

**Palavras-chave:** Esquistossomose; *Schistosoma Mansoni*; Granulomas hepáticos; Hamster.

## INTRODUÇÃO

A esquistossomose mansônica foi detectada em múmias egípcias de mais de 3.000 anos atrás. Provavelmente, a doença se concentrou originalmente no Egito, se espalhando daí por grande parte do território africano. A doença foi trazida ao Brasil através dos escravos africanos e aqui se estabeleceu graças à presença de hospedeiro intermediário para o parasito *Schistosoma mansoni*, moluscos do gênero *Biomphalaria* (PESSOA, 1969).

Clinicamente, a esquistossomose apresenta uma fase inicial denominada fase aguda, que é alvo deste estudo. Após algumas semanas da infecção, o hospedeiro começa a apresentar reações variadas onde o *S. mansoni* desafia o hospedeiro com uma multiplicidade de antígenos, originados de cercárias, esquistossômulos, vermes adultos e ovos. A liberação destes antígenos no sítio de deposição do ovo maduro desencadeia no hospedeiro uma reação granulomatosa que é caracterizada, na fase aguda, pela presença de infiltrados celulares compostos de: macrófagos,

<sup>1</sup> Estudante de Graduação do Curso e Ciências Biológicas da Universidade Católica do Salvador-UCSAL. Trabalho realizado e financiado pelo Laboratório de Patologia Experimental, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz-CPqGM/Fiocruz-Ba. E-mail: [manuelacaldas2003@yahoo.com.br](mailto:manuelacaldas2003@yahoo.com.br).

<sup>2</sup> Orientador. Pesquisador Titular da Fundação Oswaldo Cruz e Chefe do Laboratório de Patologia Experimental (Lapex). E-mail: [zilton@cpqgm.fiocruz.br](mailto:zilton@cpqgm.fiocruz.br).

eosinófilos e linfócitos, construindo a reação hiperérgica (FRIEDMAN, 1999). O miracídio no interior do ovo maduro representa o principal fator patogénico (BOROS, 1989).

Na infecção do hamster o infiltrado celular foi predominantemente linfo-histiocitário e estes animais apresentaram grande susceptibilidade à esquistossomose, nele ocorrendo o desenvolvimento de maior número de vermes adultos (WARREN & PETERS, 1967). Este trabalho consistiu em reproduzir a infecção pelo *S. mansoni* no hamster (*Cricetus auratus*) como treinamento para a reprodução do ciclo vital do parasito e para o estudo histopatológico dos principais aspectos da esquistossomose no dito hospedeiro.

## MATERIAIS E MÉTODOS

Foram utilizados hamsters dourados (*C. auratus*) do sexo feminino com peso variável entre 120g e 155g, obtidos do Biotério da FIOCRUZ, onde foram mantidos em caixas, em salas arejadas com provimento de água e ração comercial balanceada. O hamster foi escolhido por ser susceptível ao *S. mansoni*, sendo, todavia, um modelo experimental que apresenta aspectos peculiares na sua patologia, quando comparados a outros modelos e ao homem. (WARREN & PETERS, 1967).

Cinco animais foram infectados com 100 cercárias do *S. mansoni*, cepa de Belo Horizonte, através de injeção intraperitoneal (fig 1). Estes animais foram pesados antes da infecção e, semanalmente, após a infecção.



Figura 1: Injeção de 100 cercárias no hamster.

## INFECCÃO

Caramujos previamente infectados com *S.mansoni* foram deixados expostos à luz artificial por 1 hora em tubos Falcon com 1.0 ml de água para eliminação das cercárias que foram utilizadas na infecção.

## EXAME PARASITOLÓGICO DAS FEZES

Após 08 semanas os animais foram submetidos ao exame parasitológico de fezes. Estas foram recolhidas separadamente de cada animal. Fragmentos das fezes foram homogeneizados em pequena quantidade de água destilada. As amostras foram colocadas em lâminas histológicas

de mistura com verde malaquita, cobertas com uma lamínula e observadas ao microscópio com ocular de 10X e objetiva de 10 ou 20X.

## PROCEDIMENTOS GERAIS

Na oitava semana pós-infecção (fase aguda da infecção), os animais foram anestesiados (4 ml de Ketamina + 1 ml de Xilazina + 5 ml de água destilada ou Salina a 0,85%), aplicando-se uma injeção de 1 ml da solução para cada 100g de peso animal. Logo depois, estes animais foram sacrificados, após abertura da cavidade abdominal e secção da aorta abdominal (fig 2.).



Figura 2: Abertura da cavidade abdominal após 08 semanas de infecção.

