

DANIEL VALLE VASCONCELOS SANTOS

O FATOR DE CRESCIMENTO NEURONAL NA INFECÇÃO POR *Schistosoma mansonii*: ESTUDO MOLECULAR, IMUNOENZIMÁTICO E MORFOMÉTRICO EM MODELO PERMISSÍVEL E NÃO PERMISSÍVEL À INFECÇÃO

Orientador: Prof. Dr. Manoel da Silva Filho

BELÉM-PARÁ
2013

DANIEL VALLE VASCONCELOS SANTOS

O FATOR DE CRESCIMENTO NEURONAL NA INFECÇÃO POR *Schistosoma mansonii*: ESTUDO MOLECULAR, IMUNOENZIMÁTICO E MORFOMÉTRICO EM MODELO PERMISSÍVEL E NÃO PERMISSÍVEL À INFECÇÃO

Tese de doutorado apresentada e aprovada pela coordenação do Curso de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular, da Universidade Federal do Pará, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Neurociências.

Orientador: Prof. Dr. Manoel da Silva Filho

BELÉM-PARÁ
2013

DANIEL VALLE VASCONCELOS SANTOS

O FATOR DE CRESCIMENTO NEURONAL NA INFECÇÃO POR *Schistosoma mansoni*: ESTUDO MOLECULAR, IMUNOENZIMÁTICO E MORFOMÉTRICO EM MODELO PERMISSÍVEL E NÃO PERMISSÍVEL À INFECÇÃO

Orientador: Prof. Dr. Manoel da Silva Filho

Banca examinadora: Profa. Dra. Lourdes Maria Garcez dos Santos

Prof. Dr. Anderson Raiol Rodrigues

Prof. Dr. Chubert Bernardo Castro de Sena

Prof. Dr. Moisés Hamoy

Belém, 3 de julho de 2013

BELÉM-PARÁ
2013

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

Santos, Daniel Valle Vasconcelos, 1981-
O fator de crescimento neuronal na infecção
por *Schistosoma mansoni*: estudo molecular,
imunoenzimático e morfométrico em modelo
permissível e não permissível à infecção /
Daniel Valle Vasconcelos Santos. - 2013.

Orientador: Manoel da Silva Filho.
Tese (Doutorado) - Universidade Federal do
Pará, Instituto de Ciências Biológicas, Programa
de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia
Celular, Belém, 2013.

1. *Schistosoma mansoni*. 2. Esquistossomose.
3. Fatores de crescimento de nervos. 4. Cortex
visual. 5. Sistema nervoso central. I. Título.

CDD 22. ed. 616.963

AGRADECIMENTOS

Ao fim desta etapa de minha vida profissional não poderia deixar, mais uma vez, de agradecer àqueles que sempre me apoiaram incondicionalmente em todos os momentos de minha vida, minha família, Marco Antonio, Ana Sarah, Eduardo e Julianne.

A minha namorada, companheira, confidente, meu porto seguro e lua da minha vida, Thayse. Eu amo você muito mais do que posso descrever.

Minha especial gratidão ao Prof. Dr. Manoel da Silva Filho pela orientação, aprendizado e amizade que marcaram nossa convivência nestes últimos 12 anos. Foi um privilégio poder trabalhar com o senhor.

Muito obrigado ao Instituto Evandro Chagas na pessoa da Dra. Elizabeth Conceição de Oliveira Santos pela vital colaboração em me acolher para realizar parte dos experimentos. Agradeço também a Dra. Isabel R. de Carvalho Rodrigues por me permitir utilizar as instalações do Laboratório de Parasitoses Intestinais e Malacologia e ceder os animais utilizados durante os experimentos deste trabalho.

Agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), à Coordenação de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular e à Universidade Federal do Pará (UFPA), em especial aos professores, pelo incentivo dado a todos aqueles que desejam investir em seu futuro próprio e ao futuro da pesquisa científica brasileira.

A secretária do Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular (PPNBC), Socorro Andrade, pelo competente trabalho feito mesmo diante de tantas dificuldades.

A Fundação Amazônia Paraense (FAPESPA) pelo apoio financeiro.

A todos os meus amigos e colegas de trabalho, pelos momentos de descontração fundamentais em nossas vidas, em especial a Natielle, Manoella, Kauê, Leandro, Silvio, Thais, Glenda, Adriano, Flávia e Thayana.

“Nada é mais fatal para o progresso da mente humana do que achar que nossas visões da ciência são definitivas, que nossos triunfos são completos, que não há mais mistérios na natureza, e que não há mais mundos a serem conquistados”

*- Sir Humphry Davy
Químico britânico*

RESUMO

A esquistossomose é uma doença tropical causada, principalmente, pelo trematódeo *Schistosoma mansoni*, sendo que sua ocorrência afeta, mundialmente, 110 milhões de pessoas. A deposição dos ovos do parasita pode ocorrer, de forma ectópica, no sistema nervoso central (SNC) o qual leva à formação de granulomas com conseqüente produção do Fator de Crescimento Neuronal (NGF). Uma vez que muitos estudos demonstram a importância do NGF no desenvolvimento das vias corticais visuais, nosso estudo visou avaliar a possível alteração dos níveis de NGF no sistema visual assim como o impacto deste sobre a morfologia de células piramidais em dois modelos animais. A alteração na concentração do fator de crescimento assim como a morfometria neuronal foram avaliadas em animais permissíveis (camundongos) e não permissíveis (ratos) à infecção. Foram utilizados 174 ratos (*Hooded Lister*) e 135 camundongos albinos criados e mantidos em gaiolas e alimentados *ad libitum*. Esses animais foram inoculados, logo após o nascimento, com 50 cercárias. Setenta e sete ratos e 73 camundongos foram inoculados com solução salina e constituíram o grupo controle do estudo. Os períodos de infecção abrangeram uma a 48 semanas. Amostras do fígado e córtex visual foram retiradas, extraídas e quantificadas com kit de imunoenensaio (*ChemiKine™ Nerve Growth Factor (NGF) Sandwich ELISA Kit - Chemicon International*). Para a análise morfométrica utilizamos células piramidais da camada IV do córtex visual marcadas através de injeção extracelular com Dextrana-Biotinilada (10.000 kDa). Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão. Utilizamos teste t de Student para determinar diferenças estatísticas entre os grupos estudados. O valor médio de NGF encontrado no córtex visual de ratos infectados foi 39,2% maior do que no grupo controle (infectados: $400,9 \pm 143,1$ pg/mL; controle: $288 \pm 31,9$ pg/mL; $p < 0,0001$). Nas amostras de fígado, o aumento foi 28,9% maior no grupo infectado (infectados: $340,9 \pm 103,9$ pg/mL; $p < 0,01$; controle: $264,4 \pm 38,6$ pg/mL). Nenhum aumento significativo foi detectado antes de uma semana de infecção. Entre os camundongos, o aumento de NGF na área visual foi de 94,1% (infectados: $478,4 \pm 284$ pg/mL; $p < 0,01$; controle: $246,5 \pm 76,8$ pg/mL). No fígado

destes animais o aumento foi de 138,7% (infectados: $561,8 \pm 260,7$ pg/mL; $p < 0,01$; controle: $301,3 \pm 134,6$ pg/mL). Em camundongos encontramos diferenças significativas quanto aos parâmetros dendríticos avaliados. A quantidade de dendritos foi 11,41% maior no grupo infectado do que no controle (controle: $25,28 \pm 5,19$; infectados: $28,16 \pm 7,45$; $p < 0,05$). O comprimento total dos dendritos também foi afetado (controle: $4.916,52 \pm 1.492,65$ μm ; infectados: $5.460,40 \pm 1.214,07$ μm ; $p < 0,05$) correspondendo a um aumento de 11,06%. A área total do campo receptor dendrítico sofreu um aumento de 12,99% (controle: $29.346,69 \pm 11.298,62$ μm^2 ; infectados: $33.158,20 \pm 7.758,31$; $p < 0,05$) enquanto que a área somática teve uma redução de 13,61% (controle: $119,38 \pm 19,68$ μm^2 ; infectados: $103,13 \pm 24,69$ μm^2 ; $p < 0,001$). Quando foram avaliados os efeitos do aumento de NGF em ratos infectados não observamos diferenças significativas quanto aos parâmetros dendríticos analisados, em comparação ao grupo controle, com exceção de um aumento na área do corpo neuronal da ordem de 21,18% (controle: $132,20 \pm 28,46$ μm^2 ; infectados: $160,20 \pm 31,63$ μm^2 ; $p < 0,00001$). Este trabalho mostrou que a reação de produção de NGF no SNC durante a infecção por *Schistosoma mansoni* ocorre em maior magnitude no modelo permissível do que no modelo não permissível. Também demonstramos que, em camundongos, os efeitos sobre a morfologia neuronal é drasticamente afetada quando o organismo é submetido a um aumento na concentração de NGF em decorrência da infecção por *Schistosoma mansoni*. Diante destes dados, estudos avaliando as possíveis repercussões visuais e também dos efeitos na fisiologia celular causados pela infecção mansônica torna-se necessário para avaliar o real dano causado por este aumento patológico do fator de crescimento neuronal nas vias visuais de mamíferos.

Palavras-chaves: NGF; córtex visual, *Schistosoma mansoni*

ABSTRACT

Schistosomiasis is a tropical disease caused by *Schistosoma mansoni*. Its occurrence affects 110 million people worldwide. The deposition of eggs of the parasite may occur - in ectopic form - in the central nervous system (CNS) which leads to the formation of granulomas with consequent production of nerve growth factor (NGF). Since several studies have demonstrated the importance of NGF in the development of visual cortical pathways, our study aimed at evaluating the possible changes in the NGF concentrations in the visual system as well as the impact of this on the pyramidal cell morphology in two animal models. The change in concentration of the nerve growth factor as well as neuronal morphology were evaluated in susceptible and non-susceptible animals (mice and rats) to infection. We used 174 rats (Hooded Lister) and 135 albino mice bred and kept in cages and fed *ad libitum*. These animals were infected shortly after birth, with 50 cercariae. Seventy seven rats and 73 mice were inoculated with saline and constituted the control group of the study. The infection covered a period of 48 weeks. Samples of liver and visual cortex were removed, extracted and quantified with immunoassay kit (ChemiKine™ Nerve Growth Factor (NGF) Sandwich ELISA Kit - Chemicon International). For the morphometric analysis we used the pyramidal cells of the visual cortex layer IV marked by extracellular injection of biotinylated dextran (10,000 kDa). The results were expressed as mean \pm standard deviation. We used Student t test to determine statistical differences between groups. The average value of NGF found in the visual cortex of rats infected was 39.2% higher than in the control group (infected: 400.9 ± 143.1 pg/ml, control: 288 ± 31.9 pg/mL, $p < 0.0001$). In liver samples, the increase was 28.9% higher in the infected group (infected: 340.9 ± 103.9 pg/mL, $p < 0.01$, control: 264.4 ± 38.6 pg/mL). No significant increase was detected within a week of infection. Among the mice group, the increase of NGF in the visual area was 94.1% (infected: 478.4 ± 284 pg/ml, $p < 0.01$; control: 246.5 ± 76.8 pg/ml). In the liver of these animals the increase was 138.7% (infected: 561.8 ± 260.7 pg/mL, $p < 0.01$, control: 301.3 ± 134.6 pg/mL). In mice group we found significant differences in dendritic parameters evaluated. The number of dendrites was 11.41% higher in the infected group

than in the control (control: 25.28 ± 5.19 ; infected: 28.16 ± 7.45 , $p < 0.05$) . The total length of dendrites was also affected (control: $4916.52 \pm 1492.65 \mu\text{m}$; Infected: $5460.40 \pm 1214.07 \mu\text{m}$; $p < 0.05$), representing an increase of 11.06%. The total area of the dendritic receptive field was increased by 12.99% (control: $29.346,69 \pm 11.298,62 \mu\text{m}^2$; Infected: $33.158,20 \pm 7.758,31 \mu\text{m}^2$, $p < 0.05$) while the area had a somatic reduction of 13.61% (control: $119.38 \pm 19.68 \mu\text{m}^2$; infected: $103.13 \pm 24.69 \mu\text{m}^2$, $p < 0.001$). When we evaluated the effects of increased NGF in rats infected we did not observe significant differences in dendritic parameters analyzed, compared to the control group, except for an increase in the area of the neuronal body of approximately 21.18% (control: $132,20 \pm 28.46 \mu\text{m}^2$; infected: $160.20 \pm 31.63 \mu\text{m}^2$, $p < 0.00001$). This work showed that the reaction production of NGF in the CNS during infection with *Schistosoma mansoni* occurs in greater magnitude than permissible in the model in the model impermissible . We also demonstrated that in mice the effects on neuronal morphology is dramatically affected when the body is subjected to an increase in the concentration of NGF as a result of infection by *Schistosoma mansoni*. Given these data, studies evaluating the potential impact of visual effects and also in cell physiology caused by schistosomiasis infection becomes necessary to assess the actual damage caused by this pathological increase of nerve growth factor in the visual pathways of mammals .

ÍNDICE DE CONTEÚDO

1.0 INTRODUÇÃO.....	6
1.1 HISTÓRICO DA ESQUISTOSSOMOSE	6
1.2 O CICLO EVOLUTIVO DO PARASITA	8
1.3 A DOENÇA	10
1.4 GRANULOMAS NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL (SNC)	10
1.5 HISTÓRICO DO FATOR DE CRESCIMENTO NEURONAL (NGF).....	11
1.6 FUNÇÕES CONHECIDAS DO NGF	12
1.6 A INFECÇÃO POR <i>Schistosoma mansoni</i> E O NGF	16
1.7 O NGF E O SISTEMA VISUAL.....	17
2.0 OBJETIVOS	19
2.1 OBJETIVO GERAL.....	19
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
3.0 METODOLOGIA.....	20
3.1 MODELOS EXPERIMENTAIS.....	20
3.2 FASE 1: DETECÇÃO MOLECULAR DO PARASITA.....	24
3.2.1 Extração do DNA.....	24
3.2.2 PCR e eletroforese.....	25
3.3 FASE 2: ANÁLISE IMUNOENZIMÁTICA	25
3.4 FASE 3: ESTUDO MORFOMÉTRICO	26
3.4.1 Controle de qualidade.....	27
4.0 RESULTADOS	30
4.1 DETECÇÃO DO PARASITA.....	30
4.2 CONCENTRAÇÃO DE NGF.....	33
4.2.1 Camundongos.....	33
4.2.2 Ratos.....	35
4.3 MORFOMETRIA NEURONAL.....	38
4.3.1 Camundongos.....	38
4.3.2 Ratos.....	38
5.0 DISCUSSÃO	48
5.1 DETECÇÃO MOLECULAR DO PARASITA	48
5.2 ANÁLISE IMUNOENZIMÁTICA	51
5.3 ESTUDO MORFOMÉTRICO	52
6.0 CONCLUSÃO	54
7.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	55

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1 Distribuição brasileira das principais espécies de caramujos hospedeiros do *Schistosoma mansoni*. 7
- Figura 2 Ciclo evolutivo simplificado do *Schistosoma mansoni*. 1. Ovo do parasita com seu espículo lateral característico; 2. Forma infectante para o caramujo, o miracídio; 3. Caramujo *Biomphalaria glabrata*; 4. Forma infectante para o homem, a cercária; 5. O homem é infectado ao banhar-se em águas contaminadas com cercárias; 6. Parasitas adultos (macho e fêmea). Esta forma acasalada é habitualmente encontrada nas veias mesentéricas do organismo hospedeiro..... 9
- Figura 3 Resumo do histórico das principais funções conhecidas do NGF ao longo do tempo de acordo com cada área de estudo. 15
- Figura 4 Esquema proposto para os grupos de trabalho. Grupo experimental: 1. Rato McCoy (modelo não permissível) infectado com 50 cercárias de *S. mansoni*; 2. Camundongo albino (modelo permissível) infectado com 50 cercárias de *S. mansoni*. Grupo controle: 3. Rato McCoy não infectado; 4. Camundongo albino não infectado. Todas as infecções ocorreram até 72 horas após o nascimento de cada animal..... 22
- Figura 5 Exemplo de como é feita a análise de Sholl em um neurônio piramidal. Os círculos vermelhos possuem um incremento de 50 μm em relação ao seu antecessor. Os pontos azuis representam as ramificações encontradas em cada interseção e que foram plotadas em função da distância em relação ao corpo celular. 29
- Figura 6 Gel de agarose 2% corado com Brometo de Etídio mostrando a amplificação da região específica do mtDNA de *S. mansoni*. 1) Padrão peso molecular; 2) Controle positivo (cercárias de *S. mansoni*); 3) Bloco cortical contendo a área visual de camundongo inoculado há 32 semanas; 4) Bloco cortical contendo a área visual de camundongo não inoculado; 5) Bloco cortical contendo a área visual de rato não inoculado; 6) Bloco cortical contendo a área visual de rato infectado há 39 semanas; 7) Fígado de camundongo inoculado. 31

Figura 7 Concentração de NGF em diferentes áreas de interesse. Topo) Resultado da hiperexpressão do fator de crescimento neuronal após a inoculação de 50 cercárias em camundongos. O aumento de NGF nas 3 áreas estudadas foi estatisticamente significativo (fígado $p < 0,01$; visual $p < 0,01$; demais áreas $p < 0,001$); Baixo) Camundongos infectados com 50 cercárias mostrando o pico de produção da neurotrofina em torno da 21ª semana; Até 3 semanas não há aumento significativo comparado com o grupo controle. 34

Figura 8 Topo) Diferentes regiões do rato também são afetadas pelo aumento na concentração de NGF, porém, em menor escala; O aumento de NGF nas 3 áreas estudadas também foi estatisticamente significativo no rato (fígado $p < 0,01$; visual $p < 0,0001$; demais áreas $p < 0,01$); Evolução da concentração de NGF ao longo do tempo de infecção. Baixo) Ratos inoculados mostraram uma reação de produção da neurotrofina em menor escala do que os camundongos e também mostraram um quedas nos níveis de forma mais constante. 36

Figura 9 Alterações na morfologia dendrítica observadas após inoculação com 50 cercárias de *S. mansoni* em células piramidais da camada IV de ratos. 40

Figura 10 Alterações na morfologia dendrítica observadas após inoculação com 50 cercárias de *S. mansoni* em células piramidais da camada IV de camundongos..... 41

Figura 11 Análise de Sholl demonstrando que a distribuição dendrítica de camundongos (A) mostra, em animais infectados, um maior número de interseções até 50 μm de distância do soma devido ao fato da maior quantidade de dendritos primários. Em ratos (B), este aumento no grupo contaminado também foi detectado até 10 μm de distância do soma..... 42

Figura 12 Exemplo do aumento da quantidade total de dendritos e dendritos primários em camundongos infectados. As figuras a direita representam reconstruções digitais das fotomicrografias reais à esquerda; A) Neurônio piramidal em camundongo sadio; B) Neurônio piramidal em camundongo infectado; As setas indicam dendritos secundários emergindo a partir de dendritos primários. 43

Figura 13 Exemplo do aumento da quantidade de dendritos primários em ratos infectados. As figuras a direita representam reconstruções digitais das fotomicrografias reais à esquerda; A) Neurônio piramidal em rato sadio; B) Neurônio piramidal em rato infectado; A seta indica dendrito apical emergindo a partir do soma..... 44

Figura 14 Exemplo do aumento da área do soma em ratos infectados. As figuras a direita representam reconstruções digitais das fotomicrografias reais à esquerda; A) Neurônio piramidal em rato sadio (soma = $72,56 \mu\text{m}^2$); B) Neurônio piramidal em rato infectado (soma = $251,25 \mu\text{m}^2$); A seta indica o soma significativamente aumentado de tamanho no neurônio piramidal pertencente à mesma camada cortical (IV). 45

Figura 15 Exemplo da diminuição da área do soma em camundongos infectados. As figuras a direita representam reconstruções digitais das fotomicrografias reais à esquerda; A) Neurônio piramidal em camundongo sadio (soma = $144,86 \mu\text{m}^2$); B) Neurônio piramidal em camundongo infectado (soma = $117,65 \mu\text{m}^2$); A seta indica o soma significativamente diminuído de tamanho no neurônio piramidal pertencente à mesma camada cortical (IV). 46

Figura 16 Exemplo do aumento da área do campo receptor dendrítico em camundongos infectados. As figuras a direita representam reconstruções digitais das fotomicrografias reais à esquerda; A) Neurônio piramidal em camundongo sadio (área do campo receptor = $11.456,06 \mu\text{m}^2$); B) Neurônio piramidal em camundongo infectado (soma = $65.902,29 \mu\text{m}^2$); A linha pontilhada indica a delimitação do campo receptor significativamente aumentado de tamanho no neurônio piramidal pertencente à mesma camada cortical (IV). 47

1.0 INTRODUÇÃO

1.1 HISTÓRICO DA ESQUISTOSSOMOSE

A esquistossomose permanece um problema de saúde pública em várias partes do mundo, particularmente na África com mais de 200 milhões de pessoas infectadas em 2009 (Maroja, 1953; World Health Organization, 2011). No Brasil estima-se entre 10 e 12 milhões de doentes (Bouchet *et al.*, 2003; Nascimento-Carvalho & Moreno-Carvalho, 2005). É uma parasitose que tem como agente etiológico um trematódeo da subclasse digênea que abriga a família Schistosomatidae com o gênero *Schistosoma* abrangendo espécies completamente adaptadas (Maroja, 1953; Barbosa *et al.*, 1981).

