

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

Centro de Ciências da Saúde

Faculdade de Farmácia



**Efeitos da silimarina na fase aguda da infecção
experimental pelo *Schistosoma mansoni***

HÍLTON ANTÔNIO MATA DOS SANTOS

Rio de Janeiro

2010

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

Centro de Ciências da Saúde

Faculdade de Farmácia



**Efeitos da silimarina na fase aguda da infecção
experimental pelo *Schistosoma mansoni***

HÍLTON ANTÔNIO MATA DOS SANTOS

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas

Orientador: Prof. Dr. Alexandre dos Santos Pyrrho

Rio de Janeiro

2010

Ficha Catalográfica

S237e Santos, Hílton Antônio Mata dos.
Efeitos da silimarina na fase aguda da infecção experimental pelo
Schistosoma mansoni/ Hilton Antônio Mata dos Santos; orientador
Alexandre dos Santos Pyrrho. – Rio de Janeiro : UFRJ, 2010.
xiv, 105f. : il. col. ; 30cm.

Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – UFRJ /
Faculdade de Farmácia, 2010.
Inclui bibliografia.

1. Esquistosomiase. 2. Silimarina. 3. *Schistosoma mansoni*. 4. Fibrose.

I. Pyrrho, Alexandre dos Santos. II. Título.

CDD 615.718

Este trabalho foi realizado no setor de Parasitologia do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, sob orientação do professor Alexandre dos Santos Pyrrho.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Efeitos da silimarina na fase aguda da infecção
experimental pelo *Schistosoma mansoni*.

Hílton Antônio Mata dos Santos

Orientador: Alexandre dos Santos Pyrrho

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em:

Orientador: Prof. Dr. Alexandre dos Santos Pyrrho

Prof^a. Dr^a. Débora Henrique da Silva Anjos

Prof^a. Dr^a. Cláudia Lúcia Martins da Silva

Prof^a. Dr^a. Suzana Guimarães Leitão

Prof. Dr. Mauro Sola Penna

Prof^a. Dr^a. Helena Keiko Toma

Aos meus pais, Hilton e Sayonara, e a
minha irmã Taís, sinônimos de amor e
companheirismo.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. **Alexandre dos Santos Pyrrho**, pelo exemplo de profissional, pela dedicação, ensinamento, orientação e oportunidades concedidas;

Ao Prof. Dr. **Carlos Rangel Rodrigues**, pela confiança;

À Prof^a. Dr. **Cláudia Paiva Lima**, pela valiosa colaboração, orientação e apoio;

À Prof^a. Dr. **Morgana Castelo Branco**, pela dedicação e colaboração;

À Prof^a. **Virginia Frota**, pelo excepcional direcionamento;

Aos companheiros de laboratório **Epitácio Souza Lima, Carolina Carneiro Rocha, Fabiana Gonçalves Lino, Letícia Campos da Costa, Pedro Maia Coutinho, Taissa Mendes, Carina da Silva Souto, Marcella Bade e Cyntia Pereira Marques Rangel** pelo apoio, incentivo, amizade e colaboração na realização deste trabalho.

À minha querida e amada madrinha **Vera Regina Mata de Souza**, pela sua grandiosa presença em ocasiões inesquecíveis;

À minha vó **Ana Benites dos Santos**, que em muitos dias nublados fez o sol aparecer;

À minha vó **Maria José Vidal Mata**, pela luz viva que me ilumina “*in memoriam*”;

À **Marcella Benchimol Echeverria**, pelo amor, tolerância e paciência infinita;

Que o meu bom Deus conceda a todos amor, saúde e paz.

Cresci ouvindo meus pais dizendo...

– Totonho, o cavalo passa para todos...

***“O pessimista queixa-se do trote do cavalo;
O otimista espera que ele mude;
O realista se prepara com suas botas e esporas.”***

(adaptado de William George Ward)

Agradeço às dificuldades que enfrentei, pois através delas aprendi que a maior alegria está em cada obstáculo superado.

RESUMO

Na esquistossomíase, o processo inflamatório granulomatoso reacional à deposição dos ovos no tecido hepático e a subsequente fibrose, são cruciais no curso clínico da infecção. Os fatores que levam à fibrose perivascular ainda não foram plenamente esclarecidos. Fármacos imunomodulatórios e antifibróticos, tal como a silimarina, podem favorecer o desenvolvimento de um curso mais ameno das alterações patológicas provocadas na esquistossomíase, de modo a proporcionar subsídios para a elaboração de novas estratégias de controle e suporte desta infecção. O presente trabalho teve por objetivo avaliar o efeito da silimarina sobre a patogênese da infecção aguda experimental murina pelo *Schistosoma mansoni*, avaliando-se as vias de administração oral e intraperitoneal, as doses de 2, 10, e 50 mg/kg, nos intervalos de 24 e 48 horas e o número de inoculações. Análise dos resultados obtidos indicam que o tratamento com silimarina leva a uma redução de até 23% do processo granulomatoso periovular e 32% na redução da fibrose hepática. Foi observado ainda que a administração de silimarina pela via intraperitoneal não promove o comprometimento na curva ponderal e na taxa de sobrevivência deste modelo experimental. Os grupos de animais tratados com as doses de 2 e 10 mg/kg, nos intervalos de 24 e 48 horas, respectivamente, apresentaram redução da hepatomegalia, do infiltrado granulomatoso periovular e da fibrose hepática sugerindo uma menor morbidade. Estas reduções foram ainda mais significativas com o prolongamento do tratamento. Os resultados obtidos são coerentes com a avaliação da fase aguda da esquistossomíase mansônica e sugerem um papel relevante da silimarina nesta infecção.