Após uma inspeção geral dos órgãos, foram retirados fragmentos do fígado, intestinos, baço, rim e pulmão para análises histopatológicas posteriores. Estes fragmentos foram fixados em formol tamponado a 10% por alguns dias e, em seguida, procedeu-se a desidratação em álcool, clareamento em xilol e inclusão em parafina. Os blocos assim obtidos foram cortados em micrótomo, obtendo-se secções de aproximadamente 5 micrômetros de espessura, as quais foram coradas em hematoxilina e eosina e em picro-sirius vermelho para evidenciação de fibras colágenas.

## CONTAGEM DO NÚMERO DE OVOS POR GRAMA DE TECIDO

Foram pesados o fígado íntegro e o fragmento escolhido para digestão. Este fragmento foi picotado e transferido para um recipiente com 50 ml de KOH a 4 % e incubado por 6-7 horas, tendo sido agitado algumas vezes. Uma vez digerido o material, foram retiradas 5 amostras de 1 ml para contagem dos ovos em placa escavada. Para finalizar, calculou-se a média do número de ovos das amostras, extrapolando o valor para 50 ml da solução.

## IMUNOFLUORESCÊNCIA

As secções histológicas em parafina do tecido hepático foram desparafinizadas em xilol por 10 min (3 banhos) e em álcool absoluto por 5 min (2 banhos). Em seguida os cortes foram lavados em água corrente, água destilada e deixados em PBS/BSA 2% por 5 min. As lâminas contendo os cortes foram secadas em torno da secção histológica, sobre a qual foram colocadas gotas de soro de paciente humano proveniente de um portador de esquistossomose (60ul/corte) e

incubadas 37°C por 30 min. Após a incubação os cortes foram lavados em PBS por 4 min (3 vezes) e em seguida cobertos com anti- IgG humana fluoresceïnada diluída de 1:100 em PBS/BSA + Azul de Evans diluído de 1:5 e novamente os cortes foram incubados por 30 min a 37°C, lavados com PBS por 4 min (3 vezes) e a montagem das lâminas foi feita com anti-fade e lamínula para conservação da fluorescência e observação no microscópio de fluorescência, dotado de iluminação UV , filtros barreira e excitador.

## RESULTADOS

Foi observada uma discreta variação de peso em todos os animais durante o período da infecção, que pode ser observada na figura 3. Todos os animais foram pesados semanalmente após a infecção.

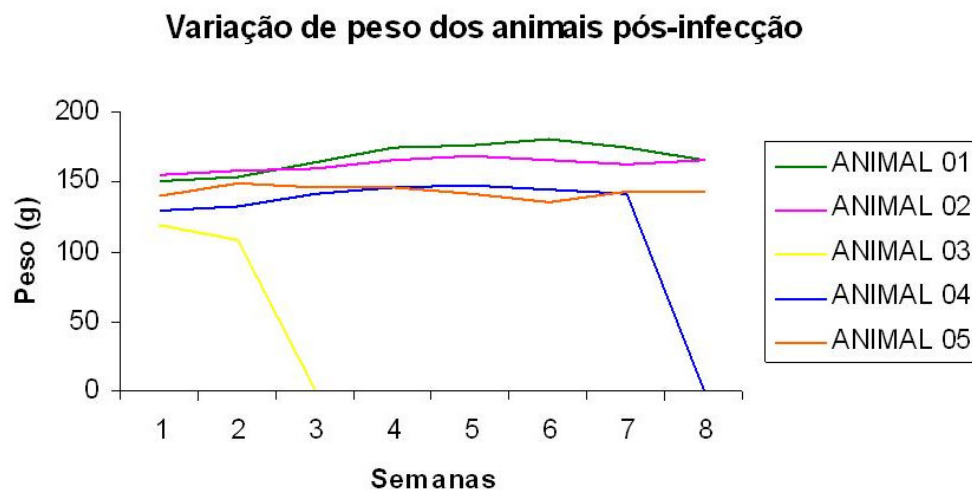


Fig 3 – Os animais ganharam e perderam peso durante todo período pós-infecção.

## PARASITOLÓGICO DE FEZES

Todos os animais submetidos ao exame parasitológico de fezes foram considerados positivos.

## CONTAGEM DO NÚMERO DE OVOS/GRAMA DE TECIDO

Apenas no animal número 01 a contagem dos ovos foi feita com sucesso. Nos outros dois animais esta contagem foi negativa (Tabela 1).

**TABELA 1: CONTAGEM DE OVOS POR GRAMA DE TECIDO.**

Animais	Ovos por grama de tecido
Animal 01	3,771,073
Animal 02	-----
Animal 05	-----



## ACHADOS HISTOLÓGICOS

Nas análises histológicas, o fígado mostrou-se com lesões, com alguns granulomas espalhados pelo parênquima hepático, alguns pluriovulares envolvidos por células epitelióides e também delimitados (fig 4). No tecido pulmonar foi detectado um granuloma periovular (fig 5.) Os rins exibiram estrutura histológica dentro dos limites normais. O baço apresentou-se congestionado, mas sem reação de polpa branca, com manutenção da mesma dentro dos limites normais. Já no intestino, as camadas muscular e serosa foram atingidas, indicativo de infecção forte com granulomas no intestino delgado e grande quantidade de ovos na mucosa (fig 6).