O parasitismo humano por *Schistosoma mansoni* é decorrente de uma linhagem de parasitos que evoluiu anteriormente em roedores (Combes, 1990). Admite-se que esta espécie tenha surgido na Ásia e migrado para a África e, em decorrência das grandes migrações alavancadas pela era das navegações e, conseqüentemente pelo aumento substancial do tráfico de escravos oriundos de regiões endêmicas africanas, a doença acabou se espalhando por quase todos os continentes onde encontrou um hospedeiro suscetível. Da mesma forma, uma das hipóteses, seria que os moluscos hospedeiros poderiam ter sido introduzidos no país em tonéis de água trazidos em embarcações vindas do continente africano. Ao longo deste processo evolutivo, foram selecionadas subpopulações (cepas) devido ao desenvolvimento do helminto em diversas ordens de vertebrados e espécies de moluscos da família Planorbidae (Pitchford, 1977; Frandsen, 1979).

Como parte obrigatória no ciclo biológico dessa infecção, encontramos algumas espécies de caramujos abrigando o *Schistosoma mansoni* como hospedeiro intermediário. As três espécies de moluscos transmissores dessa enfermidade no Brasil são: *Biomphalaria tenagophila*, *Biomphalaria straminea* e *Biomphalaria glabrata*. A distribuição geográfica desses caramujos mostra *B. tenagophila* com habitat mais frequente nos estados da região sul, sudeste e pouca presença no centro-oeste. *B. straminea* com ampla distribuição nos estados do nordeste e pouca presença no centro-oeste e norte; e, finalmente a *B. glabrata* com

presença em quase todo o território brasileiro (Figura 1) (Barbosa *et al.*, 1981; Capron & Capron, 1986; Capron & Dessaint, 1992).

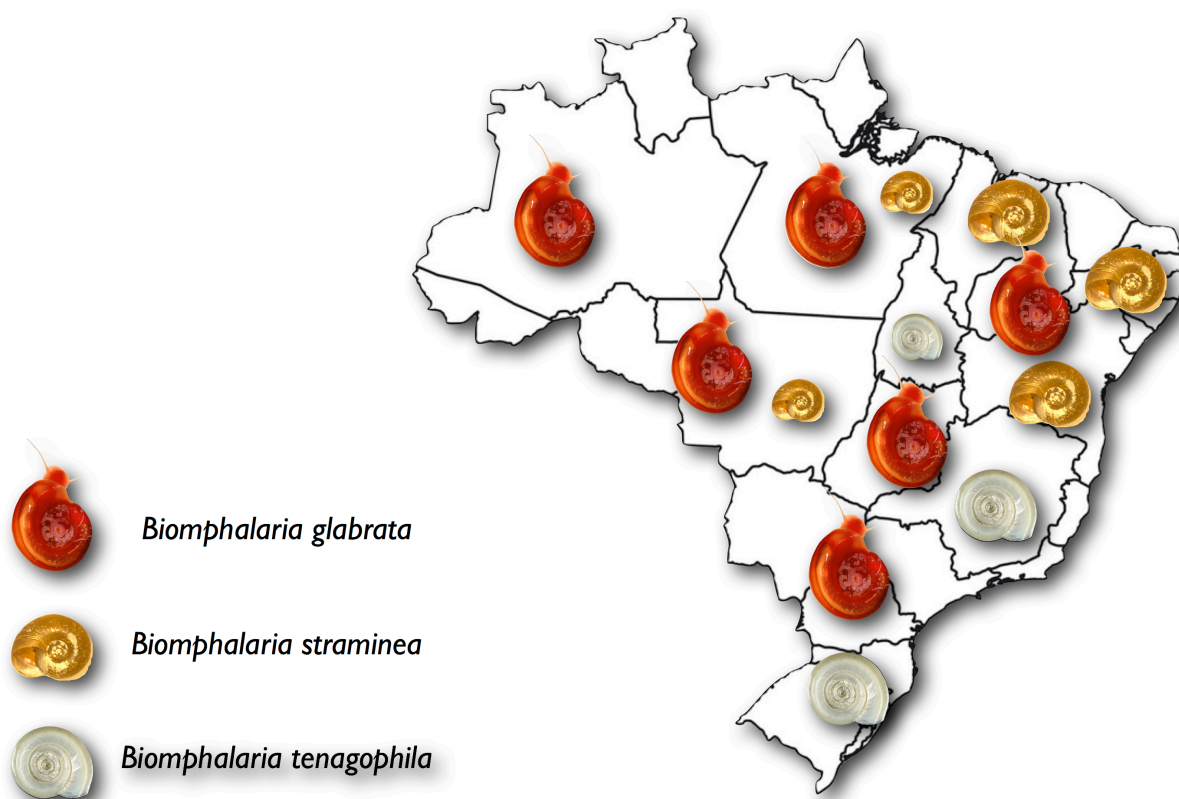


Figura 1 Distribuição brasileira das principais espécies de caramujos hospedeiros do *Schistosoma mansoni*.

Em Belém e algumas cidades do interior do Pará, a *Biomphalaria straminea* e a *Biomphalaria glabrata* têm sido as únicas espécies encontradas, entretanto, somente a última foi achada naturalmente infectada (Santos *et al.*, 1997; Nascimento-Carvalho & Moreno-Carvalho, 2005).

1.2 O CICLO EVOLUTIVO DO PARASITA

A esquistossomose se caracteriza por uma infecção iniciada pela penetração ativa da forma infectante liberada pelo caramujo, a cercária. Esta penetra pela pele humana no momento em que o homem se banha em águas onde existe a presença destes moluscos infectados. A invasão do sistema circulatório acontece em algumas horas. Aproximadamente 25 dias depois, os vermes alcançam a maturidade sexual nas veias do sistema porta-hepático onde se alimentam de sangue e acasalam. No 35º dia, a oviposição acontece na submucosa das veias do plexo hemorroidário intestinal. Após um breve período de maturação, esta fina membrana se rompe levando uma parte dos ovos ao meio externo. A liberação destes ovos contendo a forma infectante para os caramujos – o miracídio - completa o ciclo biológico da doença (Figura 2). Vale ressaltar que as fezes contendo os ovos precisam ser depositadas em coleções aquáticas onde há a presença de moluscos suscetíveis, como, infelizmente, ainda acontece em muitas regiões do Brasil.

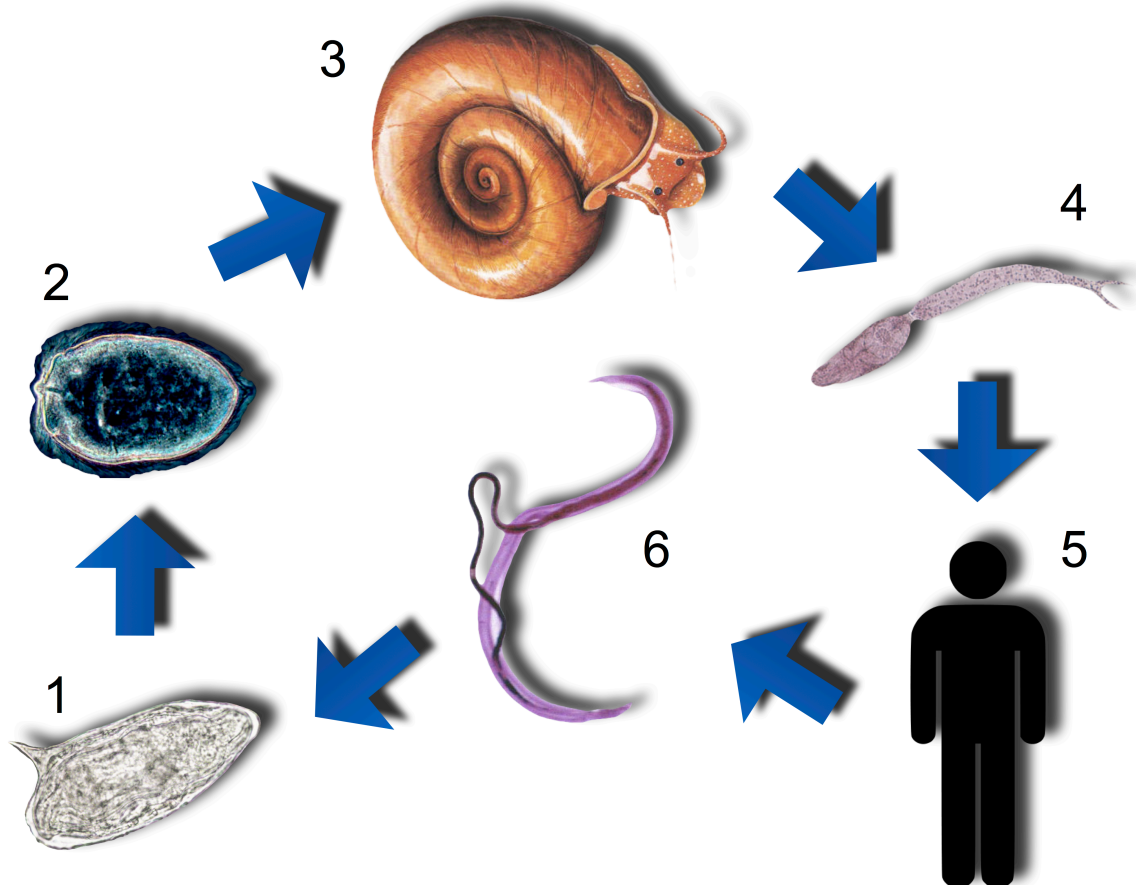


Figura 2 Ciclo evolutivo simplificado do *Schistosoma mansoni*. 1. Ovo do parasita com seu espículo lateral característico; 2. Forma infectante para o caramujo, o miracídio; 3. Caramujo *Biomphalaria glabrata*; 4. Forma infectante para o homem, a cercária; 5. O homem é infectado ao banhar-se em águas contaminadas com cercárias; 6. Parasitas adultos (macho e fêmea). Esta forma acasalada é habitualmente encontrada nas veias mesentéricas do organismo hospedeiro.

1.3 A DOENÇA

A esquistossomose mansônica é basicamente uma doença que decorre da resposta inflamatória granulomatosa que ocorre em torno dos ovos vivos do parasita que não foram levados ao meio externo. Os antígenos são secretados principalmente pela membrana interna da casca do ovo maduro, chamada “envelope de *Von Lichtenberg*”. Esses antígenos atravessam os poros dos ovos disseminando-se na vizinhança do mesmo. Estes sinalizadores, chamados antígenos solúveis dos ovos (SEA, *soluble egg antigens*) induzem tanto a resposta imunológica humoral quanto a celular e são os elementos fundamentais na formação da reação granulomatosa e, portanto, da doença (Scrimgeour & Gajdusek, 1985; Capron & Capron, 1986; Pittella, 1991a; Capron & Dessaint, 1992; Pittella, 1997; Ferrari, 1999).

Na fase aguda, a reação granulomatosa é exacerbada e atinge volume considerável, apresentando volume até 100 vezes o do ovo. Na fase crônica, este granuloma atinge dimensões bem menores, e, sem dúvida, constitui vantagem para o hospedeiro já que, em animais e pessoas imunodeprimidas, os antígenos do ovo – alguns destes, potentes enzimas proteolíticas – vão lesar área bem maior do que a constituída pelo granuloma, além de se observar acúmulo de ovos nas paredes do intestino.

Portanto, a deposição dos ovos do parasita nos tecidos do hospedeiro é o evento fundamental de um complexo fisiopatológico que promoverá a formação do granuloma (ovo mais formação do granuloma que o envolve). Essas lesões granulomatosas são as principais responsáveis pelas variações clínicas e pelas complicações digestivas e circulatórias vistas.

1.4 GRANULOMAS NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL (SNC)

Embora esta doença seja, primordialmente, localizada no sistema digestivo, o SNC é o local mais comum para uma deposição ectópica de ovos. Uma das hipóteses é que os ovos alcançariam o SNC através do fluxo venoso retrógrado para dentro do plexo venoso epidural vertebral de *Batson*, o qual conecta o sistema venoso portal à medula espinhal e veias cerebrais. Esta rota permitiria tanto a

migração anômala dos vermes adultos para locais próximos ao SNC seguido por oviposição *in situ*, ou uma embolização maciça de ovos a partir do sistema porta pélvico-mesentérico (de Abreu Ferrari, 2004; Nascimento-Carvalho & Moreno-Carvalho, 2005).

Os pequenos ovos de *S. japonicum* viajariam por todo este percurso e alcançariam o cérebro. Por outro lado, os ovos de *S. mansoni* e *S. haematobium* (de dimensões relativamente grandes) encontrariam maiores dificuldades. Uma vez depositados no sistema nervoso, os embriões maduros estimulariam a reação periovular granulomatosa, da mesma forma como ocorreria em uma infecção hepato-intestinal. Um grande número de ovos e granulomas arrumados em áreas circunscritas no SNC causariam danos ao sistema nervoso adjacente pela resposta inflamatória por si e por efeito de massa (Levi-Montalcini & Booker, 1960; Scrimgeour & Gajdusek, 1985; Pittella, 1991a; 1997; Ferrari, 1999).

Os ovos poderiam alcançar o SNC tanto pela forma descrita acima (venosa) quanto através do sistema arterial. Os ovos passariam para esta circulação através de derivações arteriovenosas pulmonares ou através de anastomoses porto pulmonares através da veia *Azygos*, o qual se formaria como consequência da hipertensão portal em decorrência do grande número de granulomas formados no fígado (Levi-Montalcini, 1987; Lindvall *et al.*, 1994; Lewin & Barde, 1996; de Abreu Ferrari, 2004).

A formação da reação granulomatosa em decorrência da presença de ovos de *S. mansoni* no SNC também estimula a expressão de fatores inflamatórios e neurotrofinas, entre elas, o fator de crescimento neuronal (NGF), o qual será abordado em seguida.

1.5 HISTÓRICO DO FATOR DE CRESCIMENTO NEURONAL (NGF)

O fator de crescimento neuronal (NGF) foi o primeiro membro da família das neurotrofinas a ser descoberto (Ebendal, 1992). Ele é fundamental para o desenvolvimento e manutenção fenotípica em neurônios no sistema nervoso periférico (SNP) e para a integridade funcional de neurônios colinérgicos no SNC (Aloe *et al.*, 1997). As sequências de aminoácidos e mRNA desta neurotrofina foram classificadas e apontaram que o NGF é uma molécula altamente conservada ao

longo da evolução e compartilha considerável homologia dentre espécies diferentes (Hallböök, 1999). A forma ativa do NGF é construída a partir da clivagem proteolítica de uma forma precursora, o ProNGF, que possui importantes funções durante o desenvolvimento embrionário e vida adulta possuindo tanto função pró-apoptose quanto propriedades neurotróficas (Fahnestock *et al.*, 2004a; 2004b).

A descoberta do NGF data dos anos 50 e foi agraciada com o Prêmio Nobel de Medicina em 1986 (Levi-Montalcini, 1987). Em 1953, Rita Levi-Montalcini, trabalhando com Victor Hamburger implantaram um sarcoma de camundongo em embriões de galinha cujas asas haviam sido extirpadas. Eles observaram que o tecido do tumor produziu um "fator solúvel" que promovia o crescimento de gânglios sensoriais e simpáticos nas proximidades da região retirada (Levi-Montalcini, 1987). Posteriormente, em colaboração com Stanley Cohen, eles isolaram a substância responsável e deram o nome de "fator de crescimento neuronal". Por 35 anos, o NGF tem sido considerado como um poderoso e seletivo fator de crescimento para neurônios simpáticos e sensoriais e também para células formadas a partir da crista neural (Alleva *et al.*, 1993; Rush *et al.*, 1997; Anon, 2001).

1.6 FUNÇÕES CONHECIDAS DO NGF

O NGF controla dinamicamente a síntese de neurotransmissores e neuropeptídeos. Nos neurônios simpáticos a produção de noraepinefrina é regulada por ele através da indução seletiva de tirosina-hidroxilase (TH) (Otten *et al.*, 1977). Na raiz do gânglio dorsal (RGD) a expressão de neuropeptídeos tais como a Substância P (SP) e a Calcitonina pelos neurônios sensoriais primários também está sob o controle do NGF (Mearow & Kril, 1995) e a privação *in vivo* de NGF, como resultado do tratamento anti-NGF, causa uma expressiva queda na síntese de SP e Calcitonina (Verge *et al.*, 1995). O NGF fornece a plasticidade neuronal que permite que o sistema nervoso adulto modifique sua estrutura e função de acordo com o estímulo. De fato, a síntese de NGF em tecidos adultos se correlaciona com as características fenotípicas de neurônios do SNP, tais como densidade de inervação, tamanho do corpo celular, brotamento axonal, arborização dendrítica, indução ou inibição de neuropeptídeos e neurotransmissores (Otten *et al.*, 1977; Lindsay & Harnar, 1989; Mearow & Kril, 1995; Verge *et al.*, 1995).

No sistema nervoso central, a maior parte do NGF é produzido no córtex, hipocampo e glândula pituitária; embora uma quantidade significativa desta neurotrofina também seja produzida em outras áreas, incluindo os gânglios basais, tálamo, medula espinhal e na retina (McAllister, 2001). O NGF possui funções de apoio na sobrevivência e função de neurônios colinérgicos no prosencéfalo basal (Dreyfus, 1989), onde tais funções incluem atenção, excitação, motivação, memória e consciência. Uma vez que os neurônios prosencefálicos são altamente afetados pelo Mal de Alzheimer, o NGF tem sido indicado como um fator protetor e/ou curativo para desordens neurodegenerativas associadas a esses neurônios (Allen & Dawbarn, 2006). No sistema nervoso central, o NGF também regula características fenotípicas nos núcleos noradrenérgicos do hipotálamo e tronco cerebral, participando na regulação central da resposta autonômica (Spillantini *et al.*, 1989; Aloe *et al.*, 1990).

Células do sistema imune-hematopoiético também produzem e utilizam o NGF (Aloe *et al.*, 1997; Bonini *et al.*, 1999; Aloe, 2001). Desde as primeiras descrições dos efeitos do NGF sobre os mastócitos (Aloe & Levi-Montalcini, 1977; Aloe, 1988), o papel desempenhado por esta neurotrofina na regulação das funções imunes e no comportamento das células imunes vem sendo sumariamente caracterizado. Os receptores de NGF são expressos em populações celulares e órgãos do sistema imune permitindo que este module a diferenciação celular e regule a resposta imune. O NGF afeta a sobrevivência e/ou diferenciação e também as características fenotípicas das células-tronco hematopoiéticas (Cattoretti *et al.*, 1993; Chevalier *et al.*, 1994; Auffray *et al.*, 1996; Bracci-Laudiero *et al.*, 2003), granulócitos (Gee *et al.*, 1983; Boyle *et al.*, 1985; Kannan *et al.*, 1991; Bischoff & Dahinden, 1992; Takafuji *et al.*, 1992; Bürgi *et al.*, 1996; Sin *et al.*, 2001; Gibbs *et al.*, 2005; Beigelman *et al.*, 2009), linfócitos (Otten *et al.*, 1989; Brodie & Gelfand, 1992; Ehrhard *et al.*, 1993a; Melamed *et al.*, 1996; Torcia *et al.*, 1996; Lambiase *et al.*, 1997a; Bracci-Laudiero *et al.*, 2005; Noga *et al.*, 2007) e monócitos (Thorpe *et al.*, 1987; Ehrhard *et al.*, 1993b; la Sala *et al.*, 2000; Caroleo *et al.*, 2001; Bracci-Laudiero *et al.*, 2005; Noga *et al.*, 2007; Ma *et al.*, 2010). A concentração de NGF nos tecidos se altera durante a inflamação e mediadores inflamatórios induzem a síntese de NGF em vários tipos celulares (Kawamoto & Matsuda, 2004; Scuri *et al.*, 2010; Seidel *et al.*, 2010). Uma produção elevada de NGF foi demonstrada em tecidos de pacientes com doenças inflamatórias e autoimunes (Linker *et al.*, 2009;

Scuri *et al.*, 2010; Seidel *et al.*, 2010) mas a razão pela qual a concentração de NGF é aumentada nestas situações e como isto pode afetar respostas inflamatórias está longe de ser totalmente compreendida.

As neurotrofinas interagem principalmente com duas classes de receptores celulares; a classe *trk* e a classe $p75^{NTR}$. Dentre o primeiro grupo, os principais receptores transdutores de sinais são uma família de três tirosina-quinases transmembrana chamadas *trkA*, *trkB* e *trkC*, sendo cada uma um dímero. O NGF interage seletivamente com a *trkA*, enquanto o fator neurotrófico derivado do cérebro e a neurotrofina 4/5 interagem principalmente com a *trkB*. A neurotrofina 3 ativa a *trkC* e, em menor intensidade, a *trkB*. Assim como outros receptores tirosina-quinase, a ativação de receptores *trk* depende da dimerização do receptor, um processo iniciado pela ligação da neurotrofina. A fosforilação do domínio citoplasmático dos receptores de *trk* recruta moléculas de sinalização específicas dentro do neurônio, muitas das quais são também usadas por outros receptores tirosina-quinase.