ABSTRACT

In schistosomiasis, the granulomatous inflammatory process, reactive deposition of eggs in the liver and subsequent liver fibrosis is crucial in the clinical course of infection. All factors leading to perivascular fibrosis are not yet fully understood. Immunomodulatory and antifibrotic drugs, such as silymarin, may favor a milder course of the pathological changes induced in schistosomiasis, in order to provide subsidies for the development of new strategies to control and support of this infection. This study aimed to evaluate the effect of silymarin on the pathogenesis of experimental murine acute infection with *Schistosoma mansoni*, evaluating the oral and intraperitoneal administration, concentrations, intervals between inoculation and the number of doses. The results obtained indicate that treatment with silymarin led to a reduction of the granulomatous periovular process and a reduction of liver fibrosis. Further it was observed that administration of silymarin intraperitoneally caused no organic impairment in this model. The animal groups treated with concentrations of 2 and 10 mg/kg, at intervals of 24 and 48 hours, respectively, had reductions of hepatomegaly, the granulomatous periovular infiltrate and liver fibrosis suggesting a lower morbidity. The extended treatment also promoted more striking differences. These findings are results of the acute phase of infection where fibrosis is markedly lower than that observed in the chronic phase, so we can assume that the use of silymarin in the chronic phase of schistosomiasis will bring even better results.

ABREVIACOES

ALT	Alanina aminotransferase
AST	Aspartato aminotransferase
CLAE	Cromatografia lquida de alta eficiência
CMC	Carboximetilcelulose
d	Dia
D	Doses (número de inoculações)
DPI	Dias ps-infeco
HSC	Clula estrelada hepática (<i>Hepatic stellate cell</i>)
ICAM	Molcula de adesão intercelular (<i>Intercellular adhesion molecule</i>)
IFN	Interferon
IL	Interleucinas
iNOS	xido-nítrico sintase induzvel
ip	Intraperitoneal
Leg	Legalon [®]
NF-κB	Fator nuclear kappa B (<i>Nuclear factor kappa B</i>)
SEA	Antígeno solúvel do ovo (<i>Soluble egg antigen</i>)
Sil	Silimarina
TGF	Fator de transformao do crescimento
TH	Linfócito T auxiliar (<i>Helper</i>)
TNF	Fator de necrose tumoral (<i>Tumor necrosis factor</i>)

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Distribuição geográfica dos hospedeiros intermediários de <i>S. mansoni</i>	3
Figura 2 - Ciclo biológico do parasito <i>S. mansoni</i>	5
Figura 3 - Distribuição da esquistossomose mundial	7
Figura 4 - Áreas de transmissão da esquistossomose no Brasil	8
Figura 5 - Estrutura química dos principais componentes da silimarina.	18
Figura 6 - Desenho do primeiro lote experimental.....	27
Figura 7 - Desenho do segundo lote experimental	30
Figura 8 - Desenho do terceiro lote experimental	32
Figura 9 - Desenho do quarto lote experimental	34
Figura 10 - Modelo da avaliação do infiltrado inflamatório granulomatoso periovular.	36
Figura 11 - Curva ponderal (1º Lote)	39
Figura 12 - Curva de sobrevivência (1º Lote)	40
Figura 13 - Ovos no tecido hepático (1º Lote)	41
Figura 14 - Índices fígado e baço (1º Lote).....	42
Figura 15 - Curva ponderal dos grupos Normais e Infectados (2º Lote).....	44
Figura 16 - Curva de sobrevivência (2º Lote).	45
Figura 17 - Ovos no tecido hepático (2º Lote).	46
Figura 18 - Índices fígado e baço (2º Lote).	47
Figura 19 - Área dos granulomas hepáticos (2º Lote).	48
Figura 20 - Dosagem de hidroxiprolina (2º Lote)	49
Figura 21 - Curva ponderal (3º Lote).	51
Figura 22 - Curva de sobrevivência (3º Lote).	52
Figura 23 - Ovos no tecido hepático (3º Lote)	53
Figura 24 - Índices fígado e baço (3º Lote).	54
Figura 25 - Área dos granulomas hepáticos (3º Lote).	55
Figura 26 - Dosagem de hidroxiprolina (3º Lote).	56
Figura 27 - Curva ponderal (4º Lote).	58
Figura 28 - Curva de sobrevivência (4º Lote).	59
Figura 29 - Ovos no tecido hepático (4º Lote)	60
Figura 30 - Índices fígado e baço (4º Lote).	61
Figura 31 - Área dos granulomas hepáticos (4º Lote).	62