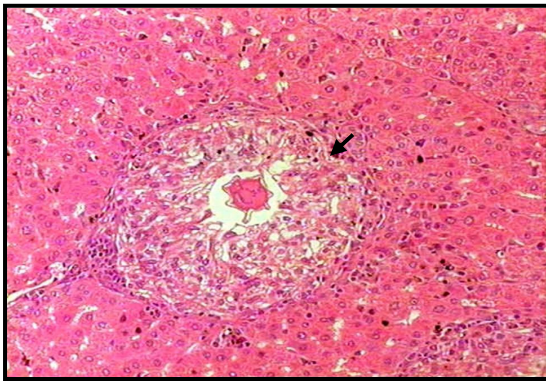


Figura 4 : Granuloma no fígado com células epitelióides em volta (seta). H.E. 200x.

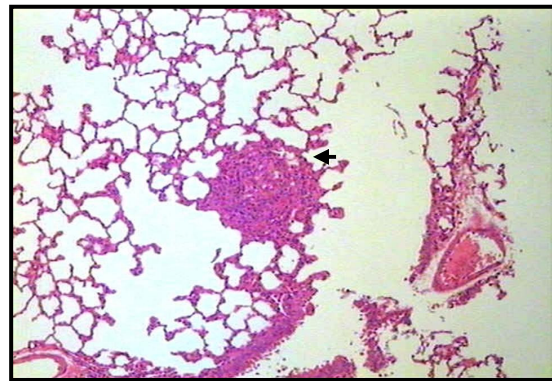


Figura 5: Granuloma no pulmão (seta). H.E.100x

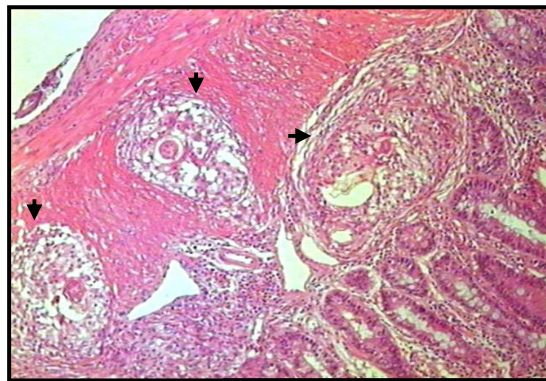


Figura 6: Intestino delgado com granulomas nas camadas muscular e serosa (seta).

## IMUNOFLUORESCÊNCIA

Granulomas esquistossomóticos hepáticos com marcação para antígeno em verde-maçã fluorescente foram mostrados nesta técnica que é utilizada frequentemente para evidenciar antígenos (fig 7 e 8).

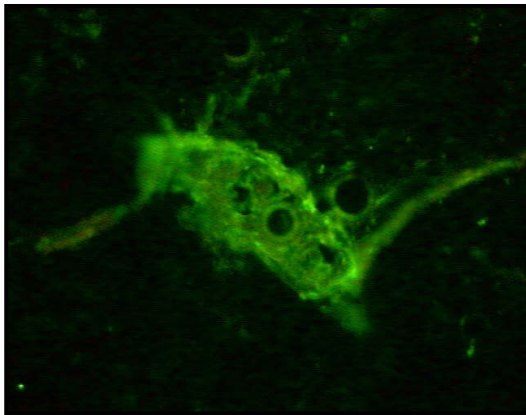


Figura 7 – Marcação de antígeno nos granulomas com ovo de *Schistosoma mansoni* localizado no parênquima hepático em verde-maçã fluorescente. 400X.

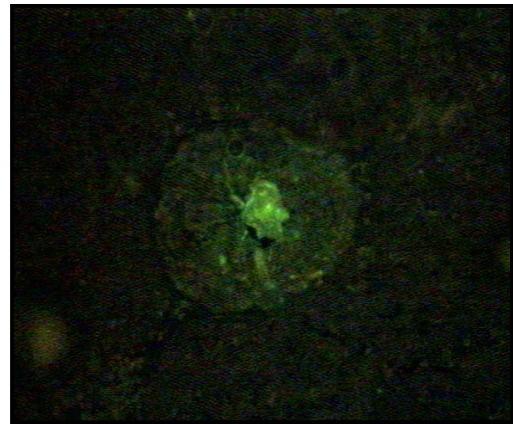


Figura 8 - Granuloma esquistossomótico hepático com marcação para antígeno em verde-maçã fluorescente. Infecção 08 semanas. 200 X.