As neurotrofinas também se ligam a um receptor chamado de $p75^{NTR}$. Em contraste aos receptores *trk*, cada neurotrofina se liga ao $p75^{NTR}$ com a mesma afinidade. Acredita-se que o receptor $p75^{NTR}$ tenha várias funções. Primeiro, ele pode expor o NGF ao *trkA*. Segundo, ele transmite sinais intracelulares diretamente através da ativação de vias de transdução, que dependem de sinais desencadeados pelos lipídios da membrana. Paradoxalmente, tem sido demonstrado que a ativação do receptor $p75^{NTR}$ em células que não têm receptores *trk* promove, mais do que evita, a morte neural.

Um resumo do histórico de descobertas acerca das funções do NGF pode ser visto na figura 3.

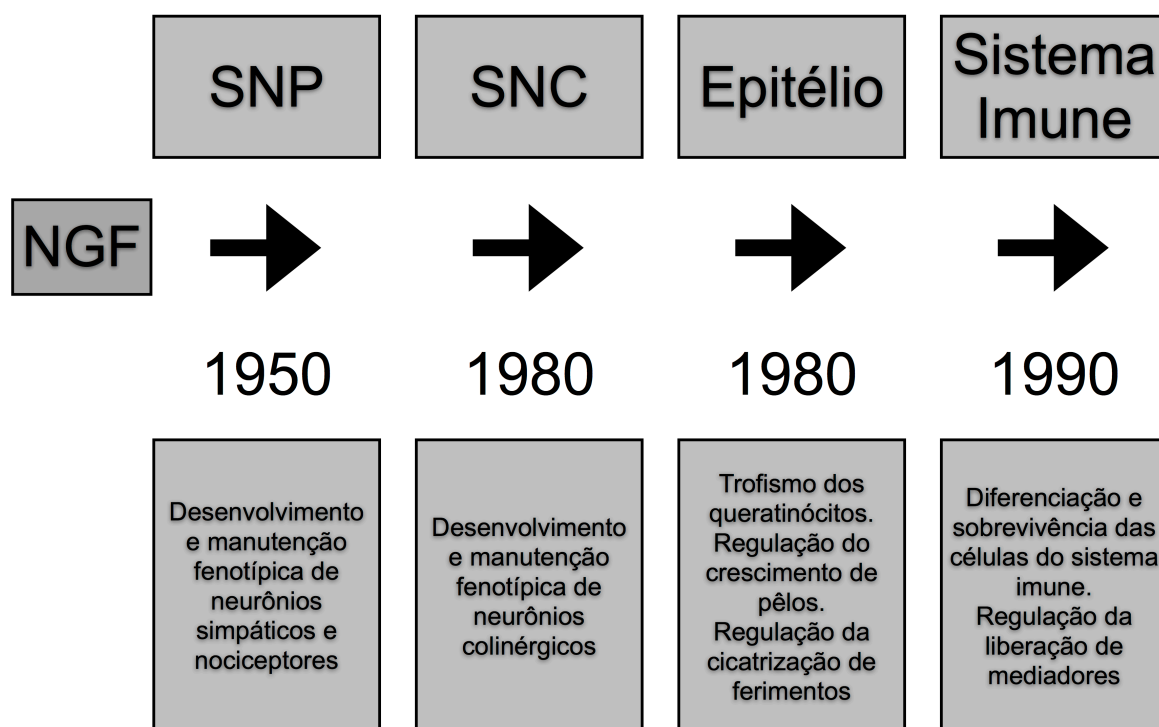


Figura 3 Resumo do histórico das principais funções conhecidas do NGF ao longo do tempo de acordo com cada área de estudo.

1.6 A INFECÇÃO POR *Schistosoma mansoni* E O NGF

A primeira indicação de que uma inflamação elicia um aumento nos níveis de NGF foi reportada por Fiore & Aloe (2001) onde demonstraram que granulomas produzidos devido a injeções intradermais de um musgo chamado musgo-da-Irlanda, potencializaram os níveis locais de NGF. Este fator neurotrófico possui papéis fisiológicos cruciais na regeneração de nervos periférico lesionados, na regulação do comportamento, e no desenvolvimento dos neurônios colinérgicos basais adultos do diencéfalo, células constantemente afetadas em doenças neurodegenerativas tal como o Mal de *Alzheimer* (Levi-Montalcini, 1987; Lindvall *et al.*, 1994; Aloe *et al.*, 1996; Lewin & Barde, 1996; Aloe *et al.*, 1998).

Utilizando o método de ELISA para medir os níveis de NGF, Alleva *et al.*, (1993) e Fiore & Aloe (2001) evidenciaram que oito semanas após a exposição de camundongos sadios ao parasita, o fígado e hipotálamo mostraram níveis elevados do fator neurotrófico. Eles estavam aumentados em 3 vezes no fígado, cinco vezes no hipotálamo enquanto que no intestino não houve alteração significativa. Estudos imunohistoquímicos demonstraram que os granulomas do fígado mostravam intensa positividade para o NGF.

Wiesel & Hubel (1963), Baker *et al.* (1974), Dräger (1978), Boothe *et al.* (1985), Berardi & Fiorentini (1991) e Aloe *et al.* (1996; 1998) demonstraram que após 15 a 18 semanas de infecção de camundongos por *S. mansoni* já ocorria a deposição de ovos no cérebro os quais estão associados com granulomas. Estes granulomas foram encontrados principalmente no hipocampo, cerebelo, tronco encefálico e nas proximidades de vasos sanguíneos do córtex, confirmando a hipótese que os ovos alcançam o SNC via sistema arterial ou através do fluxo venoso retrógrado. A presença de ovos e granulomas no SNC determinou altos níveis de NGF no hipotálamo e tronco encefálico. Dentro dos granulomas, numerosas células, principalmente mastócitos, mostravam imunopositividade para NGF, indicando que estas células poderiam contribuir para o aumento do mesmo. Os níveis de NGF decaíram no hipocampo de camundongos infectados e também encontraram perda de neurônios piramidais, os quais são uns dos responsáveis pela produção do NGF. Além disso, camundongos cronicamente infectados, sem ovos ou granulomas no cérebro, mostraram uma diminuição no peso corporal e marcantes distúrbios nos comportamentos exploratórios, de manutenção e deslocamento.

Assim, postula-se que a variação nos níveis de NGF no córtex de camundongos infectados, de alguma forma, participa na regulação do comportamento desses animais durante a tentativa de recuperação da célula nervosa (Giffin & Mitchell, 1978; Harwerth *et al.*, 1989; Domenici *et al.*, 1991; Alleva *et al.*, 1993).

1.7 O NGF E O SISTEMA VISUAL

Sabe-se que a inativação de um dos olhos durante os primeiros dias de desenvolvimento pós-natal modifica o balanço de aferências nervosas vindas dos dois olhos sobre neurônios individuais no córtex visual de mamíferos. A maioria dos neurônios corticais perde suas entradas funcionais a partir do olho inutilizado, e a distribuição de células das colunas de dominância ocular se altera em favor do olho ativo (Wiesel & Hubel, 1963; Baker *et al.*, 1974; Dräger, 1978; Shatz & Stryker, 1978; LeVay *et al.*, 1980; Boothe *et al.*, 1985; Berardi & Fiorentini, 1991). O olho inativado torna-se ambliótico: sua acuidade visual e sensibilidade ao contraste são fortemente diminuídas (Guillery & Stelzner, 1970; Sherman *et al.*, 1974; Giffin & Mitchell, 1978; Harwerth *et al.*, 1989; Domenici *et al.*, 1991).

Anatomicamente, a inativação monocular feita durante o período crítico resulta na redução dos territórios ocupados no córtex visual primário pelos terminais vindos da lamina inativada do núcleo geniculado lateral (NGL) e da expansão complementar dos territórios ocupados pelas entradas vindas da lamina ativa (Shatz & Stryker, 1978; LeVay *et al.*, 1980; Hooks & Chen, 2007). Em acréscimo, existe um substancial grau de encolhimento para as células de projeção do NGL na lamina inativada, mas somente na porção correspondente à representação do campo visual binocular (Guillery & Stelzner, 1970; Sherman *et al.*, 1974; Maffei *et al.*, 1992).

Os efeitos da inativação monocular são considerados consequências da competição entre as entradas vindas de laminas ipsilaterais e contralaterais do NGL na formação das sinapses sobre os neurônios corticais binoculares, competição que normalmente leva à segregação em territórios separados.

Como consequência da privação monocular, o olho com visão normal domina a entrada cortical. Os neurônios binoculares são fortemente diminuídos, e a maioria das células corticais para de responder ao olho inutilizado.

Diversos estudos mostram que o NGF possui papel fundamental na correta formação do sistema visual em mamíferos. Em particular, esta neurotrofina ajuda a modular e coordenar as colunas de dominância durante o “período crítico” do animal (Micera *et al.*, 2004; Hooks & Chen, 2007).

Abordando essa questão, Carmignoto *et al.*, (1989), Maffei *et al.* (1992), Siliprandi *et al.* (1993), Lambiase & Aloe (1996) e Lambiase *et al.* (1997b) demonstraram que o NGF é efetivo na prevenção dos efeitos resultantes da inativação monocular no córtex visual do rato e sugeriram que o mesmo é um fator crucial nos processos de competição que levam à estabilização das conexões funcionais geniculado corticais durante o período crítico. Neste estudo, ratos foram mantidos com um dos olhos suturados durante um mês, começando em P14 (14º dia de vida pós-natal). Três grupos de estudo foram utilizados: um grupo monocular, outro grupo monocular tratado com injeções intraventriculares de β -NGF, e o terceiro grupo de ratos com visão normal. Notaram que a privação monocular causou uma mudança devastadora da distribuição das colunas de dominância ocular em ratos não tratados, com diminuição do número de células binoculares e aumento do número de células dominadas pelo olho ativo. Nos ratos monoculares tratados com NGF, as colunas de dominância permaneceram idênticas às dos ratos normais.

Segundo Lesser & Lo (1995) e Micera *et al.* (2004) o NGF atua tanto como um fator na diferenciação quanto na sobrevivência celular. Ele modula o desenvolvimento/diferenciação da retina e nervo óptico e promove a sobrevivência e recuperação das células ganglionares retinianas, fotorreceptores, nervo óptico e do córtex visual após injúrias experimentais (Carmignoto *et al.*, 1989; Siliprandi *et al.*, 1993; Lambiase & Aloe, 1996; Lambiase *et al.*, 1997b; Heath *et al.*, 1998).

Sendo a esquistossomose um problema de saúde pública mundial e tendo vastas áreas do Brasil como regiões endêmicas para a doença, torna-se necessário estudos mais detalhados com relação aos possíveis efeitos à função neuronal em decorrência da hiperexpressão do NGF que a doença pode desencadear sobre o córtex visual.

Diante dos indícios de envolvimento do NGF na formação de projeções visuais, e também por sua elevada expressão durante o curso dessa infecção, propomos um estudo morfológico em células neuronais piramidais abordando dois modelos experimentais com diferentes respostas imunes ao parasita. Um modelo permissível à infecção, ou seja, o camundongo, em comparação com um modelo reconhecidamente não permissível, o rato (Capron & Capron, 1986; Pena *et al.*, 1995).

2.0 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Utilizar a infecção por *S. mansoni* como ferramenta para iniciar um aumento patológico de NGF e, assim, avaliar as possíveis alterações morfológicas no córtex de ratos e camundongos infectados.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar o possível comprometimento das propriedades morfométricas básicas de neurônios piramidais na camada IV do córtex cerebral em ambos os modelos infectados, sempre comparando-os com grupos-controle. Os parâmetros morfológicos avaliados foram: área do corpo celular, comprimento dendrítico total, número de dendritos, número de ramificações primárias, área do campo receptor dendrítico e distribuição dendrítica de acordo com a análise de Sholl.

3.0 METODOLOGIA

3.1 MODELOS EXPERIMENTAIS

Neste estudo utilizamos dois modelos experimentais – camundongos e ratos. Os camundongos são os modelos clássicos de estudo em esquistossomose. Neste organismo o ciclo do parasita é completo o que nos permite avaliar de forma integral toda a gama de aspectos fisiopatológicos que a formação de granulomas desencadeia tanto no sistema digestivo quanto em deposições ectópicas no SNC. Por outro lado, a razão para a escolha do rato como segundo modelo experimental requer explicações mais detalhadas. A maioria dos estudos bioquímicos e moleculares no SNC foram realizados no córtex visual deste animal, além disso, as propriedades funcionais do córtex visual do rato são muito similares a de outros mamíferos; por exemplo, as células binoculares corticais perfazem aproximadamente 80% do total de neurônios desta área e a seletividade à orientação está claramente presente (Maffei *et al.*, 1992; Fagiolini *et al.*, 1994). As propriedades funcionais dos neurônios do córtex visual do rato estão imaturas quando o animal abre os olhos alguns dias após o nascimento e se desenvolve gradualmente durante o primeiro mês de vida pós-natal (Fagiolini *et al.*, 1994). O desenvolvimento do sistema visual do rato é fortemente influenciado pela manipulação da experiência visual durante o curto período de desenvolvimento pós-natal chamado de “período crítico”. No rato, este período é particularmente ainda mais breve alcançando, no máximo, a terceira semana pós-natal (Fagiolini *et al.*, 1994). Este curto período torna o animal um modelo excelente para se avaliar as possíveis implicações que o NGF poderia causar sobre a plasticidade neuronal desencadeada pela infecção mansônica.

Diante do exposto acima, os animais em experimentação foram divididos em 4 grupos totalizando 174 ratos e 135 camundongos. O primeiro grupo de animais, composto por 97 ratos, foram infectados por via subcutânea com 50 cercárias até 72 horas após o nascimento, portanto, antes da completa formação da circuitaria neuronal. O segundo grupo foi composto por 62 camundongos albinos infectados da mesma forma descrita para os ratos. O terceiro e quarto grupos foram constituídos

pelos animais não tratados pertencentes a cada espécie estudada (77 ratos e 73 camundongos) (figura 4). As áreas estudadas compreenderam: uma amostra do fígado com o objetivo de comprovar a infecção, uma amostra de bloco cerebral contendo a área cortical visual e, o restante do encéfalo de modo a se fazer comparações quanto às alterações encontradas.

Esta divisão em grupos foi aplicada a todas as fases do estudo. Estes animais receberam água e comida *ad libitum*.

O estudo foi realizado em 3 fases, sendo elas: 1) Detecção molecular, através da técnica de PCR, de parasitas e/ou ovos no córtex cerebral, fígado e demais áreas cerebrais dos animais infectados e confirmação da ausência do parasita em animais controle; 2) Dosagem, por meio da técnica de ELISA, da concentração de NGF no córtex cerebral, fígado e demais áreas cerebrais dos animais infectados e controle; 3) Estudo morfométrico celular com objetivo de avaliar as possíveis alterações morfológicas em neurônios expostos à uma hiperexpressão patológica de NGF.

O uso de cobaias de experimentação foi autorizado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Com Animais do Instituto Evandro Chagas (CEPAN/IEC – N° 0016/07) e foram tratados de acordo com as normas éticas em vigor. Os animais sacrificados dos grupos experimental e controle foram armazenados em recipientes descartáveis apropriados ao descarte de material biológico infectante. Os mesmos foram eliminados ao fim de cada dia de experimentos no incinerador do Instituto Evandro Chagas.

A análise estatística foi feita comparando grupos de ratos inoculados com não inoculados assim como para os camundongos. Utilizamos os teste t de *Student* para amostras independentes quando comparamos grupos de mesma espécie e também quando avaliamos o grau de diferença entre períodos de infecção, sempre utilizando $\alpha = 0,05$. Um resumo do número de animais utilizados em cada fase do estudo pode ser visto na tabela 1.

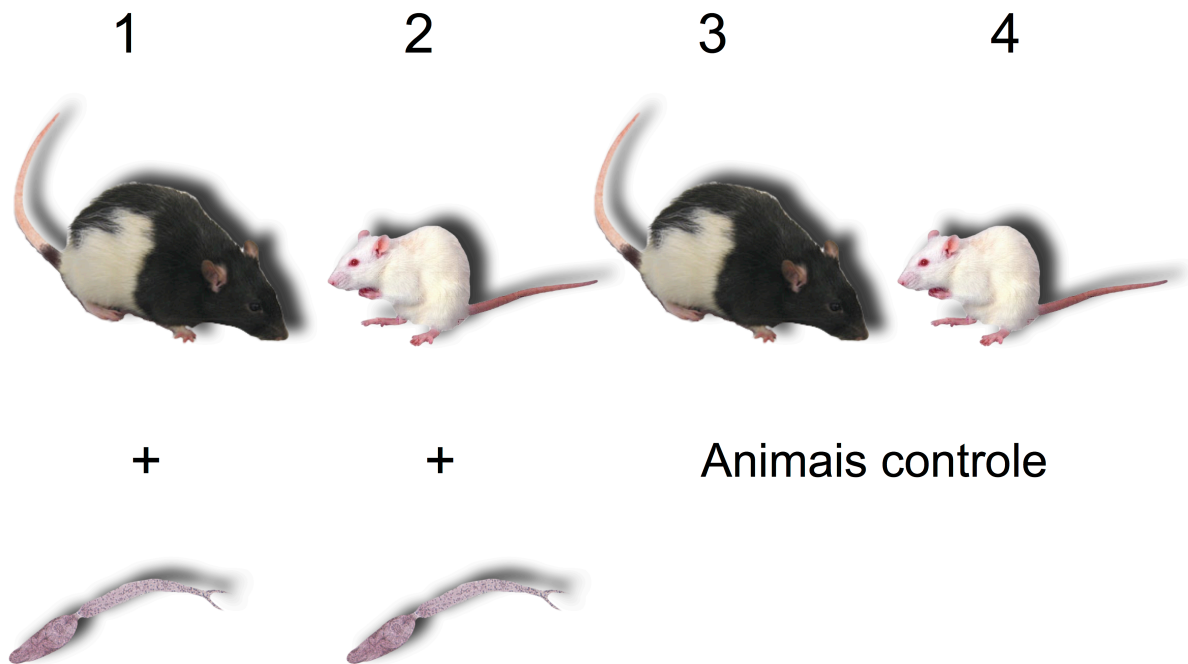


Figura 4 Esquema proposto para os grupos de trabalho. Grupo experimental: 1. Rato McCoy (modelo não permissível) infectado com 50 cercárias de *S. mansoni*; 2. Camundongo albino (modelo permissível) infectado com 50 cercárias de *S. mansoni*. Grupo controle: 3. Rato McCoy não infectado; 4. Camundongo albino não infectado. Todas as infecções ocorreram até 72 horas após o nascimento de cada animal.

Tabela 1 Resumo da quantidade de animais utilizada de acordo com cada fase do estudo

	Ratos Infectados (n)	Camundongos Infectados (n)	Ratos Controle (n)	Camundongos Controle (n)
Fase 1	30	30	30	30
Fase 2	53	20	28	18
Fase 3	14	12	19	25
Total	97	62	77	73

3.2 FASE 1: DETECÇÃO MOLECULAR DO PARASITA

Trinta ratos e camundongos infectados, e 30 não infectados, foram submetidos à detecção do parasita no SNC como forma de confirmar a origem da elevação de NGF. Esta detecção foi feita através da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR – *polymerase chain reaction*) uma vez que o uso da amplificação de DNA como forma de detectar e identificar parasitas e outros organismos em seus hospedeiros têm sido amplamente utilizado (Jones *et al.*, 1993; de Caballero *et al.*, 1994; Rognlie *et al.*, 1994; Pena *et al.*, 1995). Esta fase foi totalmente realizada nas instalações da plataforma de biologia molecular do Instituto Evandro Chagas.

3.2.1 Extração do DNA

Amostras do fígado, córtex visual e o restante das áreas cerebrais foram extraídas 40 dias após a inoculação dos animais (período o qual a oviposição já se deu início). A anestesia foi feita com injeção intraperitoneal de cloridrato de quetamina mais xilazina (0,1 ml/ 100g) e posterior sacrifício dos animais através de deslocamento cervical.

A extração de DNA do parasita a partir das amostras foi feita utilizando-se o Wizard[®] Genomic DNA Purification Kit (PROMEGA) seguindo o seguinte protocolo: aproximadamente 20 mg de tecido fresco foi macerado e homogeneizado com 600 µl de solução de lise e incubados a 65°C por 30 minutos. Foram adicionados 3 µl de solução de RNase e o material foi agitado a 37°C durante 30 minutos. Após o esfriamento à temperatura ambiente, adicionamos 200 µl de solução de precipitação. Mais uma vez o material foi agitado em vórtex e resfriado em gelo por 5 minutos. A amostra foi precipitada em centrífuga refrigerada a 16.000 x g durante 4 minutos. O sobrenadante resultante da centrifugação foi transferido para um novo microtubo contendo 600 µl de isopropanol onde foi mais uma vez centrifugado a 16.000 x g por apenas 1 minuto. O sobrenadante foi descartado e acrescentado 600 µl de etanol 70% ao *pellet*. Seguiu-se mais uma centrifugação sob as mesmas circunstâncias descritas anteriormente e, após isso, o etanol foi aspirado. O pellet de DNA foi secado ao ar livre por 15 minutos e reidratado com a solução de reidratação por 1 hora a 65°C.