Figura 32 - Dosagem de hidroxiprolina (4º Lote).	63
---	----

ÍNDICE

RESUMO	ix
ABSTRACT	x
INTRODUÇÃO.....	1
O Parasito	2
Aspectos Epidemiológicos	6
Alterações patológicas.....	9
Granuloma	11
Papel da Imunidade	13
Silimarina	17
OBJETIVOS.....	22
MATERIAL E MÉTODOS.....	23
Fármaco	23
Inoculações via oral.....	23
Inoculações via intraperitoneal.....	23
Esterilidade dos materiais.....	24
Camundongos/Grupos	24
Infecção	25
Peso dos camundongos.....	25
Primeiro Lote experimental	25
Segundo Lote Experimental	27
Terceiro Lote Experimental.....	30
Quarto Lote Experimental	33
Eutanásia	35
Pesagem dos órgãos.....	35
Quantificação de ovos nos tecidos	35
Processamento histológico	35
Dosagem de hidroxiprolina hepática.....	36
Avaliação estatística	37
RESULTADOS	38
Primeiro Lote Experimental (administração oral).....	38
Percentual do peso corporal dos camundongos	38

Curva de sobrevivência.....	39
Distribuição de ovos nos tecidos	40
Média do peso dos Órgãos.....	41
Segundo Lote Experimental (administração intraperitoneal).....	42
Percentual do peso corporal dos camundongos	43
Curva de sobrevivência.....	45
Distribuição de ovos nos tecidos	45
Média do peso dos Órgãos.....	46
Dados Histopatológicos	48
Dosagem de hidroxiprolina.....	49
Terceiro Lote Experimental (administração intraperitoneal)	50
Percentual do peso corporal dos camundongos	50
Curva de sobrevivência.....	51
Distribuição de ovos nos tecidos	52
Média do peso dos Órgãos.....	53
Dados Histopatológicos	55
Dosagem de hidroxiprolina.....	56
Quarto Lote Experimental (administração intraperitoneal).....	57
Percentual do peso corporal dos camundongos	57
Curva de sobrevivência.....	58
Distribuição de ovos nos tecidos	59
Média do peso dos Órgãos.....	60
Dados Histopatológicos	61
Dosagem de hidroxiprolina.....	62
DISCUSSÃO	64
CONCLUSÃO.....	74
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	75

INTRODUÇÃO

A esquistossomíase é uma doença milenar. O caso mais antigo desta parasitose foi identificado, por imunodiagnóstico, em uma múmia egípcia que viveu a mais de cinco mil anos (DEELDER *et al.*, 1990). As especulações quanto aos estudos filogenéticos do gênero *Schistosoma* são controversas já que a ausência de fósseis dificulta estabelecer sua origem (MORGAN *et al.*, 2001). Porém, há um consenso de que a espécie *S. mansoni* só foi introduzida nas Américas durante o tráfico de escravos da África (DESPRES, IMBERT-ESTABLET e MONNEROT, 1993).

Embora existam registros de junho de 1847 escritos pelo japonês Yoshinao Fujii descrevendo a sintomatologia da esquistossomíase (TANAKA e TSUJI, 1997), as primeiras observações científicas sobre o agente etiológico desta infecção ocorreram apenas em 1851, por Theodor Bilharz (TAN e AHANA, 2007). Somente a partir da década de 50, do século XX, houve um crescimento exponencial sobre os estudos destes parasitos. Mesmo com projetos de controle bem sucedidos a esquistossomíase permanece sendo uma das mais prevalentes infecções parasitárias. Afeta, atualmente, cerca de 200 milhões de pessoas no mundo (WHO, 2009a), dos quais 120 milhões apresentam a forma sintomática e 20 milhões a forma grave (CHITSULO *et al.*, 2000) e é considerada a segunda doença parasitária em mortalidade, precedida apenas pela malária (WHO, 2009b). Esta infecção é responsável por uma mortalidade anual de aproximadamente 100.000 pessoas (WHO, 1997), podendo chegar a 250.000 (SAMUELSON e VON LICHTENBERG, 1999). Além disso, estima-se que 700 milhões de pessoas vivam em área de risco de infecção (WHO, 2009a).

A melhoria na eficiência terapêutica dos agentes esquistossomicidas e o avanço simultâneo dos métodos de diagnósticos proporcionou uma redução da morbidade desta infecção. Contudo, com a expansão das áreas endêmicas e focos com elevados índices de reinfecção estimularam os clínicos a realizarem tratamento de grupos de alto risco sem diagnóstico individual prévio (WHO, 2002), permitindo ao verme uma suscetibilidade menor – tolerância e resistência – às drogas parasiticidas (FALLON e DOENHOFF, 1994). Por esta razão, apesar de ser considerada uma doença negligenciada, há justificativa para maiores investimentos na descoberta de fármacos que possam atuar de forma profilática e principalmente atenuadora das alterações patológicas (curativa), visto que, as sequelas individuais já estabelecidas regridem muito lentamente, provocando um grande impacto social por levar a morbidade de significativa parcela da população na idade produtiva.

O desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento das enfermidades que

acometem o homem depende direta ou indiretamente de recursos naturais. A avaliação biológica de extratos de plantas na esquistossomose pode revelar novos medicamentos para terapêutica desta infecção. A silimarina, um composto do *Milk Thistle*, é utilizada como remédio para o tratamento de injúrias hepática há quase 200 anos (KVASNICKA *et al.*, 2003). Suas atividades antioxidante, hepatoprotetora, hepatoregeneradora, imunomodulatória e antifibrótica podem favorecer o desenvolvimento de um curso mais ameno nas alterações patológicas provocadas pela esquistossomíase, tornando assim, o uso deste fitoterápico relevante nesta infecção.

O Parasito

As esquistossomíases, conhecidas também como esquistossomoses ou bilharzioses, são doenças causadas por parasitos pertencentes ao filo Platyhelminthes, da classe Trematoda (Digenea). Sua família Schistosomatidae distingue-se dos outros Digenea por apresentar sexos separados e, na subfamília, acentuado dimorfismo sexual.

Das espécies adaptadas ao homem, todas do gênero *Schistosoma*, as mais comuns são – *S. mansoni*, *S. japonicum*, *S. haematobium* – sendo as espécies *S. intercalatum* e *S. mekongi* menos frequentes, já que tem áreas de distribuição mais restritas e ocasionalmente infectam o homem. As localizações geográficas das espécies destes parasitos estão condicionadas a distribuição de determinados gêneros de moluscos, onde cada uma das 3 principais espécies de parasitos adaptadas ao homem, além de apresentarem características morfológicas e fisiológicas peculiares, têm um gênero de molusco distinto como hospedeiro intermediário. Sendo esta uma das justificativas para a presença, no hemisfério ocidental, apenas da espécie *S. mansoni*, que tem como hospedeiro intermediário moluscos pulmonados do gênero *Biomphalaria*. Este gênero de molusco vive em água doce, fator responsável pela alta prevalência da infecção principalmente nas regiões tropicais, onde a utilização desta água é de grande importância para populações locais. A Figura 1 ilustra a distribuição geográfica das 3 espécies reconhecidas como hospedeiras intermediárias de *S. mansoni* no Brasil.

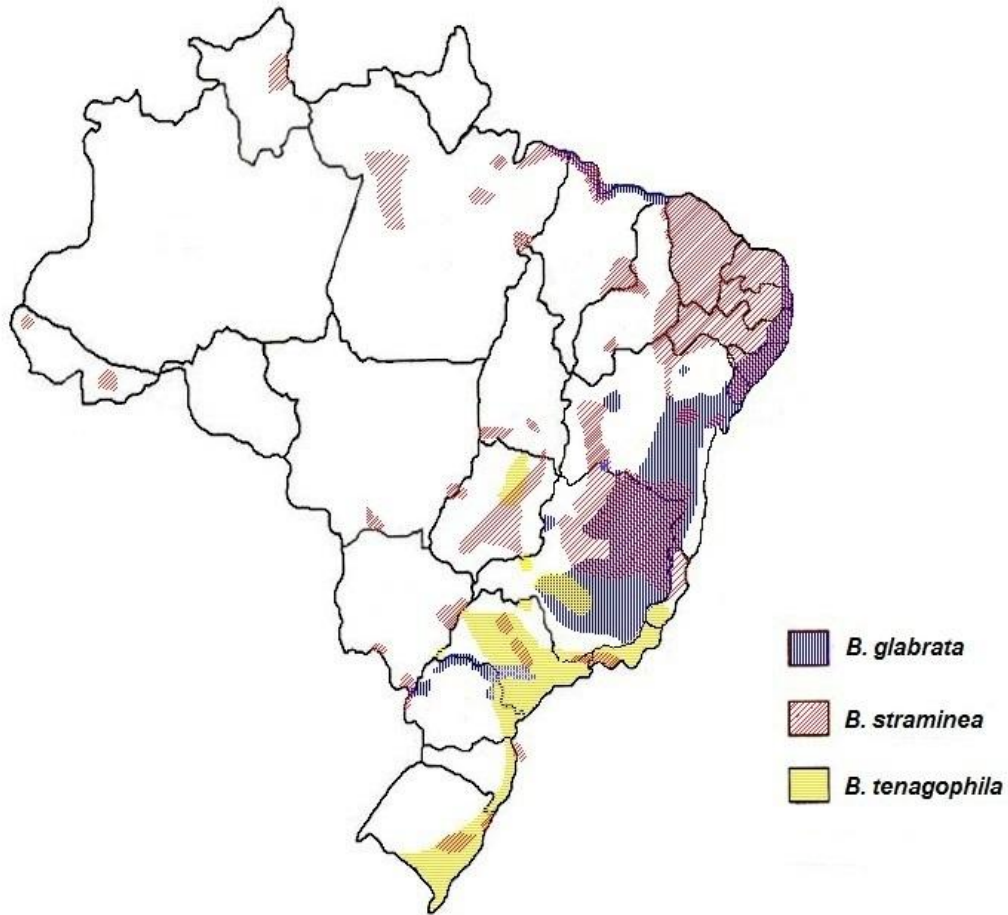


Figura 1 - Distribuição geográfica dos hospedeiros intermediários de *S. mansoni*.
Extraído e adaptado de Paraense (2001).