## DISCUSSÃO

Animais de pequeno porte, como os roedores, são amplamente utilizados em estudos experimentais devido ao fácil manejo, facilidade na inoculação e manutenção em biotérios e pelo próprio curso da infecção, a qual se assemelha à da esquistossomose em humanos (CHEEVER, 1965). Os hamsters, apesar de agressivos, adaptam-se rapidamente ao manejo e tornam-se animais dóceis.

GROOVE & WARREN (1976) afirmaram que comparados aos ratos, os hamsters possuem granulomas menores. No presente trabalho foram encontrados granulomas bastante delimitados, rodeados por células epitelióides e sem necrose evidente, como observado por ASSEF (2007).

Outro aspecto muito importante da infecção no hamster é a amiloidose, que é muito comum no hamster sírio (HAMED et al., 2006). A amilóide é uma substância protéica patológica depositada entre as células em vários tecidos e órgãos do corpo com uma grande variedade de formas clínicas. Em colorações de rotina ela apresenta-se como uma substância amorfa eosinofílica hialina e extracelular, a qual, com o acúmulo progressivo, invade os tecidos e produz uma atrofia por compressão das células adjacentes (CONTRAN et al., 1991). Estudos feitos por HAMED et al (2006) evidenciaram que, embora nenhum depósito de amilóide tenha sido observado em hamsters normais, (isto pode ser pela curta duração do estudo – 24 semanas –), os hamsters infectados com o *S. mansoni* ou o *S. hematobium* mostraram os depósitos de amilóide após 08 semanas. Contudo a amiloidose não ocorreu no presente experimento, mesmo o sacrifício tendo ocorrido após 08 semanas. No desenvolvimento do experimento, foi utilizada a técnica de contagem de ovos por grama de tecido que foi descrita por CHEEVER (1970), mas houve algumas dificuldades na obtenção dos ovos, mesmo esta técnica já tendo sido feita anteriormente em outros trabalhos com sucesso. Certamente a ausência de ovos se deva ao fato do fragmento para digestão ter sido retirado da borda do fígado.

ASSEF (2007) reportou que hamsters infectados com 100 cercárias de *S. mansoni* de Belo Horizonte perderam peso durante o período de incubação de oito semanas, mas os

resultados deste presente estudo demonstraram que os animais ganharam e perderam peso durante todo o período pós-infecção.

## REFERÊNCIAS

ASSEF, J. C. ; VIEIRA, A.C.P.O., SAITO, H.C.G.; LANCELLOTTE, C.L.P.; SZUTAN, L.A.; JÚNIOR, A.C. Modelo experimental de formação de varizes esofágicas por hipertensão portal esquistossomótica em hamsters. **Int. Uro. Nephrol.** v.32, n °4, 2007.

BOROS, D.L. Immunopathology of *s. mansoni* infection. **Clinical Microbiology Reviews**, 2: 250-269, 1989.

CHEEVER, A. W. A comparative study of *Shistosoma mansoni* infections in mice, gerbils, multimammate rats and hamsters. II. Qualitative pathological differences. **Am. J. Trop. Med. & Hyg.**; 10:227-238, 1965.

CHEEVER, A.W. Relative resistance of the eggs o human schistosomes to digestion in potassium hydroxide. **Bull. World Health Organ.**; 43: 601-03, 1970.

CONTRAN, Ramzi S; KUMAR, Vinay; ROBBINS, Stanley L. **Patologia estrutural e funcional**. 6 ed. Editora Guanabara Koogan S.A, Rio de Janeiro, 1991.

FRIEDMAN, S. L. Cytokines and fibrogenesis. **Semin. Liver Dis.**, 19:129-140, 1999.

GROVE DI, WARREN KS. Relation of intensity of infections to disease in hamsters with acute schistosomiasis mansoni. **Am J Trop Med Hyg.** 25: 608-12, 1976.

HAMED, S.M.; EL-KENAWY, A. E.M.; EL- KOTT, A. F. ; MOUSTAFA, F. E.-H.; ABOL-ENEIN, H. Schistosoma-induced amyloidosis in hamsters is gender-dependent. **Int Urol Nephrol.** 38:707-712, 2006. CONTRAN, Ramzi S; KUMAR, Vinay; ROBBINS, Stanley L. **Patologia estrutural e funcional**. 6 ed. Editora Guanabara Koogan S.A, Rio de Janeiro, 1991.

PESSOA, S. B.; MARTINS, A. V. **Parasitologia Médica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1969.

WARRENS, KS. & PETERS, PA. Comparision of penetration and maturation of *Schistosoma mansoni* in the hamster, mouse, guinea pig, rabbits, and rats. **Am J Trop Med Hyg.** 16: 718-22, 1967.