3.2.2 PCR e eletroforese

Uma região minissatélite no DNA mitocondrial (mtDNA) de *S. mansoni* foi identificada por Pena *et al.*, (1995) e Jannotti-Passos *et al.* (1997). Esta região consiste de várias repetições de fragmentos com 558 pb e um número variável de fragmentos organizados em 62 pb. A amplificação do DNA, usando sequências repetitivas que são específicas para *S. mansoni* e são altamente representativas de seu genoma, é uma abordagem valiosa para a detecção do organismo em seu hospedeiro uma vez que mostra um elevado grau de especificidade para *S. Mansoni* em comparação com outras infecções por trematódeos.

Desta forma, utilizamos um par de iniciadores (*primers*) desenhados para amplificar unidades minissatélites em tandem do mtDNA de *S. mansoni* (Pena *et al.*, 1995) . Os iniciadores foram: ER (5'-ACCTACCGTACTATGACG) e EF (5'-GGTCCTAGTGTTATAGCC).

As concentrações dos reagentes constituintes da reação de PCR foi feita de acordo com Jannotti-Passos *et al.* (1997), ou seja, 0,8 unidades de TAQ Polimerase (INVITROGEN); dNTPs (200 µM); MgCl₂ (1,5 mM); KCl (50 mM); Tris-Hcl (10 mM) e 5 pmol de cada iniciador em um volume final de 10 µL. O mtDNA foi amplificado em um termociclador MasterCycler Personal (EPPENDORF), utilizando 35 ciclos de amplificação sob as seguintes condições: etapa de desnaturação inicial a 95°C por 3 minutos; fase de anelamento a 40°C por 1 minuto e uma fase de extensão a 72°C por 1 minuto. Para os próximos 34 ciclos, o tempo de desnaturação foi diminuído para 45 segundos. Uma etapa final de extensão (72°C) foi adicionada nos último 5 minutos da reação. A eletroforese para separação das bandas foi feita em gel de agarose 2% corado com Brometo de Etídio.

3.3 FASE 2: ANÁLISE IMUNOENZIMÁTICA

Uma amostragem de 53 ratos infectados e 28 não infectados foram submetidos a infecções de 1 a 44 semanas de duração. De forma semelhante, 20 camundongos infectados e 18 não infectados foram submetidos a infecções de 1 a 39 semanas.

Animais representantes de todos os grupos foram submetidos a dosagens corticais e hepáticas de NGF quantificados em kit comercial padronizado (ChemiKine™ Nerve Growth Factor (NGF) Sandwich ELISA Kit - CHEMICON INTERNATIONAL). A concentração de NGF no fígado foi medida para se realizar comparação com a concentração alcançada no córtex visual, tornando segura a afirmação de que a infecção teve início e que o animal está pronto para os testes subsequentes no SNC.

Para isso os animais foram anestesiados com injeção intraperitoneal de cloridrato de quetamina mais xilazina (0,1 ml/ 100g) e posterior sacrifício dos animais através de deslocamento cervical. Um bloco cortical contendo a área visual foi removido, assim como uma amostra de tecido do fígado. Estes foram submetidos ao protocolo de extração e dosagem fornecido pelo fabricante do kit.

O longo período de infecção (até 44 semanas) serviu para nos mostrar o momento preciso em que o pico de hiperexpressão de NGF aconteceu, dando-nos assim, a indicação de infecção ideal para iniciarmos os estudos morfométricos em células do córtex visual.

3.4 FASE 3: ESTUDO MORFOMÉTRICO

Após a obtenção da informação sobre o tempo necessário para que o nível de NGF alcançasse seu valor máximo de expressão, 14 ratos e 12 camundongos infectados e 19 ratos e 25 camundongos não infectados foram anestesiados com injeção intraperitoneal de cloridrato de quetamina mais xilazina (0,1 ml/ 100g).

Estes animais foram levados ao aparelho estereotáxico adequado para roedores onde foram feitas injeções extracelulares de Dextrana 10.000 kD (INVITROGEN) diretamente no córtex visual do animal. As coordenadas estereotáxicas utilizadas foram aquelas propostas por Ling & Gerard, (1949); Paxinos & Franklin (2004) e Paxinos & Watson (2007). Após as injeções, os animais foram suturados e tratados com os seguintes antibióticos: sulfato de neomicina (5 mg/g) associado a bacitracina (250 UI) na forma tópica e enrofloxacina (2,5 mg/kg) intramuscular diariamente por 3 dias. Também utilizamos o analgésico e antiinflamatório piroxicam na forma intramuscular. Estes animais foram recolhidos em gaiolas esterilizadas para um período de recuperação. Após 48-72h estes foram

submetidos a perfusão intracardíaca com Paraformaldeído (4%) mais Glutaraldeído (2%). Seus cérebros foram retirados, a área visual separada e cortada em fatias de 250 μm de espessura através de um micrótomo.

As fatias foram lavadas com tampão fosfato salino (PBS) em 3 etapas de 5 minutos com agitação de 100 RPM; em seguida foi acrescentado PBS mais peróxido de hidrogênio (1%) onde as fatias foram incubadas por 30 minutos sob agitação. Seguiu-se uma lavagem com PBS com 5 minutos de duração e incubação com Triton-X por 30 minutos, também sob agitação. Foram acrescentadas 3 lavagens com duração de 5 minutos para que, então, o material fosse incubado juntamente com a solução A mais a solução B que fazem parte do Vectastain Elite ABC kit; 1:100 (Vector Laboratories) por 2 horas. As secções foram lavadas em PBS e tampão Tris (0,1M) e então coradas com 3,3-diaminobenzidina (DAB). As fatias foram montadas em lâminas e coradas através da técnica de Nissl para contracoloração e melhor diferenciação das camadas corticais.

Os neurônios revelados foram fotografados com uma câmera Zeiss Axiophot (Carl Zeiss AG) em intervalos de 2 μm descendo em direção ao eixo Z. Os planos individuais foram montados utilizando o software Helicon Focus (HeliconSoft) e as reconstruções das células foram feitas usando o plugin NeuronJ desenvolvido para o software ImageJ (Meijering *et al.*, 2004).

Neste trabalho, avaliamos as propriedades morfométricas de neurônios piramidais da camada IV, sendo elas: Quantidade de dendritos, quantidade de dendritos primários, comprimento dendrítico total, área do soma, área do campo receptor dendrítico e distribuição de Sholl.

3.4.1 Controle de qualidade

O conhecimento acerca da morfologia neuronal na região cerebral de interesse é crucial para se realizar medições precisas, por isso, utilizamos os critérios descritos por Roitman *et al.* (2002) para avaliar quais neurônios seriam apropriados a serem utilizados em nossas análises. Estes critérios foram: completo preenchimento do corpo celular, nenhuma quebra ou descontinuação ao longo dos dendritos, nenhum entrelaçamento visível entre neurônios próximos, um número mínimo de neuritos partindo do corpo celular assim como das ramificações

subsequentes. Os neurônios que se enquadraram nestes critérios foram traçados e medidos através do software ImageJ com auxílio do plugin NeuronJ.

Os seguintes parâmetros morfométricos foram avaliados: quantidade de dendritos primários, quantidade de dendritos secundários, comprimento dendrítico total (soma dos comprimentos de todos os dendritos), área de campo receptor dendrítico e área do soma neuronal. Também utilizamos a análise de Sholl como ferramenta de avaliação da morfologia neuronal. Esta análise é feita, conceitualmente, desenhando-se círculos concêntricos em torno do corpo celular, aumentando-se o raio destes círculos e contando-se o número de vezes que cada círculo cruza uma ramificação neurítica (exemplo desta análise pode ser vista na figura 5). O número de interseções é então plotada em um gráfico em função da distância radial a partir do corpo celular. Esta ferramenta nos fornece uma representação quantitativa do quanto a densidade neurítica varia espacialmente. Em nosso estudo, esta análise foi feita automaticamente através do plugin ShollAnalysis (GoshLab) também desenvolvido para o software ImageJ.

Para se eliminar o bias causado pela grande variação de tamanho existente entre neurônios de diferentes camadas, escolhemos apenas neurônios marcados na camada IV cortical.

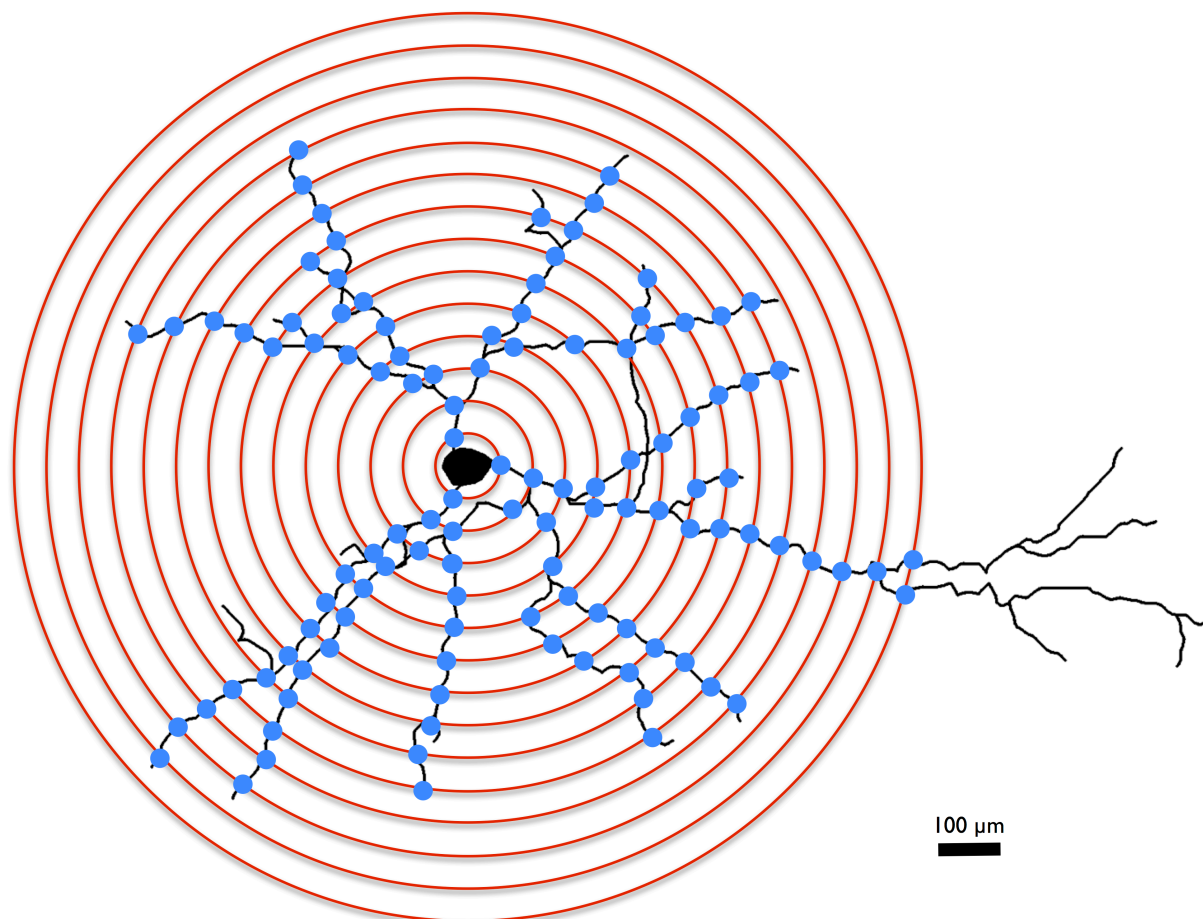


Figura 5 Exemplo de como é feita a análise de Sholl em um neurônio piramidal. Os círculos vermelhos possuem um incremento de 50 μm em relação ao seu antecessor. Os pontos azuis representam as ramificações encontradas em cada interseção e que foram plotadas em função da distância em relação ao corpo celular.

4.0 RESULTADOS

4.1 DETECÇÃO DO PARASITA

Em nossos estudos realizamos a detecção do parasita em blocos corticais contendo a área visual e também no fígado de ratos e camundongos albinos, infectados e não infectados, através da técnica de PCR.

Dos 30 ratos inoculados com o parasita *S. mansoni* foi possível identificar a presença do parasita (ou de seu ovo) no SNC em 10% (3 ratos) das amostras, o que nos mostra que, apesar da conhecida resistência do animal à infecção mansônica, ainda assim, uma quantidade significativa de indivíduos sucumbem à infecção ectópica da parasitose, sem no entanto, apresentar sintomas aparentes. No fígado, a taxa de detecção foi de 50% (15 animais).

Quanto aos camundongos, a taxa de identificação do parasita (ou de seu ovo) no SNC chegou a 80% dos indivíduos inoculados (24 camundongos). Quatro camundongos morreram durante o curso da infecção e o restante apresentou sinais clássicos de infecção, tais como emagrecimento, apatia e hepatomegalia. No fígado, a taxa de detecção de ovos/parasitas foi de 100%, mostrando uma alta eficácia na relação inoculação/infecção.

Este resultado nos mostra uma alta sensibilidade da técnica quando comparada com outras formas de detecção já realizadas (Cheever, 1970; Silva *et al.*, 2002; Nascimento-Carvalho & Moreno-Carvalho, 2005).

Os animais controle mostraram-se negativos para a presença de *Schistosoma mansoni* em qualquer área estudada, ou seja, não houve amplificação da região minisatélite do DNA mitocondrial do parasita onde foram encontradas apenas amplificação inespecíficas.

Na figura 6, mostramos um gel de agarose representativo das amplificações da região específica de *S. mansoni*.

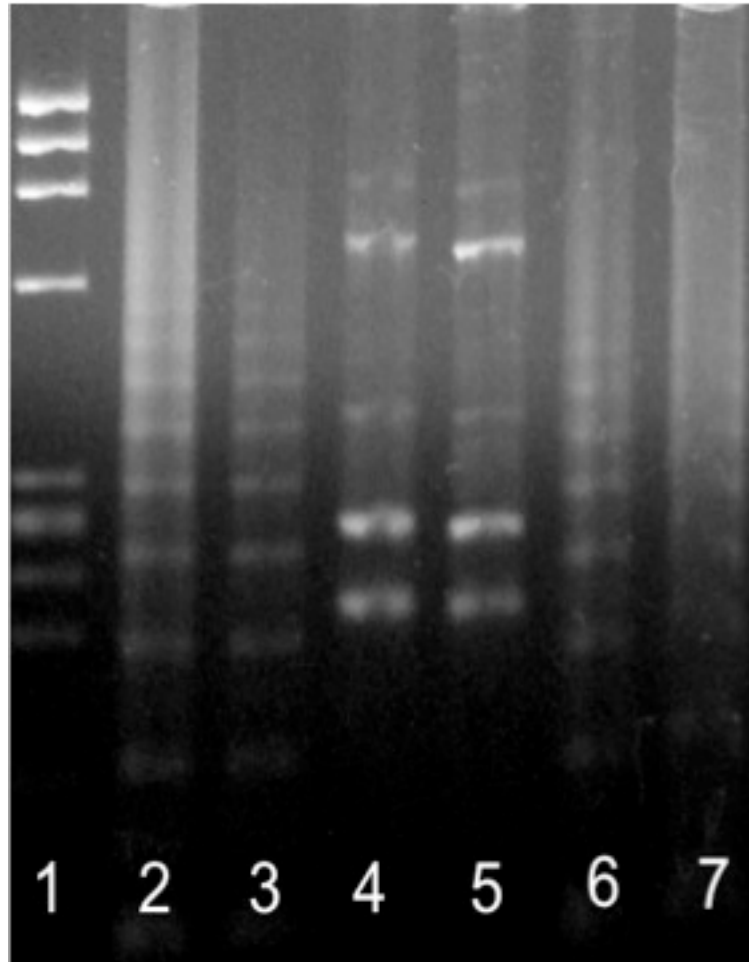


Figura 6 Gel de agarose 2% corado com Brometo de Etídio mostrando a amplificação da região específica do mtDNA de *S. mansoni*. 1) Padrão peso molecular; 2) Controle positivo (cercárias de *S. mansoni*); 3) Bloco cortical contendo a área visual de camundongo inoculado há 32 semanas; 4) Bloco cortical contendo a área visual de camundongo não inoculado; 5) Bloco cortical contendo a área visual de rato não inoculado; 6) Bloco cortical contendo a área visual de rato infectado há 39 semanas; 7) Fígado de camundongo inoculado.

Tabela 2 Taxa de sucesso de identificação do parasita de acordo com cada área estudada em cada modelo experimental

Modelo	n	SNC (+)	Fígado (+)
Rato	30	10%	50%
Camundongo	30	80%	100%

4.2 CONCENTRAÇÃO DE NGF

4.2.1 Camundongos

Não foram encontradas diferenças significativas quanto à concentração de NGF entre os hemisférios direito e esquerdo em qualquer grupo estudado.

Na Figura 7A, nota-se que a concentração de NGF no bloco retirado da área visual de camundongos infectados foi 94,1% superior ao grupo controle (infectados: $478,4 \pm 284,0$ pg/mL; $p < 0,01$; controle: $246,5 \pm 76,8$ pg/mL). Nas demais regiões cerebrais esse aumento foi de 138,7% (infectados: $516,3 \pm 266,0$ pg/mL; $p < 0,001$; controle: $216,3 \pm 78,4$ pg/mL).

O aumento da concentração de NGF no fígado dos animais, após a inoculação, acompanhou o mesmo ritmo de elevação do SNC, demonstrando que a migração de parasitas/ovos para o encéfalo ocorre concomitantemente (86,5%; infectados: $561,8 \pm 260,7$ pg/mL; $p < 0,01$; controle: $301,3 \pm 134,6$ pg/mL).

Não observamos aumentos significativos antes de 3 semanas de infecção. Após 21 semanas todas as áreas estudadas já mostravam níveis muito elevados, porém após a 39ª semana, apenas o fígado mostrou queda significativa na concentração de NGF. Nesse período a concentração do fator de crescimento neuronal no SNC se manteve ainda muito elevado (figura 7B).

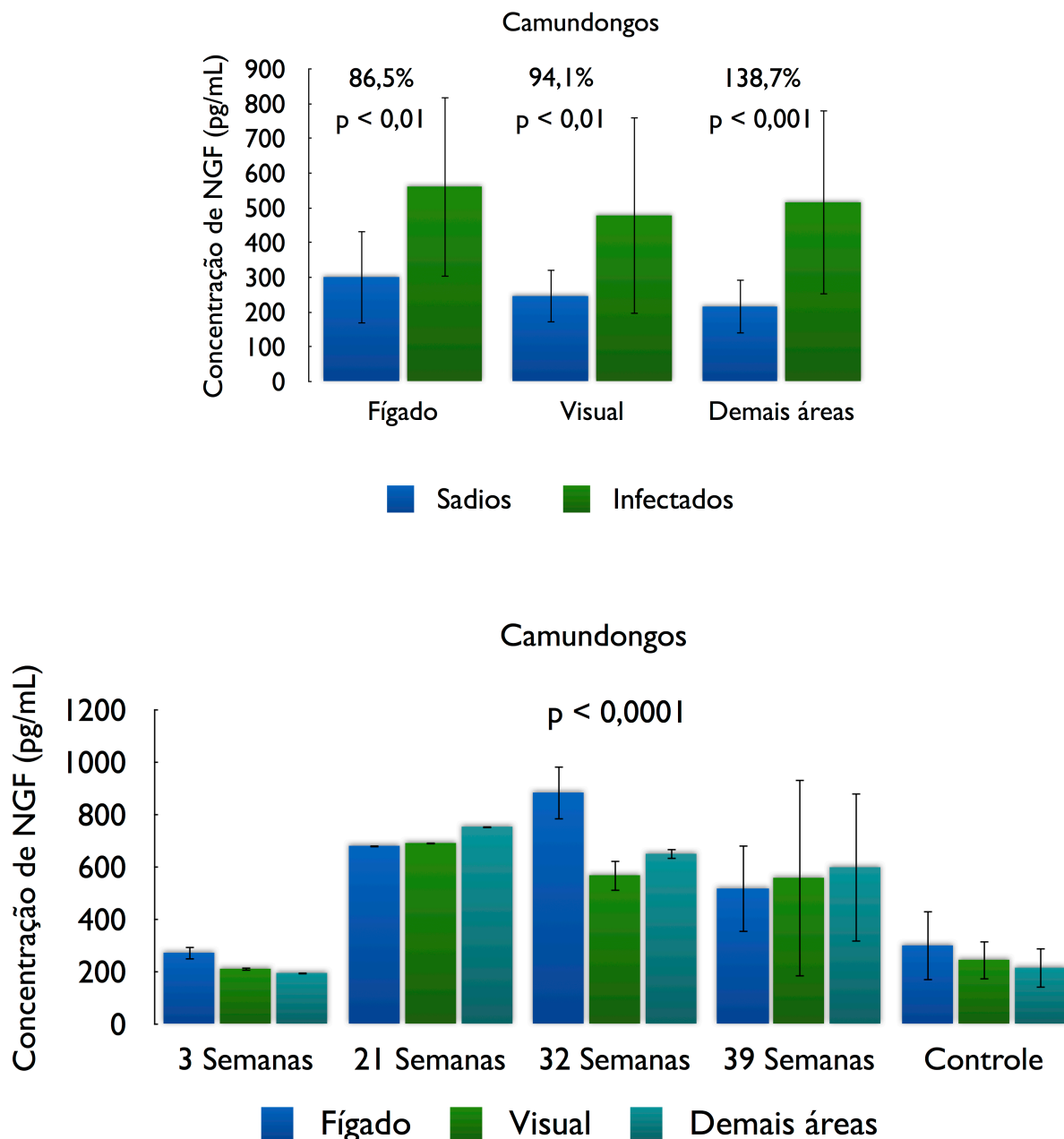


Figura 7 Concentração de NGF em diferentes áreas de interesse. Topo) Resultado da hiperexpressão do fator de crescimento neuronal após a inoculação de 50 cercárias em camundongos. O aumento de NGF nas 3 áreas estudadas foi estatisticamente significativo (fígado $p < 0,01$; visual $p < 0,01$; demais áreas $p < 0,001$); Baixo) Camundongos infectados com 50 cercárias mostrando o pico de produção da neurotrofina em torno da 21ª semana; Até 3 semanas não há aumento significativo comparado com o grupo controle.