Os helmintos da espécie *Schistosoma mansoni*, única do gênero de interesse sanitário nas Américas, apresentam características que permitem perfeita identificação. O macho mede aproximadamente 1 cm de comprimento por 0,11 cm de largura é de cor branca e achatado dorsoventralmente; já a fêmea têm corpo cilíndrico, são mais longas (1,4 cm) e mais finas (0,016 cm), sua coloração mais escura se deve a maior presença no tubo digestivo de hemozoína – pigmento derivado da digestão do sangue. Estes vermes se fixam as paredes dos vasos sanguíneos através de um par de ventosas e apresentam uma sobrevivida longa, em média 5 anos, entretanto, existem relatos de indivíduos que mesmo estando fora de áreas endêmicas por mais de 30 anos ainda possuem o parasito e eliminam ovos (MCKERROW e SALTER, 2002; REY, 2008).

O ciclo biológico do parasito, ilustrado na Figura 2, é complexo e constituído por cinco estágios (além do ovo) – miracídio, esporocisto, cercária, esquistossômulo e verme adulto (macho e fêmea). Os casais adultos de *S. mansoni* vivem preferencialmente nas vênulas do

plexo hemorroidário e ramificações mesentéricas, local onde as fêmeas depositam aproximadamente 300 ovos/fêmea/dia. Eventualmente alguns destes ovos são carregados pela corrente circulatória para os espaços intra-hepáticos, enquanto outros ficam aderidos ao endotélio dos vasos, onde sofrem um processo de “migração” em direção a luz intestinal. Após 6 ou 7 dias os ovos, que já possuem uma larva evoluída no seu interior denominada miracídio, atingem a luz intestinal e são eliminados nas fezes. Quando estes ovos entram indevidamente em contato com coleções de água doce, os miracídios eclodem e buscam ativamente se aderir e penetrar, com o auxílio de estruturas específicas, no molusco do gênero *Biomphalaria* seu hospedeiro intermediário. A invasão neste caramujo pode ocorrer em qualquer ponto do tegumento e o processo dura de 3 a 15 minutos (REY, 2008). No interior do molusco, o miracídio perde seu revestimento epitelial ciliado e sofre reorganização celular, perdendo totalmente seu aspecto anterior ao se transformar em uma estrutura sacular alongada – esporocisto primário – que dá origem a esporocistos filhos. Estes esporocistos são repletos de células germinativas em constante multiplicação que se diferenciam para formar um novo tipo de larva, as cercárias. Estima-se que um único miracídio possa produzir até 200.000 cercárias, todas do mesmo sexo, embora as cercárias não apresentem órgãos genitais característicos nesta fase (RAGHUNATHAN e BRUCKNER, 1975). Depois de 34-40 dias, as cercárias abandonam de modo intermitente o molusco infectado, preferencialmente nas horas mais claras do dia, e mediante a agitação de sua cauda nadam ativamente com o intuito de localizar e penetrar na pele do hospedeiro definitivo. No processo de penetração, que não ultrapassa 15 minutos (CUNHA, 1970), as cercárias perdem sua cauda bifurcada (MCKERROW e SALTER, 2002) e após algumas horas passam por processos de alterações bioquímicas e morfológicas específicas para se adaptarem ao aumento na temperatura e na osmolaridade do novo ambiente – hospedeiro definitivo (STIREWALT, 1974) – o parasito que passa a não mais suportar a água se transforma em esquistossômulo (MCLAREN, 1980) e permanece na derme ou tecido conjuntivo por dois ou três dias, até atingirem a corrente circulatória e passivamente serem carregados para o coração direito, de onde são bombeados para o pulmão (REY, 2008). Durante a fase intrapulmonar, os esquistossômulos sofrem maturação para, posteriormente atingirem o coração esquerdo, e deslocarem-se para o sistema vascular intra-hepático, onde há um desenvolvimento acelerado do verme, possivelmente pelos altos níveis de nutrientes no sangue porta-hepático (KHAMMO *et al.*, 2002). Na terceira semana após a infecção, ocorre o acasalamento – condição necessária para a maturação das fêmeas – e a migração dos parasitos para as veias mesentéricas, completando-se o ciclo biológico após a total maturação dos vermes e início da oviposição (MONE e

BOISSIER, 2004).