4.2.2 Ratos

A concentração de NGF, no bloco cortical contendo a área visual de ratos inoculados, foi 39,2% superior ao grupo controle (infectados: $400,9 \pm 143,1$ pg/mL; $p < 0,0001$; controle: $288,0 \pm 31,9$ pg/mL). Nas outras áreas cerebrais esse aumento foi de 29,9% (infectados: $372,1 \pm 168,8$ pg/mL; $p < 0,01$; controle: $286,4 \pm 26,3$ pg/mL); (Figura 8A).

No fígado o aumento foi mais rápido (2 semanas) porém de menor magnitude do que nos camundongos inoculados (28,94%; infectados: $340,9 \pm 103,9$ pg/mL; $p < 0,01$; controle: $264,4 \pm 38,6$ pg/mL). Não observamos aumentos significativos antes de 3 semanas de infecção.

Após 8 semanas todas as áreas estudadas já mostravam níveis muito elevados, porém após a 10^o semana, notamos um decréscimo contínuo, provavelmente em virtude das defesas imunológicas do modelo não permissível (Figura 8B).

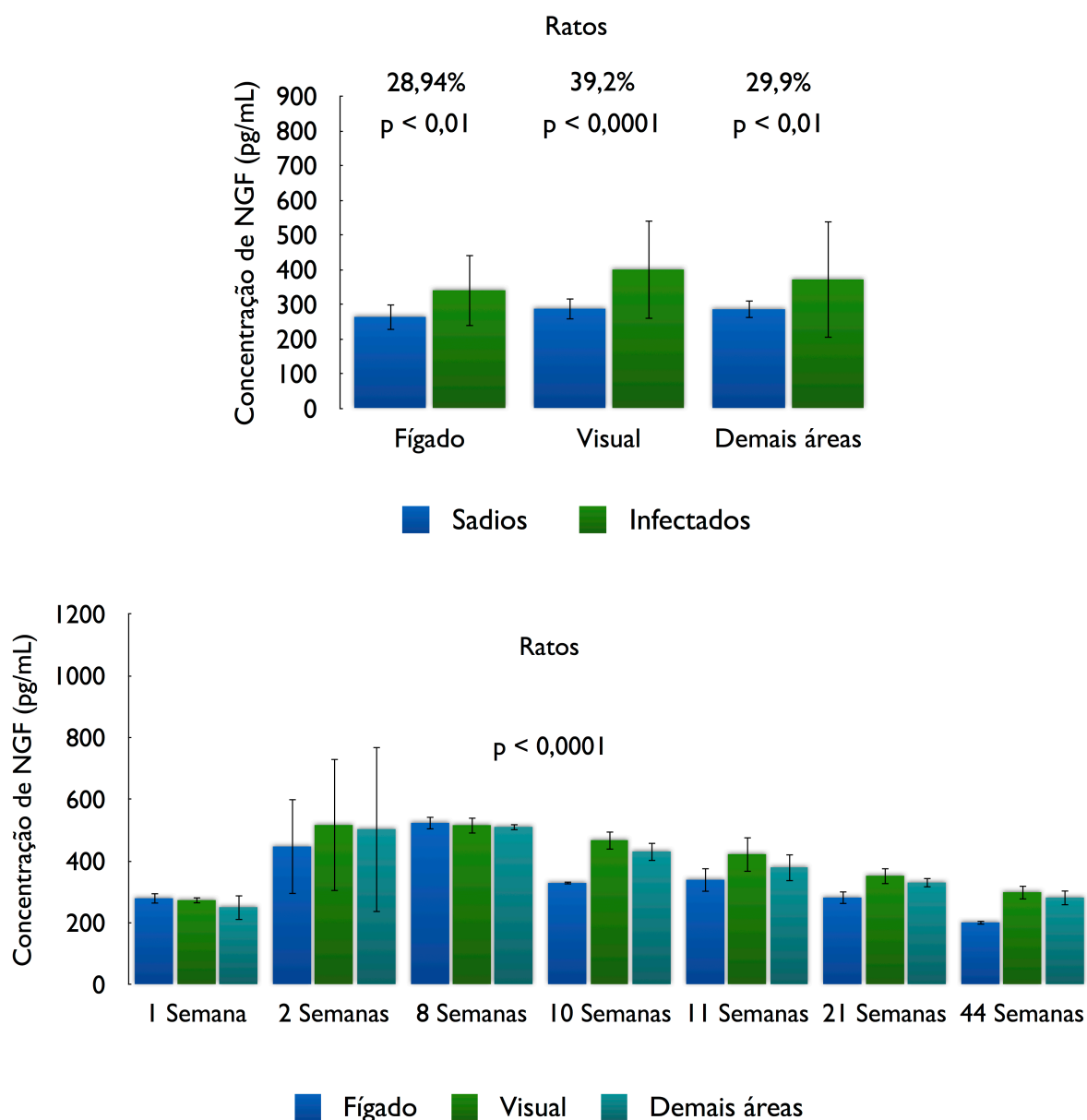


Figura 8 Topo) Diferentes regiões do rato também são afetadas pelo aumento na concentração de NGF, porém, em menor escala; O aumento de NGF nas 3 áreas estudadas também foi estatisticamente significativo no rato (fígado $p < 0,01$; visual $p < 0,0001$; demais áreas $p < 0,01$); Evolução da concentração de NGF ao longo do tempo de infecção. Baixo) Ratos inoculados mostraram uma reação de produção da neurotrofina em menor escala do que os camundongos e também mostraram um quedas nos níveis de forma mais constante.

Tabela 3 Resumo das concentrações de NGF encontradas em cada modelo de estudo por área de interesse

Área	Ratos				Camundongos			
	Controle (n=28)	Infectados (n=53)	Aumento	Valor de p	Controle (n=18)	Infectados (n=20)	Aumento	Valor de p
Área Visual	288 ± 31,9	400,9 ± 143,1	39,2%	0,0001	246,5 ± 76,8	478,4 ± 284,0	94,1%	< 0,01
Fígado	264,4 ± 38,6	340,9 ± 103,9	28,9%	0,01	301,3 ± 134,6	561,8 ± 260,7	138,7%	< 0,01
Áreas do SNC	286,4 ± 26,3	372,1 ± 168,8	29,9%	0,01	216,3 ± 78,4	516,3 ± 266,0	86,5%	< 0,001

4.3 MORFOMETRIA NEURONAL

4.3.1 Camundongos

Quando avaliamos as diferenças na morfometria de neurônios piramidais da camada IV em camundongos encontramos diferenças significativas comparadas ao grupo infectado por *Schistosoma mansoni*.

A quantidade de dendritos foi 11,41% maior no grupo infectado do que no controle (controle: $25,28 \pm 5,19$; infectados: $28,16 \pm 7,45$; $p < 0,05$) assim como a quantidade de dendritos primários foi aumentada em 16,56% (controle: $6,52 \pm 2,17$; infectados: $7,60 \pm 1,96$; $p < 0,05$). O comprimento total dos dendritos também foi afetado (controle: $4.916,52 \pm 1.492,65 \mu\text{m}$; infectados: $5.460,40 \pm 1.214,07 \mu\text{m}$; $p < 0,05$) correspondendo a um aumento de 11,06%. A área total do campo receptor dendrítico sofreu um aumento de 12,99% (controle: $29.346,69 \pm 11.298,62 \mu\text{m}^2$; infectados: $33.158,20 \pm 7.758,31$; $p < 0,05$) enquanto que a área somática teve uma redução de 13,61% (controle: $119,38 \pm 19,68$; infectados: $103,13 \pm 24,69$; $p < 0,001$).

4.3.2 Ratos

Em ratos inoculados com 50 cercárias até 72 horas após o nascimento encontramos um aumento, sem significância estatística, de 1,82% na quantidade de dendritos (controle: $21,97 \pm 6,94$; infectados: $22,37 \pm 6,66$), no entanto, a quantidade de dendritos primários foi grandemente afetada, com um aumento de 20,21% (controle: $4,70 \pm 1,62$; infectados: $5,65 \pm 1,23$; $p < 0,001$). Outro parâmetro morfométrico que também foi fortemente afetado em neurônios piramidais de ratos foi a área do corpo neuronal onde observamos um aumento da ordem de 21,18% (controle: $132,20 \pm 28,46$; infectados: $160,20 \pm 31,63$; $p < 0,00001$), contrariamente ao observado no grupo infectado dos camundongos onde notou-se uma diminuição do mesmo parâmetro. As demais propriedades estudadas não mostraram diferenças estatisticamente significativas entre os grupos controle e experimental (tabela 4).

Tabela 4 Resumo das propriedades morfométricas encontradas para cada modelo experimental nas duas situações de tratamento

Parâmetro	Ratos				Camundongos			
	Controle	Infectados	Aumento	Valor de p	Controle	Infectados	Aumento	Valor de p
Dendritos (un.)	21,97 ± 6,94	22,37 ± 6,66	1,82%	n/s	25,28 ± 5,19	28,16 ± 7,45	11,41%	< 0,05
Dendritos primários (un.)	4,70 ± 1,62	5,65 ± 1,23	20,21%	< 0,001	6,52 ± 2,17	7,60 ± 1,96	16,56%	< 0,05
Comprimento total (µm)	1.853,80 ± 696,65	1.871,83 ± 599,59	0,97%	n/s	4.916,52 ± 1.492,65	5.460,40 ± 1214,07	11,06%	< 0,05
Área total do soma (µm ²)	132,20 ± 28,46	160,20 ± 31,63	21,18%	< 0,00001	119,38 ± 19,68	103,13 ± 24,69	- 13,61%	< 0,001
Área do Campo receptor (µm ²)	58.063,34 ± 22.286,46	58.836,51 ± 22.020,36	1,33%	n/s	29.346,69 ± 11.298,62	33.158,20 ± 7.758,31	12,99%	< 0,05

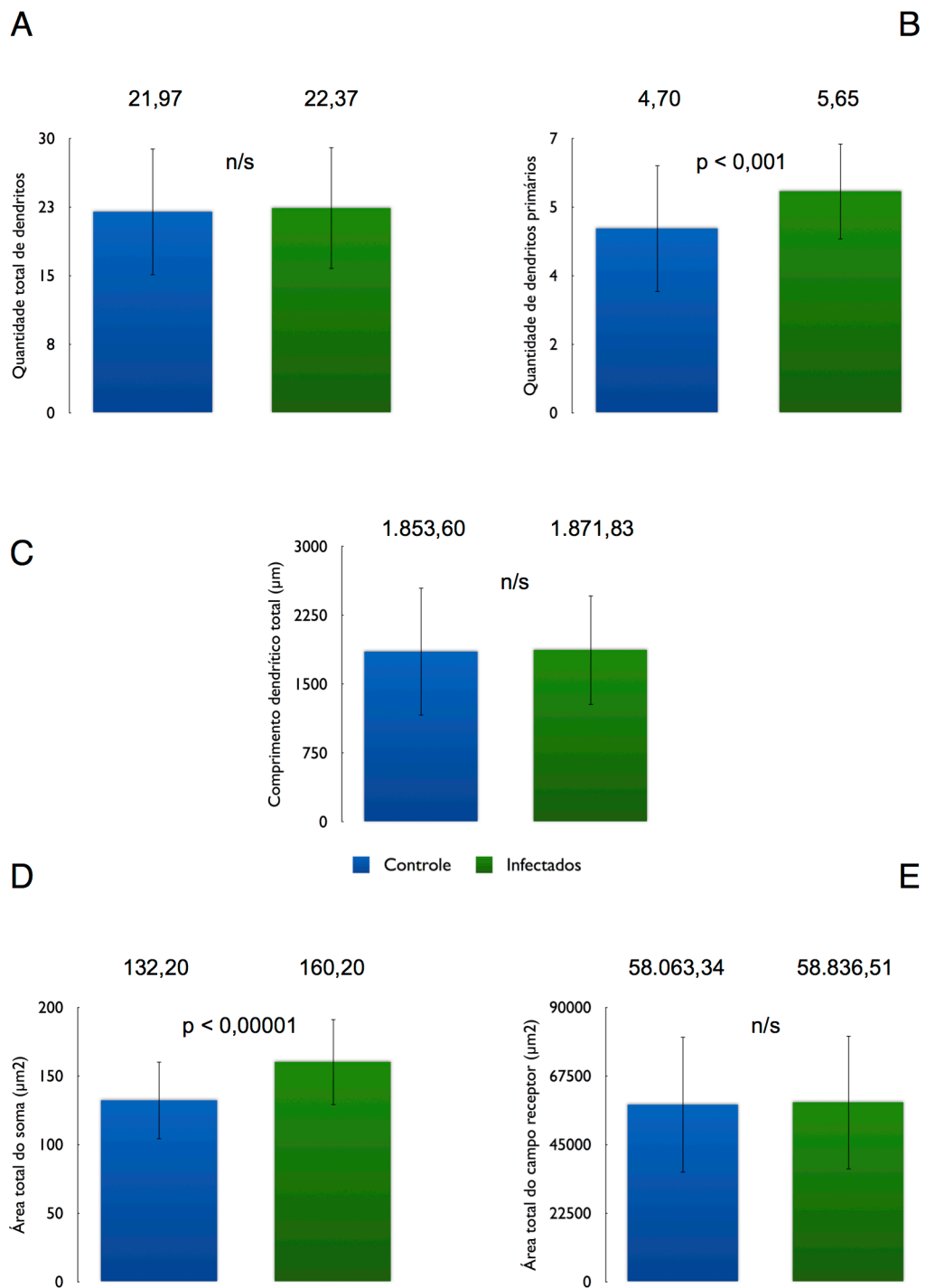


Figura 9 Alterações na morfologia dendrítica observadas após inoculação com 50 cercárias de *S. mansoni* em células piramidais da camada IV de ratos.

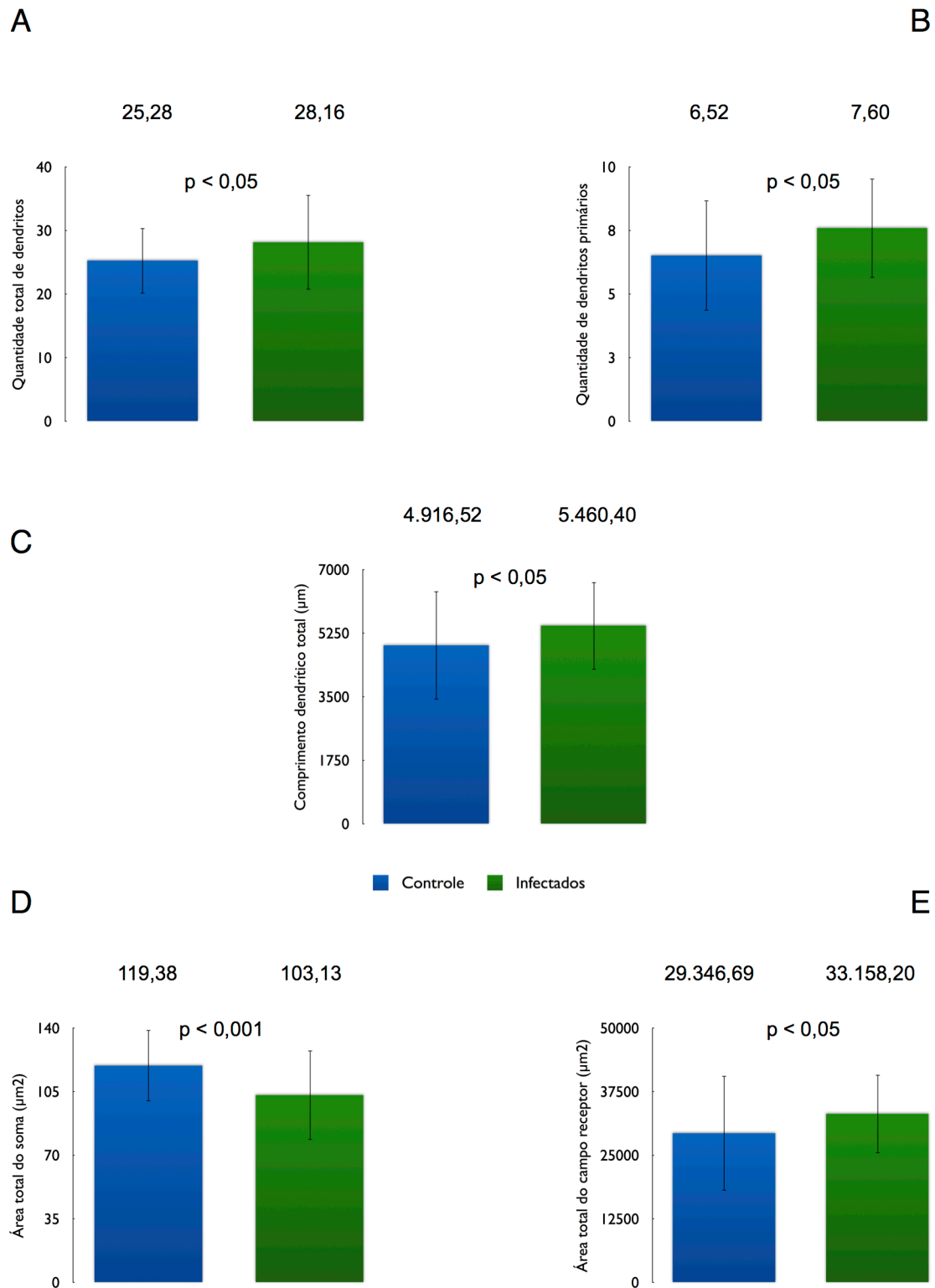


Figura 10 Alterações na morfologia dendrítica observadas após inoculação com 50 cercárias de *S. mansoni* em células piramidais da camada IV de camundongos.

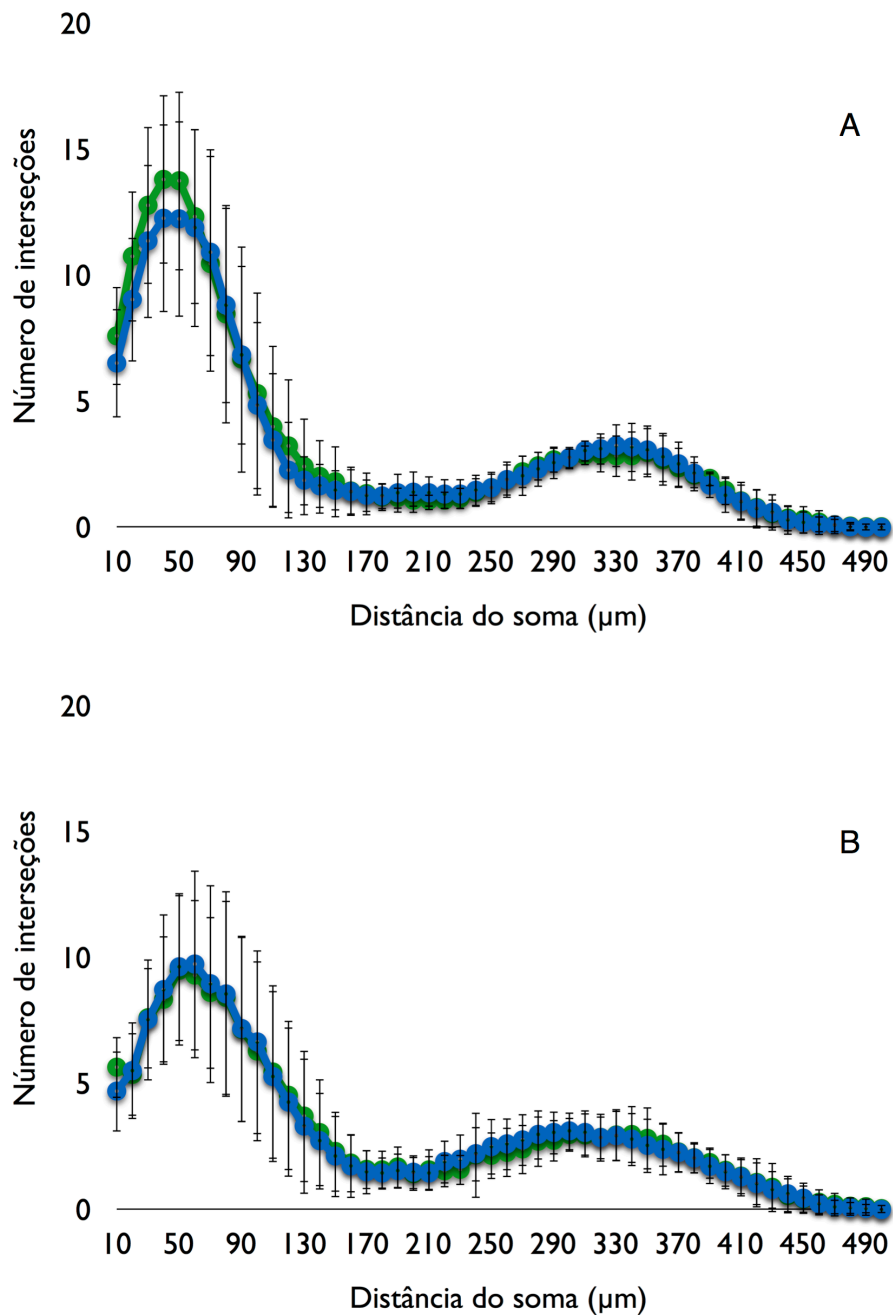


Figura 11 Análise de Sholl demonstrando que a distribuição dendrítica de camundongos (A) mostra, em animais infectados, um maior número de interseções até 50 μm de distância do soma devido ao fato da maior quantidade de dendritos primários. Em ratos (B), este aumento no grupo contaminado também foi detectado até 10 μm de distância do soma.