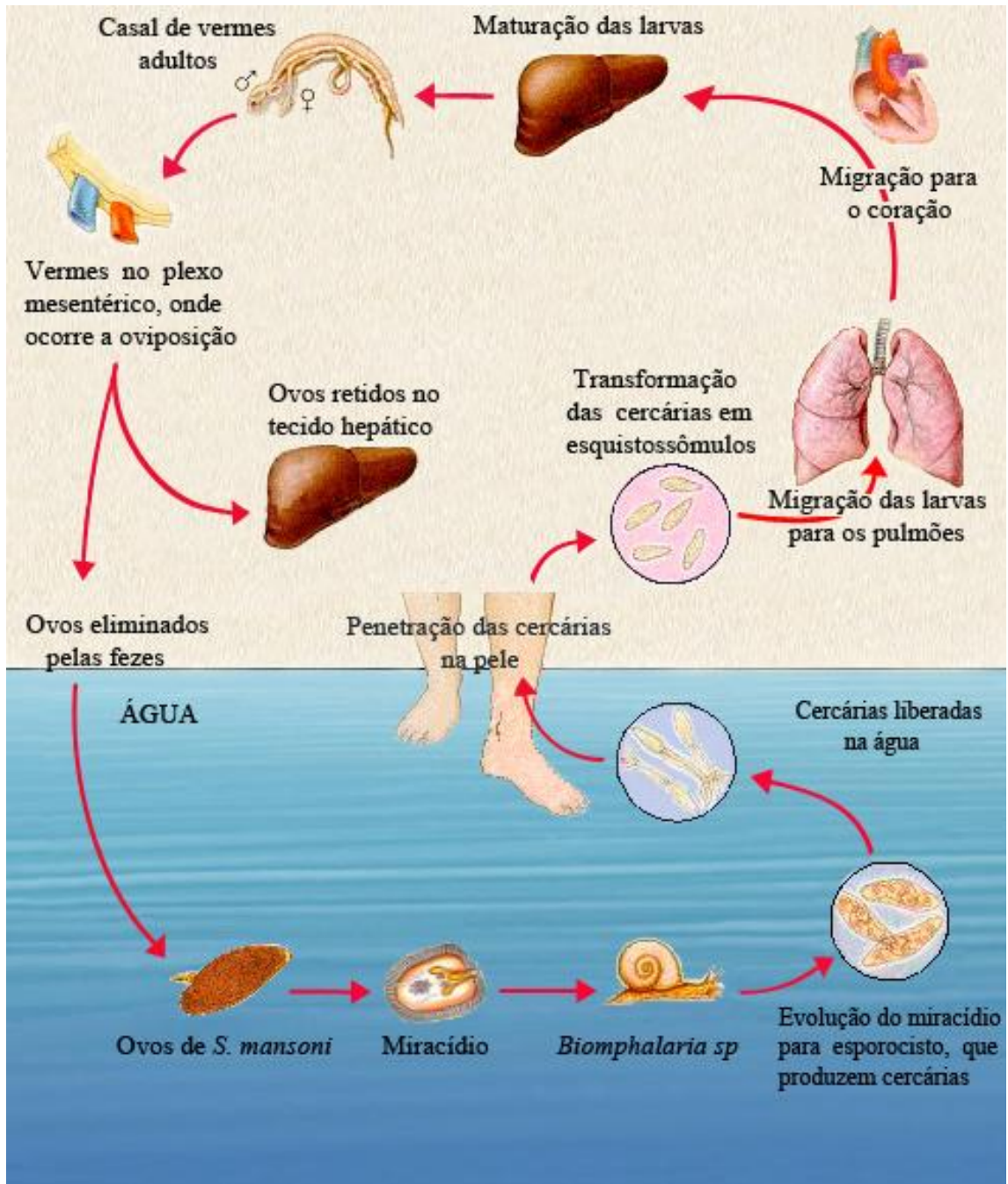


Figura 2 - Ciclo biológico do parasito *S. mansoni*.
Extraído e adaptado de Ross e colaboradores (2002).

Aspectos Epidemiológicos

As alterações na distribuição das áreas endêmicas, nos últimos cinquenta anos, não diminuiu o número de pessoas infectadas e o potencial de disseminação da esquistossomíase (SAVIOLI *et al.*, 1997), tornando-a uma das parasitoses mais prevalentes (CHITSULO *et al.*, 2000). Estimativas recentes sugerem que o gênero *Schistosoma* expõe 700 milhões de pessoas ao risco permanente de infecção (WHO, 2009a), sendo mais frequente em localidades com deficiência de saneamento básico, o que obriga indivíduos de baixo poder aquisitivo à vida insalubre, pela falta de escolha e disponibilidade de fontes de águas seguras para fins recreativos, domésticos ou profissionais (HAGAN, NDHLOVU e DUNNE, 1998).

A distribuição geográfica da esquistossomose é ampla (Figura 3), afetando 74 países distribuídos nas Américas, África, Oriente Médio, Filipinas e Sudoeste Asiático (WHO, 1997). O aumento ou a introdução da esquistossomose em novas áreas pode estar relacionado com o crescimento populacional, o desenvolvimento de recursos hídricos para a irrigação ou para produção de energia hidrelétrica (TALAAT *et al.*, 1999), juntamente com o aumento das dimensões das áreas colonizadas pelos moluscos suscetíveis. Nas Américas, o Brasil é considerado um dos maiores focos endêmicos da parasitose, não somente pelo número de enfermos, mas também pela gravidade apresentada por alguns deles.

As áreas de distribuição da esquistossomíase no Brasil localizam-se principalmente em regiões onde a população é predominantemente de baixo poder aquisitivo (Figura 4). Muitos fatores parecem condicionar a expansão desta parasitose, como as condições de vida das populações e até mesmo o incentivo político-econômico na utilização de recursos hídricos na construção de represas para a produção de energia hidrelétrica, que além de possibilitar o desenvolvimento do molusco vetor da esquistossomose, facilita a população na utilização dessas águas, não só para atividades de lazer e para as atividades econômicas como a agricultura, a irrigação e a pesca, mas também na utilização destas águas para eliminação dejetos. No entanto, a identificação de casos autóctones nas grandes cidades brasileiras chama atenção para a urbanização da doença (KATZ e PEIXOTO, 2000), que pode ter origem através da migração de pessoas infectadas para áreas sem condições de saneamento básico.

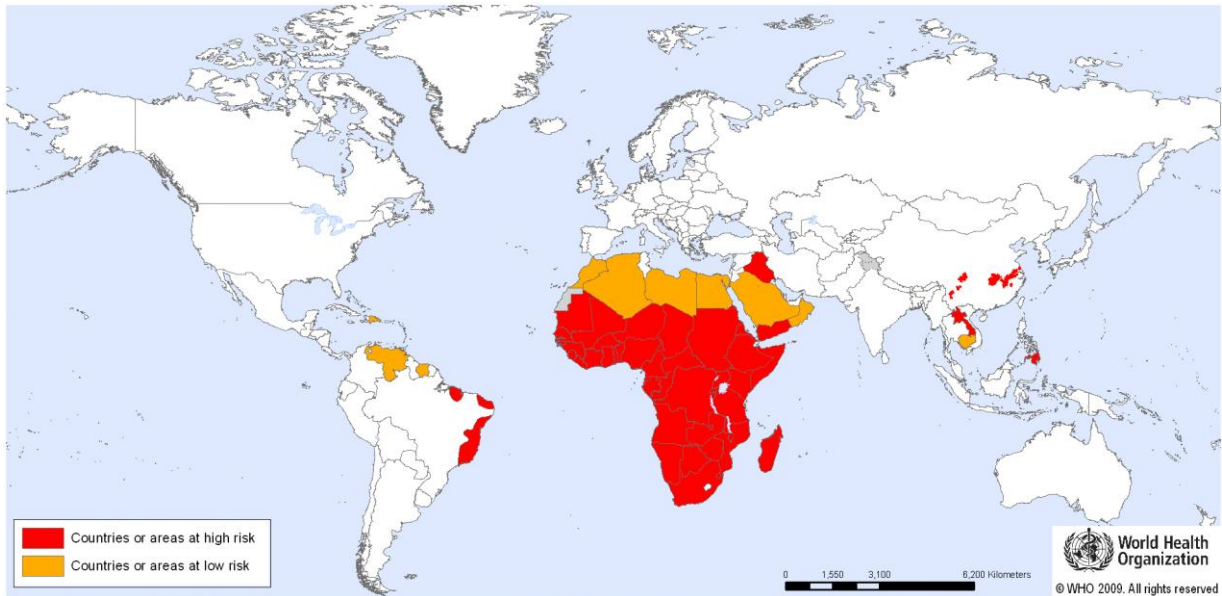


Figura 3 - Distribuição da esquistossomose mundial
Extraído: WHO, 2009

Na tentativa de avaliar a necessidade potencial de drogas anti-esquistossomótica foi feito um levantamento, na década de 80, para calcular a prevalência da população infectada pelo *Schistosoma*. Destas estimativas o Brasil apresenta 7 milhões de pessoas infectadas (UTROSKA *et al.*, 1989), e o risco de infecção esquistossomótica nesta população é maior do que muitos países da África, sendo de 42,73 milhões de pessoas (WHO, 2009b).

Os relatórios divulgados pelos Comitês de Especialistas da Organização Mundial da Saúde (WHO, 2002) recomendam que para o controle da morbidade deve-se realizar o tratamento de grupos de alto risco sem diagnóstico individual prévio, esta estratégia possibilitou ao Programa Especial de Controle da Esquistossomose (PECE) uma possível redução na prevalência da infecção em áreas endêmicas, mas não do número de indivíduo infectados, uma vez que ocorreu um grande crescimento populacional (KATZ e PEIXOTO, 2000).