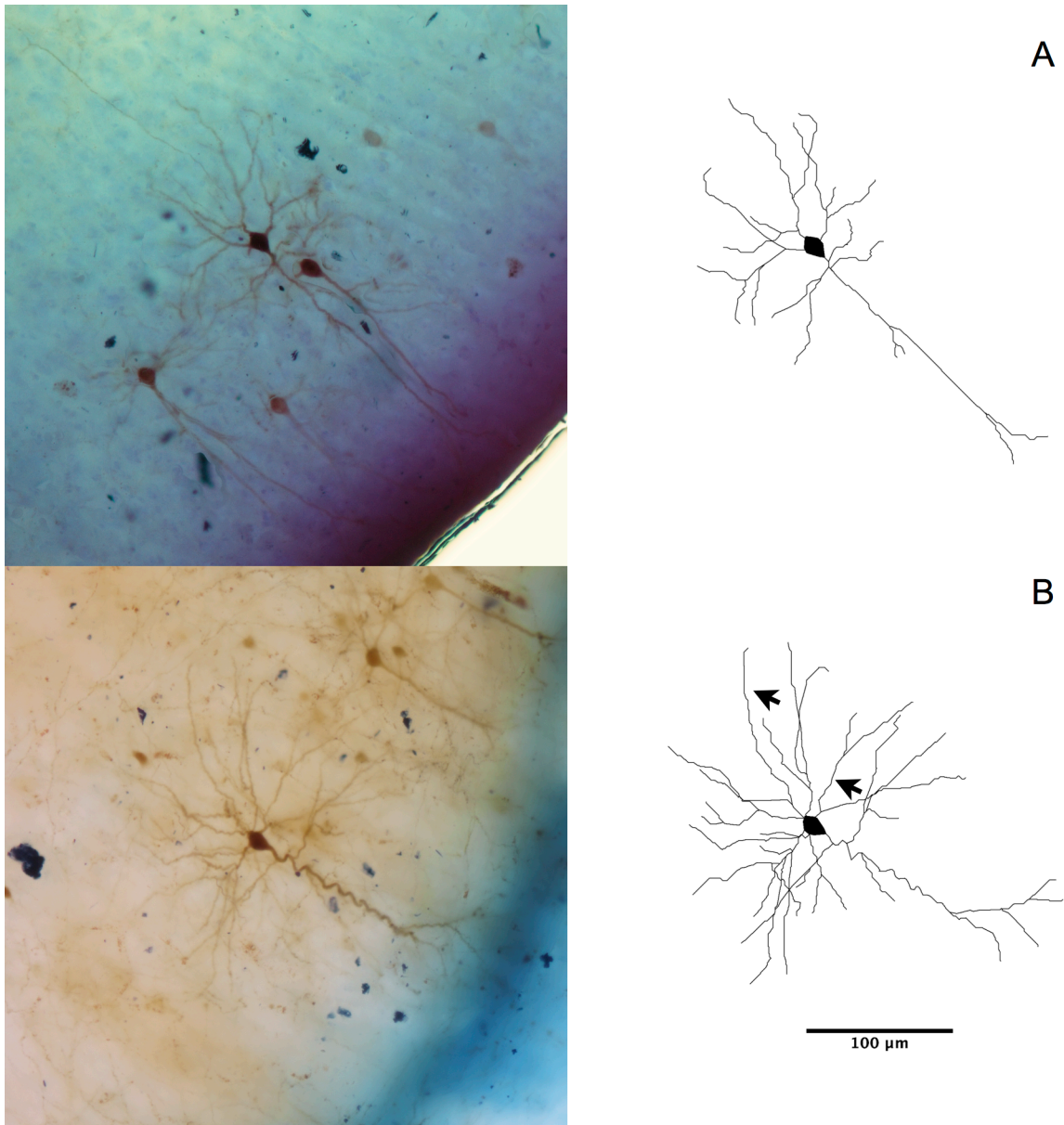


Figura 12 Exemplo do aumento da quantidade total de dendritos e dendritos primários em camundongos infectados. As figuras a direita representam reconstruções digitais das fotomicrografias reais à esquerda; A) Neurônio piramidal em camundongo sadio; B) Neurônio piramidal em camundongo infectado; As setas indicam dendritos secundários emergindo a partir de dendritos primários.

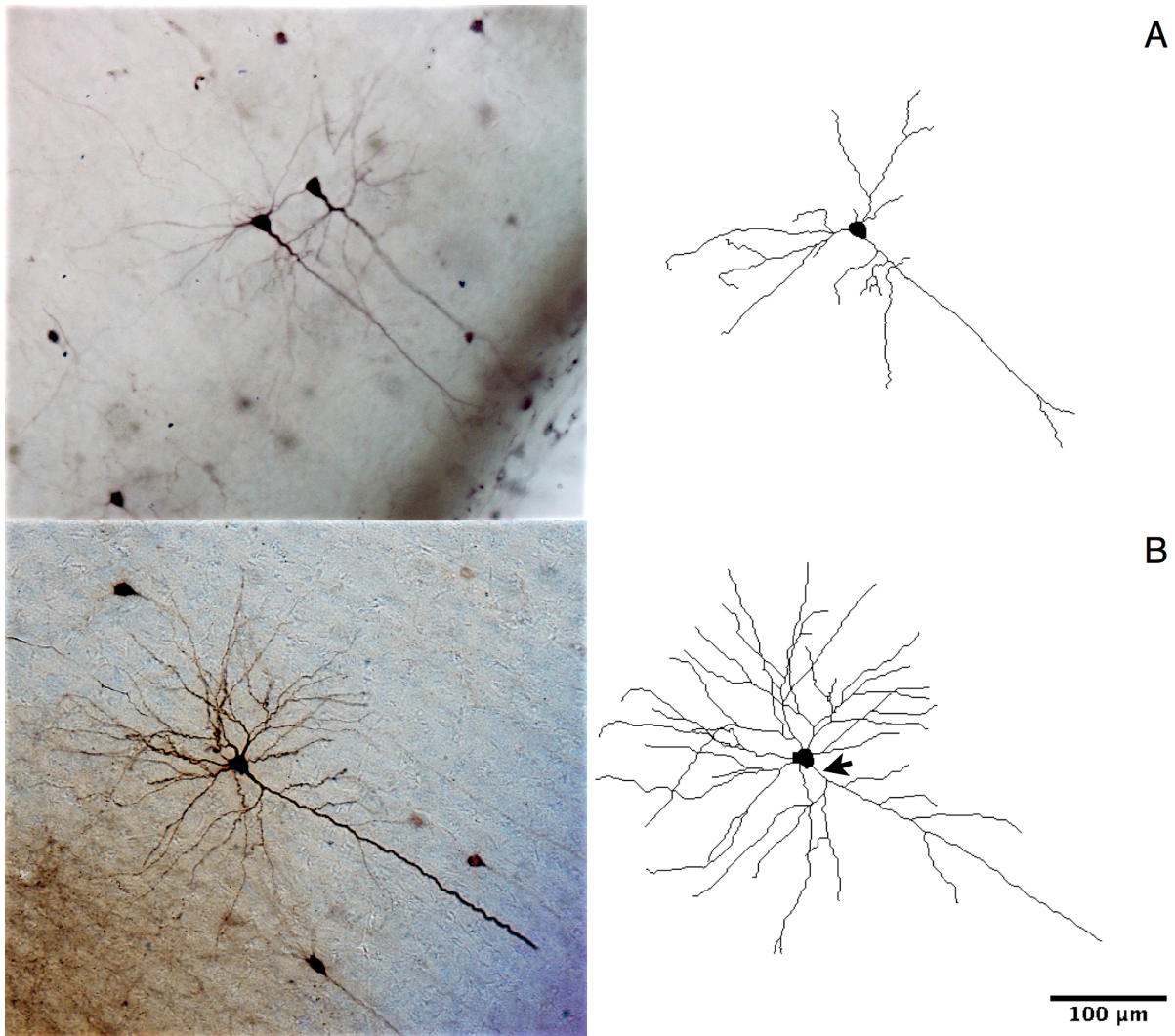


Figura 13 Exemplo do aumento da quantidade de dendritos primários em ratos infectados. As figuras a direita representam reconstruções digitais das fotomicrografias reais à esquerda; A) Neurônio piramidal em rato sadio; B) Neurônio piramidal em rato infectado; A seta indica dendrito apical emergindo a partir do soma.

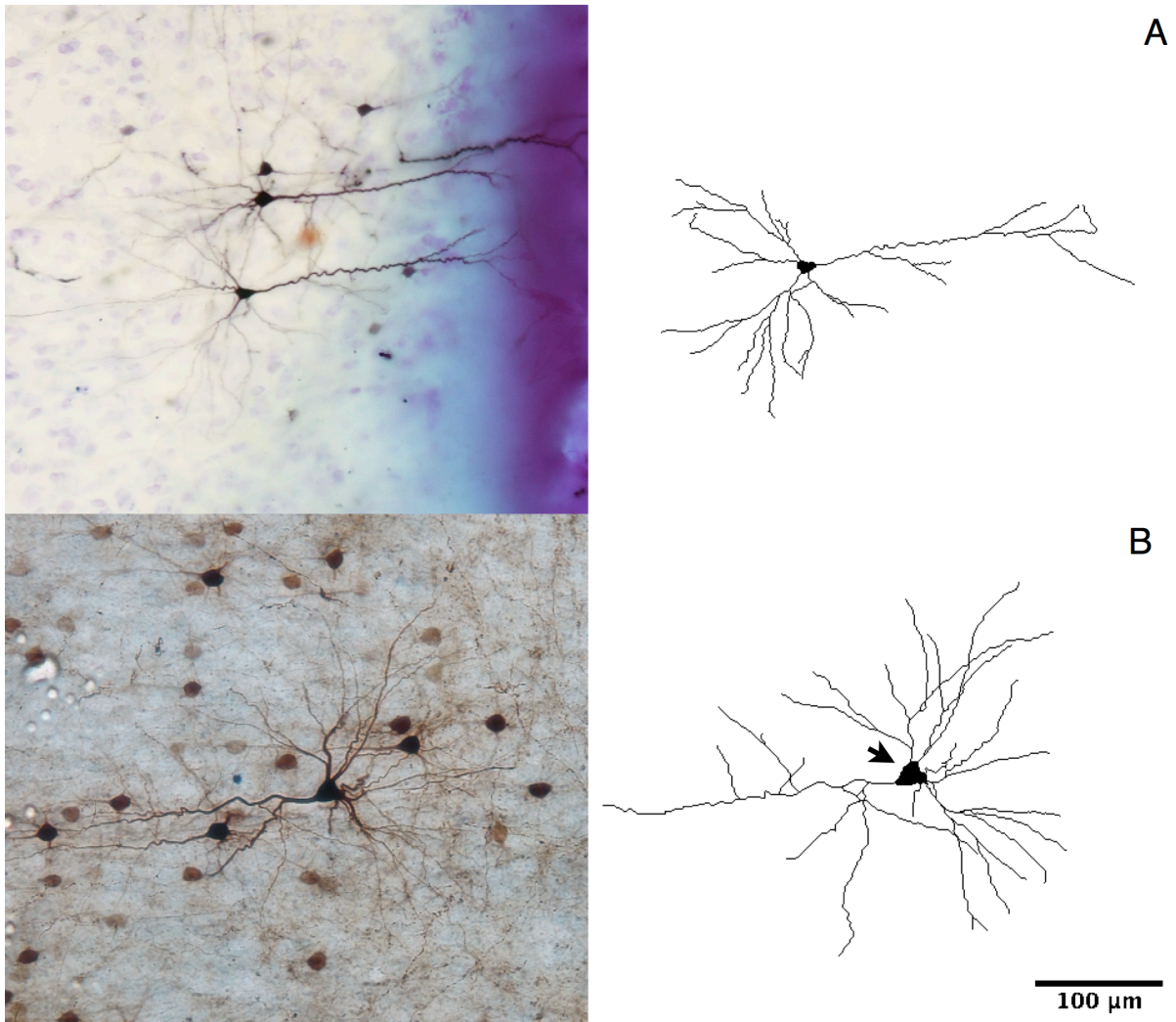


Figura 14 Exemplo do aumento da área do soma em ratos infectados. As figuras a direita representam reconstruções digitais das fotomicrografias reais à esquerda; A) Neurônio piramidal em rato sadio (soma = $72,56 \mu\text{m}^2$); B) Neurônio piramidal em rato infectado (soma = $251,25 \mu\text{m}^2$); A seta indica o soma significativamente aumentado de tamanho no neurônio piramidal pertencente à mesma camada cortical (IV).

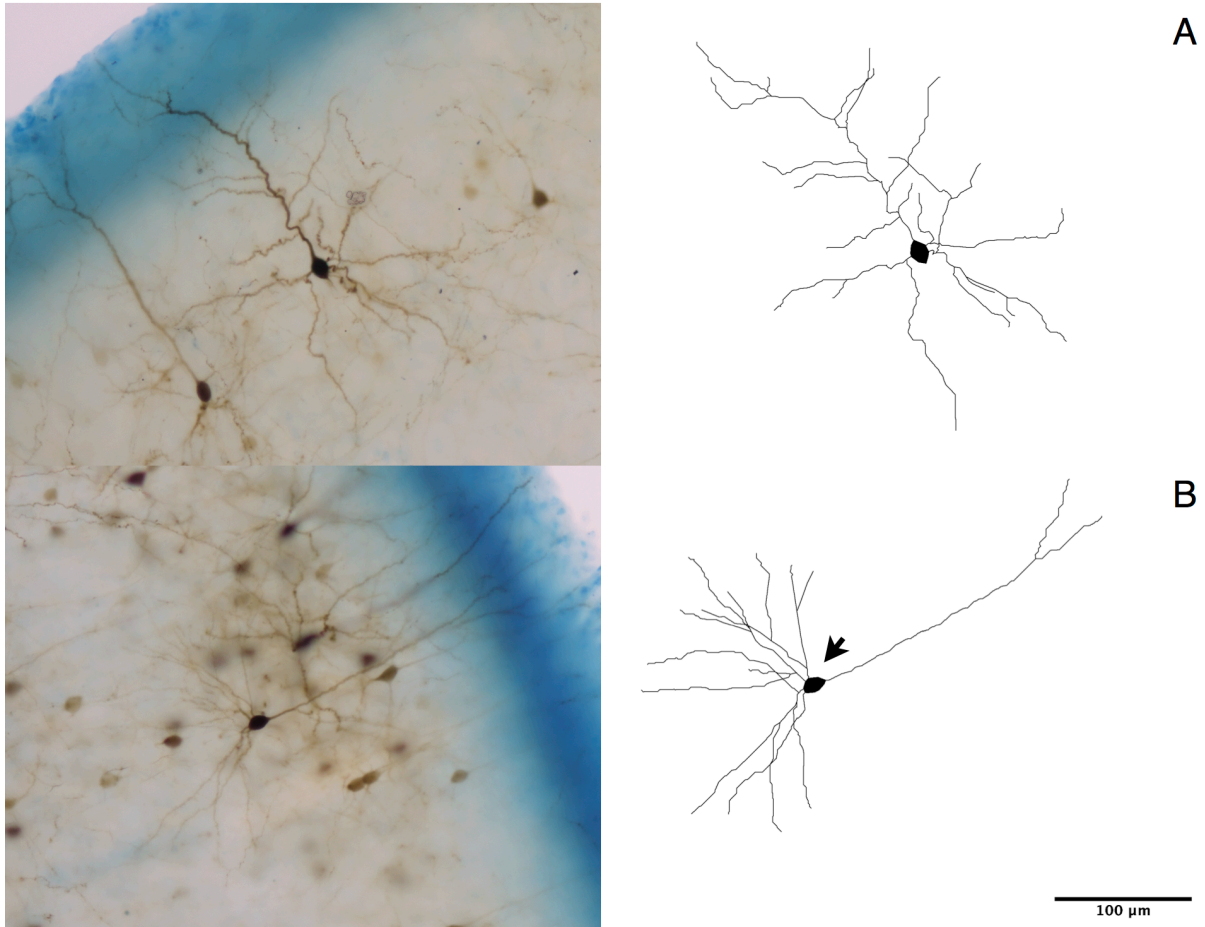


Figura 15 Exemplo da diminuição da área do soma em camundongos infectados. As figuras a direita representam reconstruções digitais das fotomicrografias reais à esquerda; A) Neurônio piramidal em camundongo sadio (soma = $144,86 \mu\text{m}^2$); B) Neurônio piramidal em camundongo infectado (soma = $117,65 \mu\text{m}^2$); A seta indica o soma significativamente diminuído de tamanho no neurônio piramidal pertencente à mesma camada cortical (IV).

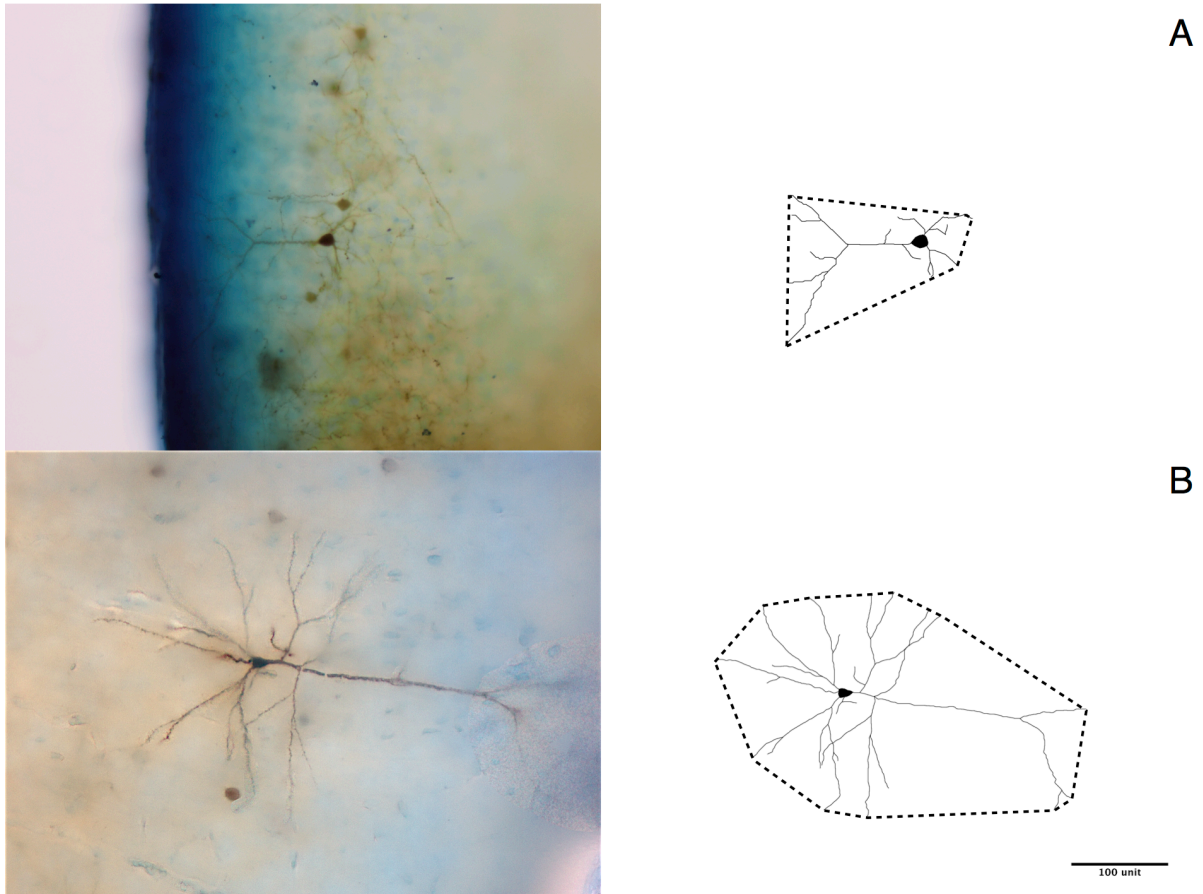


Figura 16 Exemplo do aumento da área do campo receptor dendrítico em camundongos infectados. As figuras a direita representam reconstruções digitais das fotomicrografias reais à esquerda; A) Neurônio piramidal em camundongo sadio (área do campo receptor = $11.456,06 \mu\text{m}^2$); B) Neurônio piramidal em camundongo infectado (soma = $65.902,29 \mu\text{m}^2$); A linha pontilhada indica a delimitação do campo receptor significativamente aumentado de tamanho no neurônio piramidal pertencente à mesma camada cortical (IV).

5.0 DISCUSSÃO

5.1 DETECÇÃO MOLECULAR DO PARASITA

Neste estudo, um ensaio utilizando a reação em cadeia da polimerase foi usada como ferramenta para a detecção do parasita *Schistosoma mansoni* ou de seu ovo no sistema nervoso central de ratos e camundongos inoculados com 50 cercárias até 72 horas após o nascimento. Esta inoculação foi feita com o objetivo de eliciar um aumento na taxa de NGF. Também foi realizada a detecção deste parasita no fígado de cada um dos modelos experimentais utilizados com o intuito de confirmar a infecção na forma tradicional da doença assim como em outras áreas do SNC. Isto foi feito para tornar possível uma comparação sobre o grau de deposição do parasita em relação à área de interesse deste estudo, o córtex visual.

Utilizando o primer descrito por Jannotti-Passos *et al.* (1997) nós obtivemos uma taxa de sucesso de identificação do parasita em 10% das amostras retiradas do córtex visual de ratos e 50% das amostras de fígado. Em camundongos, um modelo permissível à infecção - aquele que completa o ciclo do parasita eliminando ovos no ambiente - a taxa de detecção foi consideravelmente maior. Em 80% das amostras do córtex visual primário foi possível identificar a presença de *S. mansoni* enquanto que em amostras hepáticas esta taxa apresentou positividade total, ou seja 100% delas.

Técnicas moleculares para o diagnóstico da esquistossomose foram descritas em vários trabalhos anteriores (Pontes *et al.*, 2002; 2003; do Vale Gomes *et al.*, 2006; Sandoval *et al.*, 2006), no entanto, uma comparação válida entre estes métodos é difícil de se realizar uma vez que eles são muito diversos com relação ao uso dos fragmentos de DNA utilizados como alvo, isolamento do DNA, procedimentos da PCR e métodos de seleção das amostras.

Obviamente, devido ao alto custo, esta técnica molecular não pode ser aplicada para diagnósticos clínicos de rotina da esquistossomose em áreas e/ou países endêmicos, embora os preços dos equipamentos e material de consumo tem se tornado cada vez mais acessíveis.

Em nossa opinião, a técnica de PCR descrita acima, associada aos nossos resultados fornecem uma poderosa alternativa para estudos sobre a deposição ectópica de ovos e/ou parasitas em modelos animais mesmo que este seja um animal não permissível à infecção tal como o rato, onde obtivemos 10% de positividade no SNC. Esta abordagem também pode ser utilizada para estudos sobre a detecção ectópica de diversos outros parasitas intestinais tais como *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium* sp. e *Entamoeba histolytica* (Verweij *et al.*, 2004; Hove *et al.*, 2007; Verweij *et al.*, 2007).

A detecção do parasita no SNC também provoca a discussão sobre os possíveis efeitos clínicos que esta deposição ectópica possa ocasionar no hospedeiro. No presente trabalho, esta abordagem não foi avaliada mas futuros estudos correlacionando a detecção molecular do parasita e as consequentes repercussões fisiopatológicas e comportamentais em modelos experimentais podem elucidar muitas questões ainda não abordadas adequadamente.

Quando este tipo de deposição de ovos de *Schistosoma* sp. acontece no SNC utilizamos o termo “neuroesquistossomose” (NESQ) onde podemos incluir o envolvimento sintomático ou assintomático do sistema nervoso central. Quando associada com sintomas clínicos, ela representa umas das mais severas apresentações da infecção mansônica. A NESQ pode ser causada pelo *Schistosoma japonicum*, *S. mansoni*, e *S. haematobium*. Considerando a forma sintomática, as duas últimas espécies estão quase sempre associadas com a síndrome mielorradicular e comprometimento cerebral.

A esquistossomose mielorradicular (ESQMR) é menos freqüente do que a doença cerebral. Embora esta seja considerada uma forma rara de NESQ, sua prevalência é desconhecida e provavelmente responsável por muitos falso-negativos. O *S. mansoni* é a espécie responsável pela maior parte dos casos de ESQMR (de Abreu Ferrari, 2004). Como demonstrado por estudos de necropsia (Scrimgeour & Gajdusek, 1985), a deposição assintomática de ovos de *Schistosoma* sp. nas estruturas cerebrais altamente vascularizadas é mais freqüente do que as formas sintomáticas da NESQ.

Vários aspectos da patogênese da NESQ são desconhecidos, embora algumas evidências disponíveis sugiram que as lesões vistas no SNC dependem basicamente da presença do ovo do parasita no tecido nervoso e da resposta imune do hospedeiro.

A deposição assintomática de ovos no cérebro é mais frequentemente associada com a forma crônica severa por *Schistosoma mansoni*, ou seja, a forma hepatoesplênica (Pittella, 1991b; 1997). Nestas formas, a embolização dos ovos a partir do sistema mesentérico portal para o cérebro e, menos frequentemente, para a medula espinhal, ocorre favorecida pela hipertensão portal que causa a abertura das anastomoses ou através do sistema arterial. A alta frequência de deposições de ovos no cérebro de camundongos pode ser explicada pela carga parasitária, intensa oviposição e contínua embolização de ovos através dos vasos colaterais da circulação portal-sistêmica (Ferrari *et al.*, 2008). A falta de sintomas neurológicos pode ocorrer devido à esparça dispersão dos ovos e a uma reação inflamatória periovular menos intensa observada nas infecções mansônicas de longa duração (Pittella, 1997).

Diante destas informações nosso trabalho pode abrir novas perspectivas de detecção em áreas onde antes uma deposição de ovos de *S. mansoni* poderia parecer improvável.

5.2 ANÁLISE IMUNOENZIMÁTICA

A análise realizada através da técnica de ELISA em nosso estudo demonstrou que a indução parasitária por *S. mansoni* causou um aumento na produção de NGF da ordem de 94,1% na área visual primária em camundongos e 39,2% em ratos. Concomitantemente também foram detectados, nas demais regiões cerebrais, aumento nos níveis de NGF da ordem de 86,5% e 29,9%, respectivamente. Quando o fígado foi avaliado (órgão mais afetado em uma infecção mansônica tradicional) este demonstrou uma reação na produção da neurotrofina da ordem de 138,7% em camundongos e 28,9% em ratos, confirmando o fato que o último modelo experimental sofre um ataque em menor escala durante a infestação parasitária. Nossos estudos, no entanto, não excluem a possibilidade de que outras neurotrofinas da família do NGF também possam ser hiperexpressadas durante uma infecção desta natureza.

Ao nosso conhecimento, este é o primeiro estudo a demonstrar que esta infecção parasitária resulta em um aumento de NGF na área visual primária tanto em um modelo permissível quanto em um modelo não-permissível ao parasita. Aloe *et al.* (1994) evidenciaram aumentos no hipocampo utilizando a mesma técnica, inclusive com mudanças comportamentais em camundongos (Aloe *et al.*, 1990). Sabe-se que a formação dos granulomas em torno do ovo e a consequente reação inflamatória desencadeada por ele inicia o mecanismo que leva a este aumento de NGF, no entanto, não nos parece haver uma oviposição preferencial nesta área uma vez que não encontramos uma diferença estatisticamente significativa entre os níveis de NGF aumentados nesta área quando comparada com as outras regiões encefálicas.

Outros fatores parecem estar envolvidos nesta hiperexpressão de NGF, como por exemplo o stress induzido pela infecção (Male, 1994) assim como um estado alterado do eixo pituitário-adrenal (Male, 1991). As observações de que esteróides circulantes (Isseroff *et al.*, 1986) e citocinas (Pearce & Appleton, 1992) aumentam de concentração durante infecções e as evidências de que ambas as citocinas (Lindholm *et al.*, 1987; Gadiant *et al.*, 1990) e esteróides (Levi-Montalcini, 1987; Levi-Montalcini *et al.*, 1990) regulam a síntese de NGF, sugerem que estes mediadores

biológicos, atuando sozinhos ou em cooperação, podem estar envolvidos nos níveis elevados de NGF.

5.3 ESTUDO MORFOMÉTRICO

O estudo morfométrico realizado neste trabalho a partir de amostras de ratos e camundongos infectados com *S. mansoni*, e com comprovado aumento de NGF na área visual primária após a inoculação, mostrou uma intensa alteração nas propriedades morfológicas de neurônios piramidais da camada IV no modelo permissível. Por outro lado este efeito não foi tão intenso no modelo não-permissível onde apenas a quantidade de dendritos primários e área somática foram afetadas. É importante ressaltar que este é o primeiro trabalho relacionando uma mudança na estrutura neuronal ocasionada por uma infecção parasitária associada a um aumento do fator de crescimento neuronal.

Sabe-se que o termo “plasticidade neural” refere-se a mudanças na estrutura e função neuronal causada por algum estímulo ambiental. Tipicamente, a divisão celular cessa muito cedo ao longo do desenvolvimento do sistema nervoso e, por isso, mudanças plásticas a estímulos externos, tais como as mudanças na arborização dendrítica observadas em nosso trabalho, são de fundamental importância para neurônios pós-mitóticos.

Os dendritos são os sítios de onde a maioria das sinapses são formadas e desta forma, com o aumento do número destas estruturas observados em camundongos e com o aumento de dendritos primários em ratos, muito possivelmente, o número de sinapses nestes indivíduos também pode ter sido grandemente alterado, no entanto, torna-se necessário dizer que o aumento de NGF identificado em nosso trabalho pode não ser o único fator responsável por estas mudanças morfológicas.

Do ponto de vista fisiológico, as evidências mais diretas relacionando mudanças morfológicas e alterações na atividade elétrica (associado a fatores neurotróficos) vem de estudos realizados com neurotrofinas tais como o BDNF (McAllister *et al.*, 1995; 1996), contudo também já foi demonstrado que a estimulação de uma via particular no hipocampo leva a um aumento na expressão

gênica de NGF. Esta foi uma descoberta crucial ao se relacionar o fator de crescimento neuronal com a regulação na atividade elétrica no SNC (Gall & Isackson, 1989).

As primeiras observações mostrando que, além dos efeitos sobre a sobrevivência celular, o NGF também afeta a arquitetura neuronal vieram de estudos abordando os gânglios simpáticos. Uma perda de transmissão sináptica foi experimentalmente causada pela aplicação de anticorpos contra o NGF (Njå & Purves, 1978). Este resultado foi de particular interesse pois mostrou que os sítios primários da resposta ao NGF são os neurônios simpáticos em si e não os terminais pré-sinápticos. Posteriormente, após a aplicação *in vivo* de NGF, medições morfométricas indicaram um aumento na arborização dendrítica, semelhantemente mostrado em nosso trabalho (Ruit *et al.*, 1990).

No SNC, o NGF é expressado em neurônios sendo que os níveis mais elevados de mRNA podem ser encontrados no hipocampo e córtex visual. Além disso, estudos *in vitro* e *in vivo* também estabeleceram que nestas áreas cerebrais os níveis de mRNA de NGF são fortemente aumentados após a ativação de *inputs* excitatórios (Gall & Isackson, 1989; Zafra *et al.*, 1990) e também se sabe que a liberação de NGF é regulada pela atividade elétrica (Blöchl & Thoenen, 1995).

A secreção de NGF dependente de atividade também pôde ser localizada ao longo de processos neurais incluindo dendritos (Blöchl & Thoenen, 1996). Estes resultados sugerem que o NGF, assim como outras neurotrofinas, podem compartilhar algumas propriedades com os neurotransmissores. O NGF também causa a rápida liberação de neurotransmissores *in vitro* (Knipper *et al.*, 1994; Blöchl & Sirrenberg, 1996) e presumivelmente também *in vivo* uma vez que injeções de NGF alteram a atividade elétrica hipocampal e cortical (manifestada na forma de convulsões) (Berzaghi *et al.*, 1995). Estes resultados indicam que o NGF possui ações rápidas no SNC e que a sua biossíntese e liberação são dependentes de atividade.

Diante das informações acima nós podemos formular uma hipótese de que o aumento de NGF após uma infecção parasitária, e consequente destruição de células nervosas ao redor da área afetada pelo granuloma, poderia ativar a expressão gênica de NGF, que é dependente de atividade, para que a perda neuronal e o resultante comprometimento da atividade elétrica no circuito envolvido fossem compensados com o incremento da arborização dendrítica e consequente

formação de novas conexões sinápticas nos demais neurônios. Este aumento de NGF seria menor em ratos, pois a baixa formação de granulomas neste modelo acarretaria uma menor destruição celular e por conseguinte uma menor perturbação na circuitaria local levando assim a uma menor modificação sobre a morfologia dendrítica de células piramidais.

6.0 CONCLUSÃO

Diante dos resultados obtidos em nosso estudo podemos concluir que a infecção por *Schistosoma mansoni* elicia um aumento robusto nos níveis de NGF no córtex visual de camundongos, assim como nas demais áreas cerebrais em decorrência da formação de granulomas ao redor dos ovos que ali se depositaram de forma ectópica. Esta deposição pôde ser comprovada devido à detecção molecular positiva em 80% das amostras de córtex visual obtida dos camundongos inoculados. Juntamente a este aumento nos níveis da neurotrofina também foi detectado uma modificação maciça em todos os parâmetros avaliados na morfologia dendrítica das células estudadas. Contrariamente, em ratos, um modelo em que o ciclo não chega ao estágio de eliminação de ovos nas fezes, seja pela destruição do parasita ou pela destruição do ovos, esses efeitos se demonstraram mais brandos levando a uma menor produção do fator de crescimento neuronal e poucas modificações detectáveis na morfologia dendrítica nas células piramidais.

7.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Allen SJ, Dawbarn D (2006) Clinical relevance of the neurotrophins & their receptors. *Clin Sci* 110:175–191.
- Alleva E, Aloe L, Bigi S (1993) An updated role for nerve growth factor in neurobehavioural regulation of adult vertebrates. *Rev Neurosci* 4:41–62.
- Aloe L (1988) The effect of nerve growth factor & its antibody on mast cells in vivo. *J Neuroimmunol* 18:1–12.
- Aloe L (2001) Nerve growth factor & neuroimmune responses: basic & clinical observations. *Arch Physiol Biochem* 109:354–356.
- Aloe L, Alleva E, De Simone R (1990) Changes of NGF level in mouse hypothalamus following intermale aggressive behaviour: biological & immunohistochemical evidence. *Behav Brain Res* 39:53–61.
- Aloe L, Bracci-Laudiero L, Bonini S, Manni L (1997) The expanding role of nerve growth factor: from neurotrophic activity to immunologic diseases. *Allergy* 52:883–894.
- Aloe L, Levi-Montalcini R (1977) Mast cells increase in tissues of neonatal rats injected with the nerve growth factor. *Brain Res* 133:358–366.
- Aloe L, Moroni R, Fiore M, Angelucci F (1996) Chronic parasite infection in mice induces brain granulomas & differentially alters brain nerve growth factor levels & thermal responses in paws. *Acta Neuropathol* 92:300–305.
- Aloe L, Moroni R, Mollinari C, Tirassa P (1994) *Schistosoma mansoni* infection enhances the levels of NGF in the liver & hypothalamus of mice. *Neuroreport* 5:1030–1032.
- Aloe L, Simone M, Properzi F (1998) Nerve growth factor: a neurotrophin with activity on cells of the immune system. *Microscopy research & technique*.
- Anon (2001) Viktor Hamburger & Rita Levi-Montalcini: the path to the discovery of nerve growth factor. Available at:

<http://eutils.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/eutils/elink.fcgi?dbfrom=pubmed&id=11283321&retmode=ref&cmd=prlinks>.

- Auffray I, Chevalier S, Froger J, Izac B, Vainchenker W, Gascan H, Coulombel L (1996) Nerve growth factor is involved in the supportive effect by bone marrow--derived stromal cells of the factor-dependent human cell line UT-7. *Blood* 88:1608–1618.
- Baker F, Grigg P, Noorden G (1974) Effects of Visual Deprivation & Strabismus on Response of Neurons in Visual-Cortex of Monkey, Including Studies on Striate & Prestriate Cortex in Normal Animal. *Brain Res* 66:185–208.
- Barbosa FS, Costa DPPD, Arruda F (1981) New field observations on the competitive displacement between two species of planorbid snails inhabiting Northeastern Brasil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 76.
- Beigelman A, Levy J, Hadad N, Pinsk V, Haim A, Fruchtman Y, Levy R (2009) Abnormal neutrophil chemotactic activity in children with congenital insensitivity to pain with anhidrosis (CIPA): the role of nerve growth factor. *Clin Immunol* 130:365–372.
- Berardi N, Fiorentini A (1991) Visual field asymmetries in pattern discrimination: a sign of asymmetry in cortical visual field representation? *Vision Res* 31:1831–1836.
- Berzaghi MP, Gutiérrez R, Heinemann U, Lindholm D, Thoenen H (1995) Neurotrophins induce acute transmitter-mediated changes in brain electrical activity. *J Neurosci* 15:545.
- Bischoff SC, Dahinden CA (1992) Effect of nerve growth factor on the release of inflammatory mediators by mature human basophils. *Blood* 79:2662–2669.
- Blöchl A, Sirrenberg C (1996) Neurotrophins stimulate the release of dopamine from rat mesencephalic neurons via Trk & p75^{Ntr} receptors. *J Biol Chem* 271:21100–21107.
- Blöchl A, Thoenen H (1995) Characterization of nerve growth factor (NGF) release

- from hippocampal neurons: evidence for a constitutive & an unconventional sodium-dependent regulated pathway. *Eur J Neurosci* 7:1220–1228.
- Blöchl A, Thoenen H (1996) Localization of cellular storage compartments & sites of constitutive & activity-dependent release of nerve growth factor (NGF) in primary cultures of hippocampal neurons. *Mol Cell Neurosci* 7:173–190.
- Bonini S, Lambiase A, Bonini S, Levi Schaffer F, Aloe L (1999) Nerve growth factor: an important molecule in allergic inflammation & tissue remodelling. *Int Arch Allergy Immunol* 118:159–162.
- Boothe RG, Dobson V, Teller DY (1985) Postnatal development of vision in human & nonhuman primates. *Annual Review of Neuroscience* 8:495–545.
- Bouchet F, Harter S, Le Bailly M (2003) The state of the art of paleoparasitological research in the old world. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 98:95–101.
- Boyle MD, Lawman MJ, Gee AP, Young M (1985) Nerve growth factor: a chemotactic factor for polymorphonuclear leukocytes in vivo. *J Immunol* 134:564–568.
- Bracci-Laudiero L, Aloe L, Caroleo MC, Buanne P, Costa N, Starace G, Lundeberg T (2005) Endogenous NGF regulates CGRP expression in human monocytes, & affects HLA-DR & CD86 expression & IL-10 production. *Blood* 106:3507–3514.
- Bracci-Laudiero L, Celestino D, Starace G, Antonelli A, Lambiase A, Procoli A, Rumi C, Lai M, Picardi A, Ballatore G, Bonini S, Aloe L (2003) CD34-positive cells in human umbilical cord blood express nerve growth factor & its specific receptor TrkA. *J Neuroimmunol* 136:130–139.
- Brodie C, Gelfand EW (1992) Functional nerve growth factor receptors on human B lymphocytes. Interaction with IL-2. *J Immunol* 148:3492–3497.
- Bürgi B, Otten UH, Ochensberger B, Rihs S, Heese K, Ehrhard PB, Ibanez CF, Dahinden CA (1996) Basophil priming by neurotrophic factors. Activation through the trk receptor. *J Immunol* 157:5582–5588.
- Capron A, Dessaint JP (1992) Immunologic Aspects of Schistosomiasis. *Annu Rev*

Med 43:209–218.

- Capron M, Capron A (1986) Rats, mice & men - models for immune effector mechanisms against schistosomiasis. *Parasitol Today (Regul Ed)* 2:69–75.
- Carmignoto G, Maffei L, Candeo P, Canella R, Comelli C (1989) Effect of NGF on the survival of rat retinal ganglion cells following optic nerve section. *J Neurosci* 9:1263–1272.
- Caroleo MC, Costa N, Bracci-Laudiero L, Aloe L (2001) Human monocyte/macrophages activate by exposure to LPS overexpress NGF & NGF receptors. *J Neuroimmunol* 113:193–201.
- Cattoretti G, Schiró R, Orazi A, Soligo D, Colombo MP (1993) Bone marrow stroma in humans: anti-nerve growth factor receptor antibodies selectively stain reticular cells in vivo & in vitro. *Blood* 81:1726–1738.
- Cheever AW (1970) Relative resistance of the eggs of human schistosomes to digestion in potassium hydroxide. *Bull World Health Organ* 43:601–603.
- Chevalier S, Praloran V, Smith C, MacGrogan D, Ip NY, Yancopoulos GD, Brachet P, Pouplard A, Gascan H (1994) Expression & functionality of the trkA proto-oncogene product/NGF receptor in undifferentiated hematopoietic cells. *Blood* 83:1479–1485.
- Combes C (1990) Where do human schistosomes come from? An evolutionary approach. *Trends Ecol Evol (Amst)* 5:334–337.
- de Abreu Ferrari TC (2004) Involvement of central nervous system in the schistosomiasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 99:59–62.
- de Caballero OL, Dias-Neto E, Koury MC, Romanha AJ, Simpson AJ (1994) Low-stringency PCR with diagnostically useful primers for identification of *Leptospira* serovars. *J Clin Microbiol* 32:1369–1372.
- do Vale Gomes AL, Melo FL, Werkhauser RP, Abath FGC (2006) Development of a real time polymerase chain reaction for quantitation of *Schistosoma mansoni* DNA. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 101 Suppl 1:133–136.

- Domenici L, Berardi N, Carmignoto G, Vantini G, Maffei L (1991) Nerve growth factor prevents the amblyopic effects of monocular deprivation. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:8811–8815.
- Dräger UC (1978) Observations on monocular deprivation in mice. *J Neurophysiol* 41:28–42.
- Dreyfus CF (1989) Effects of nerve growth factor on cholinergic brain neurons. *Trends Pharmacol Sci* 10:145–149.
- Ebendal T (1992) Function & evolution in the NGF family & its receptors. *J Neurosci Res* 32:461–470.
- Ehrhard PB, Erb P, Graumann U, Otten U (1993a) Expression of nerve growth factor & nerve growth factor receptor tyrosine kinase Trk in activated CD4-positive T-cell clones. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:10984–10988.
- Ehrhard PB, Ganter U, Stalder A, Bauer J, Otten U (1993b) Expression of functional trk protooncogene in human monocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:5423–5427.
- Fagiolini M, Pizzorusso T, Berardi N, Domenici L, Maffei L (1994) Functional postnatal development of the rat primary visual cortex & the role of visual experience: dark rearing & monocular deprivation. *Vision Res* 34:709–720.
- Fahnestock M, Yu G, Michalski B, Mathew S, Colquhoun A, Ross GM, Coughlin MD (2004a) The nerve growth factor precursor proNGF exhibits neurotrophic activity but is less active than mature nerve growth factor. *J Neurochem* 89:581–592.
- Fahnestock MM, Yu GG, Coughlin MDM (2004b) ProNGF: a neurotrophic or an apoptotic molecule? *Prog Brain Res* 146:101–110.
- Ferrari TC (1999) Spinal cord schistosomiasis. A report of 2 cases & review emphasizing clinical aspects. *Medicine (Baltimore)* 78:176–190.
- Ferrari TCA, Moreira PRR, Cunha AS (2008) Clinical characterization of neuroschistosomiasis due to *Schistosoma mansoni* & its treatment. *Acta Tropica* 108:89–97.

- Fiore M, Aloe L (2001) Neuroinflammatory implication of *Schistosoma mansoni* infection in the mouse. *Arch Physiol Biochem* 109:361–364.
- Frandsen FF (1979) Discussion of the relationships between *Schistosoma* & their intermediate hosts, assessment of the degree of host-parasite compatibility & evaluation of schistosome taxonomy. *Z Parasitenkd* 58:275–296.
- Gadient RA, Cron KC, Otten U (1990) Interleukin-1 β & tumor necrosis factor- α synergistically stimulate nerve growth factor (NGF) release from cultured rat astrocytes. *Neurosci Lett*.
- Gall CM, Isackson PJ (1989) Limbic seizures increase neuronal production of messenger RNA for nerve growth factor. *Science*.
- Gee AP, Boyle MD, Munger KL, Lawman MJ, Young M (1983) Nerve growth factor: stimulation of polymorphonuclear leukocyte chemotaxis in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 80:7215–7218.
- Gibbs BF, Zillikens D, Grabbe J (2005) Nerve growth factor influences IgE-mediated human basophil activation: functional properties & intracellular mechanisms compared with IL-3. *Int Immunopharmacol* 5:735–747.
- Giffin F, Mitchell D (1978) Rate of Recovery of Vision After Early Monocular Deprivation in Kittens. *J Physiol-London* 274:511–&.
- Guillery RW, Stelzner DJ (1970) The differential effects of unilateral lid closure upon the monocular & binocular segments of the dorsal lateral geniculate nucleus in the cat. *J Comp Neurol* 139:413–421.
- Hallböök F (1999) Evolution of the vertebrate neurotrophin & Trk receptor gene families. *Curr Opin Neurobiol* 9:616–621.
- Harwerth R, Smith E, Crawford M, Noorden G (1989) The effects of reverse monocular deprivation in monkeys I. Psychophysical experiments. *Experimental Brain Research* 74:327–337.
- Heath BM, Xia J, Dong E, An RH, Brooks A, Liang C, Federoff HJ, Kass RS (1998) Overexpression of nerve growth factor in the heart alters ion channel activity &

beta-adrenergic signalling in an adult transgenic mouse. *J Physiol (Lond)* 512 (Pt 3):779–791.

Hooks BM, Chen C (2007) Critical Periods in the Visual System: Changing Views for a Model of Experience-Dependent Plasticity. *Neuron* 56:312–326.

Hove ten R, Schuurman T, Kooistra M, Möller L, van Lieshout L, Verweij JJ (2007) Detection of diarrhoea-causing protozoa in general practice patients in The Netherlands by multiplex real-time PCR. *Clin Microbiol Infect* 13:1001–1007.

Isseroff H, Sylvester PW, Held WA (1986) Effects of *Schistosoma mansoni* on androgen regulated gene expression in the mouse. *Molecular & biochemical ...*

Jannotti-Passos LK, Vidigal TH, Dias-Neto E, Pena SD, Simpson AJ, Dutra WO, de Souza CP, Carvalho-Parra JF (1997) PCR amplification of the mitochondrial DNA minisatellite region to detect *Schistosoma mansoni* infection in *Biomphalaria glabrata* snails. *J Parasitol* 83:395–399.

Jones EM, Colley DG, Tostes S, Lopes ER, Vnencak-Jones CL, McCurley TL (1993) Amplification of a *Trypanosoma cruzi* DNA sequence from inflammatory lesions in human chagasic cardiomyopathy. *Am J Trop Med Hyg* 48:348–357.

Kannan Y, Ushio H, Koyama H, Okada M, Oikawa M, Yoshihara T, Kaneko M, Matsuda H (1991) 2.5S nerve growth factor enhances survival, phagocytosis, & superoxide production of murine neutrophils. *Blood* 77:1320–1325.

Kawamoto K, Matsuda H (2004) Nerve growth factor & wound healing. *Prog Brain Res* 146:369–384.

Knipper M, da Penha Berzaghi M, Blöchl A, Breer H, Thoenen H, Lindholm D (1994) Positive feedback between acetylcholine & the neurotrophins nerve growth factor & brain-derived neurotrophic factor in the rat hippocampus. *Eur J Neurosci* 6:668–671.

la Sala A, Corinti S, Federici M, Saragovi HU, Girolomoni G (2000) Ligand activation of nerve growth factor receptor TrkA protects monocytes from apoptosis. *J Leukoc Biol* 68:104–110.

- Lambiase A, Aloe L (1996) Nerve growth factor delays retinal degeneration in C3H mice. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 234 Suppl 1:S96–S100.
- Lambiase A, Bracci-Laudiero L, Bonini S, Bonini S, Starace G, D'Elios MM, De Carli M, Aloe L (1997a) Human CD4+ T cell clones produce & release nerve growth factor & express high-affinity nerve growth factor receptors. *J Allergy Clin Immunol* 100:408–414.
- Lambiase A, Centofanti M, Micera A, Manni GL, Mattei E, De Gregorio A, de Feo G, Bucci MG, Aloe L (1997b) Nerve growth factor (NGF) reduces & NGF antibody exacerbates retinal damage induced in rabbit by experimental ocular hypertension. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 235:780–785.
- Lesser SS, Lo DC (1995) Regulation of voltage-gated ion channels by NGF & ciliary neurotrophic factor in SK-N-SH neuroblastoma cells. *J Neurosci* 15:253–261.
- LeVay S, Wiesel T, Hubel D (1980) The Development of Ocular Dominance Columns in Normal & Visually Deprived Monkeys. *J Comp Neurol* 191:1–51.
- Levi-Montalcini R (1987) The nerve growth factor: Thirty-five years later. *Biosci Rep* 7:681–699.
- Levi-Montalcini R, Aloe L, Alleva E (1990) A role for nerve growth factor in nervous, endocrine & immune systems. *Prog Neuroendocrinimmunol*:1–10.
- Levi-Montalcini R, Booker B (1960) Destruction of the Sympathetic ganglia in mammals by an antiserum to a nerve-growth protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 46:384–391.
- Lewin GR, Barde Y-A (1996) Physiology of the Neurotrophins. *Annual Review of Neuroscience* 19:289–317.
- Lindholm D, Heumann R, Meyer M, Thoenen H (1987) Interleukin-1 regulates synthesis of nerve growth factor in non-neuronal cells of rat sciatic nerve. *Nature*.
- Lindsay RM, Harmor AJ (1989) Nerve growth factor regulates expression of neuropeptide genes in adult sensory neurons. *nature* 337:362–364.

- Lindvall O, Kokaia Z, Bengzon J, Elmer E, Kokaia M (1994) Neurotrophins & brain insults. *Trends in Neurosciences* 17:490–496.
- Ling G, Gerard RW (1949) The normal membrane potential of frog sartorius fibers. *J Cell Comp Physiol* 34:383–396.
- Linker R, Gold R, Luhder F (2009) Function of neurotrophic factors beyond the nervous system: inflammation & autoimmune demyelination. *Crit Rev Immunol* 29:43–68.
- Ma W, Dumont Y, Vercauteren F, Quirion R (2010) Lipopolysaccharide induces calcitonin gene-related peptide in the RAW264.7 macrophage cell line. *Immunology* 130:399–409.
- Maffei L, Berardi N, Domenici L, Parisi V, Pizzorusso T (1992) Nerve growth factor (NGF) prevents the shift in ocular dominance distribution of visual cortical neurons in monocularly deprived rats. *J Neurosci* 12:4651–4662.
- Male D (1991) The Neuroendocrine—Immune Network. *Immunology*.
- Male D (1994) Psychoimmunology: CNS—Immune Interactions. *Immunology*.
- Maroja R (1953) Incidência da esquistossomose em Fordlândia, município de Itaituba, Estado do Pará. *Revista do Serviço Especial de Saúde Pública* 6:211–218.
- McAllister AK (2001) Neurotrophins & neuronal differentiation in the central nervous system. *Cell Mol Life Sci* 58:1054–1060.
- McAllister AK, Katz LC, Lo DC (1996) Neurotrophin regulation of cortical dendritic growth requires activity. *Neuron* 17:1057–1064.
- McAllister AK, Lo DC, Katz LC (1995) Neurotrophins regulate dendritic growth in developing visual cortex. *Neuron* 15:791–803.
- Mearow KM, Kril Y (1995) Anti-NGF treatment blocks the upregulation of NGF receptor mRNA expression associated with collateral sprouting of rat dorsal root ganglion neurons. *Neurosci Lett* 184:55–58.

- Meijering E, Jacob M, Sarria J-CF, Steiner P, Hirling H, Unser M (2004) Design & validation of a tool for neurite tracing & analysis in fluorescence microscopy images. *Cytometry A* 58:167–176.
- Melamed I, Kelleher CA, Franklin RA, Brodie C, Hempstead B, Kaplan D, Gelfand EW (1996) Nerve growth factor signal transduction in human B lymphocytes is mediated by gp140trk. *Eur J Immunol* 26:1985–1992.
- Micera A, Lambiase A, Puxeddu I, Levi Schaffer F, Bonini S (2004) Nerve Growth Factor (NGF) modulates in vitro cultured human derived keratocyte activities: a potential collaborative effect with TGF- β 1. In, pp E–Abstract3839.
- Nascimento-Carvalho CM, Moreno-Carvalho OA (2005) Neuroschistosomiasis due to *Schistosoma mansoni*: a review of pathogenesis, clinical syndromes & diagnostic approaches. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 47:179–184.
- Njå A, Purves D (1978) The effects of nerve growth factor & its antiserum on synapses in the superior cervical ganglion of the guinea-pig. *J Physiol (Lond)* 277:53–75.
- Noga O, Peiser M, Altenähr M, Knieling H, Wanner R, Hanf G, Grosse R, Suttrop N (2007) Differential activation of dendritic cells by nerve growth factor & brain-derived neurotrophic factor. *Clin Exp Allergy* 37:1701–1708.
- Otten U, Ehrhard P, Peck R (1989) Nerve growth factor induces growth & differentiation of human B lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:10059–10063.
- Otten U, Schwab M, Gagnon C, Thoenen H (1977) Selective induction of tyrosine hydroxylase & dopamine beta-hydroxylase by nerve growth factor: comparison between adrenal medulla & sympathetic ganglia of adult & newborn rats. *Brain Res* 133:291–303.
- Paxinos G, Franklin KBJ (2004) The mouse brain in stereotaxic coordinates. Academic Press. Available at:
http://books.google.com.br/books?id=EHy1QN1xv0gC&pg=PT17&dq=paxinos+watson&ie=ISO-8859-1&cd=8&source=gbs_api.

- Paxinos G, Watson C (2007) The rat brain in stereotaxic coordinates. Academic Press. Available at:
http://books.google.com.br/books?id=0prYfdDbh58C&printsec=frontcover&dq=paxinos+watson&ie=ISO-8859-1&cd=1&source=gbs_api.
- Pearce E, Appleton J (1992) Production of immunomodulatory neuropeptides by *Schistosoma mansoni*. *Parasitol Today (Regul Ed)* 8:353–354.
- Pena HB, de Souza CP, Simpson AJ, Pena SD (1995) Intracellular promiscuity in *Schistosoma mansoni*: nuclear transcribed DNA sequences are part of a mitochondrial minisatellite region. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:915–919.
- Pitchford RJ (1977) A check list of definitive hosts exhibiting evidence of the genus *Schistosoma* Weinland, 1858 acquired naturally in Africa & the Middle East. *J Helminthol* 51:229–252.
- Pittella JE (1991a) The relation between involvement of the central nervous system in schistosomiasis mansoni & the clinical forms of the parasitosis. A review. *The Journal of tropical medicine & hygiene* 94:15–21.
- Pittella JE (1991b) The relation between involvement of the central nervous system in schistosomiasis mansoni & the clinical forms of the parasitosis. A review. *The Journal of tropical medicine & hygiene* 94:15–21.
- Pittella JE (1997) Neuroschistosomiasis. *Brain Pathol* 7:649–662.
- Pontes LA, Dias-Neto E, Rabello A (2002) Detection by polymerase chain reaction of *Schistosoma mansoni* DNA in human serum & feces. *Am J Trop Med Hyg* 66:157–162.
- Pontes LA, Oliveira MC, Katz N, Dias-Neto E, Rabello A (2003) Comparison of a polymerase chain reaction & the Kato-Katz technique for diagnosing infection with *Schistosoma mansoni*. *Am J Trop Med Hyg* 68:652–656.
- Rognlie MC, Dimke KL, Knapp SE (1994) Detection of *Fasciola hepatica* in infected intermediate hosts using RT-PCR. *J Parasitol* 80:748–755.
- Roitman MF, Na E, Anderson G, Jones TA, Bernstein IL (2002) Induction of a salt

- appetite alters dendritic morphology in nucleus accumbens & sensitizes rats to amphetamine. *Journal of Neuroscience* 22:RC225.
- Ruit KG, Osborne PA, Schmidt RE, Johnson EM, Snider WD (1990) Nerve growth factor regulates sympathetic ganglion cell morphology & survival in the adult mouse. *J Neurosci* 10:2412–2419.
- Rush RA, Chie E, Liu D, Tafreshi A, Zettler C, Zhou XF (1997) Neurotrophic factors are required by mature sympathetic neurons for survival, transmission & connectivity. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 24:549–555.
- Sandoval N, Siles-Lucas M, Pérez-Arellano JL, Carranza C, Puente S, López-Abán J, Muro A (2006) A new PCR-based approach for the specific amplification of DNA from different *Schistosoma* species applicable to human urine samples. *Parasitology* 133:581.
- Santos MAV, Rodrigues IRC, Oséas J, Bichara CNC, Silva EO (1997) Prevalência da infecção humana por *Schistosoma mansoni* em Belém do Pará e estudo da positividade da *Biomphalaria glabrata*. *Revista de patologia tropical* 26:49–57.
- Scrimgeour EM, Gajdusek DC (1985) Involvement of the central nervous system in *Schistosoma mansoni* & *S. haematobium* infection. A review. *Brain* 108 (Pt 4):1023–1038.
- Scuri M, Samsell L, Piedimonte G (2010) The role of neurotrophins in inflammation & allergy. *Inflamm Allergy Drug Targets* 9:173–180.
- Seidel MF, Herguijuela M, Forkert R, Otten U (2010) Nerve Growth Factor in Rheumatic Diseases. *Seminars in Arthritis & Rheumatism* 40:109–126.
- Shatz CJ, Stryker MP (1978) Ocular dominance in layer IV of the cat's visual cortex & the effects of monocular deprivation. *J Physiol (Lond)* 281:267–283.
- Sherman S, Guillery R, Kaas J, Sanders K (1974) Behavioral, Electrophysiological & Morphological Studies of Binocular Competition in Development of Geniculocortical Pathways of Cats. *J Comp Neurol* 158:1–18.
- Siliprandi R, Canella R, Carmignoto G (1993) Nerve growth factor promotes

functional recovery of retinal ganglion cells after ischemia. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 34:3232–3245.

Silva LM, de Oliveira CN, Andrade ZA (2002) Experimental neuroschistosomiasis: inadequacy of the murine model. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 97:599–600.

Sin AZ, Roche EM, Togias A, Lichtenstein LM, Schroeder JT (2001) Nerve growth factor or IL-3 induces more IL-13 production from basophils of allergic subjects than from basophils of nonallergic subjects. *J Allergy Clin Immunol* 108:387–393.

Spillantini MG, Aloe L, Alleva E, De Simone R, Goedert M, Levi-Montalcini R (1989) Nerve growth factor mRNA & protein increase in hypothalamus in a mouse model of aggression. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:8555–8559.

Takafuji S, Bischoff SC, De Weck AL, Dahinden CA (1992) Opposing effects of tumor necrosis factor-alpha & nerve growth factor upon leukotriene C4 production by human eosinophils triggered with N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine. *Eur J Immunol* 22:969–974.

Thorpe LW, Stach RW, Hashim GA, Marchetti D, Perez-Polo JR (1987) Receptors for nerve growth factor on rat spleen mononuclear cells. *J Neurosci Res* 17:128–134.

Torcia M, Bracci-Laudiero L, Lucibello M, Nencioni L, Labardi D, Rubartelli A, Cozzolino F, Aloe L, Garaci E (1996) Nerve growth factor is an autocrine survival factor for memory B lymphocytes. *Cell* 85:345–356.

Verge VM, Richardson PM, Wiesenfeld-Hallin Z, Hökfelt T (1995) Differential influence of nerve growth factor on neuropeptide expression in vivo: a novel role in peptide suppression in adult sensory neurons. *J Neurosci* 15:2081–2096.

Verweij JJ, Blangé RA, Templeton K, Schinkel J, Brienen EAT, van Rooyen MAA, van Lieshout L, Polderman AM (2004) Simultaneous detection of *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia*, & *Cryptosporidium parvum* in fecal samples by using multiplex real-time PCR. *J Clin Microbiol* 42:1220–1223.

Verweij JJ, Hove Ten R, Brienen EAT, van Lieshout L (2007) Multiplex detection of

Enterocytozoon bieneusi & Encephalitozoon spp. in fecal samples using real-time PCR. *Diagn Microbiol Infect Dis* 57:163–167.

Wiesel TN, Hubel DH (1963) Single-cell responses in striate cortex of kittens deprived of vision in one eye. *J Neurophysiol* 26:1003–1017.

World Health Organization (2011) Schistosomiasis: number of people treated in 2009. *Wkly Epidemiol Rec* 86:73–80.

Zafra F, Hengerer B, Leibrock J, Thoenen H, Lindholm D (1990) Activity dependent regulation of BDNF & NGF mRNAs in the rat hippocampus is mediated by non-NMDA glutamate receptors. *EMBO J* 9:3545–3550.