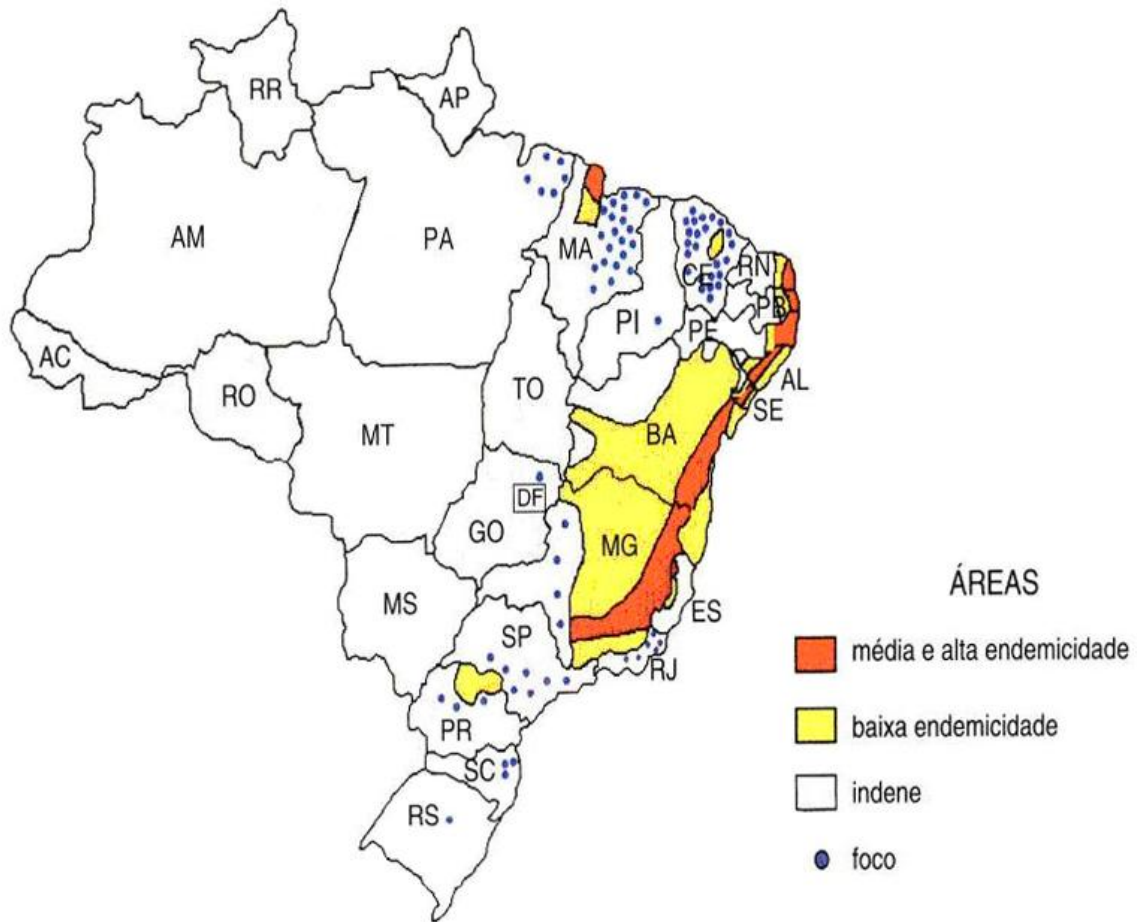


Figura 4 - Áreas de transmissão da esquistossomose no Brasil
 Extraído: Rey (2001). Fonte: FUNASA

Por tanto, com as atividades de controle aparentemente ineficazes, embora bem elaboradas (FERREIRA e COUTINHO, 1999), juntamente com o avanço dos conhecimentos moleculares e imunológicos, há o direcionamento das pesquisas para o desenvolvimento de vacinas contra a esquistossomose, apesar da inexistência de resultados satisfatórios.

O tratamento periódico, nas regiões endêmicas, durante a infância, parece ser um caminho adequado, por provocar uma redução na morbidade hepática e possibilitar a diminuição das diferenças sociais intra e inter-regionais, uma vez que a infecção esquistossomótica pode comprometer o desenvolvimento físico e cognitivo, prejudicando o desempenho escolar.

No entanto, a quimioterapia preventiva com agentes esquistossomicidas pode induzir a tolerância em cepas de *Schistosoma*, como demonstrado por (ROGERS e BUEDING, 1971). Desta maneira, além da necessidade de medidas que impliquem na melhoria do contexto

social e econômico, como habitações, educação e investimento no saneamento, há também a necessidade em buscar produtos que possam atuar na reversão das lesões já ocasionadas, levando assim a redução da morbidade hepática.

Alterações patológicas

A infecção por *S. mansoni* pode produzir alterações anatomopatológicas. Na maioria dos indivíduos, geralmente assintomática, a fase aguda é chamada de forma toxêmica ou febre de Katayama, enquanto a fase crônica, associada com hepatoesplenomegalia e hipertensão portal, classifica-se em forma hepatointestinal e forma hepatoesplênica intestinal (compensada e descompensada).

A evolução e sintomatologia do processo patológico, no hospedeiro definitivo, dependem de uma série de fatores, entre os quais se devem levar em consideração a cepa do parasito (ANDRADE e SADIGURSKY, 1985), a carga parasitária infectante (CHEEVER, 1968b), o número de reinfecções (SANTOS, DE SOUZA e ANDRADE, 2000), o estado nutricional (ORSINI *et al.*, 2001), a idade (RICHTER, 2003) e o estado imunológico do hospedeiro (DAVIES e MCKERROW, 2003).

Após a penetração das cercárias em indivíduos que entraram em contato com águas contaminadas, pode-se ter início uma reação inflamatória cutânea, hipersensibilidade imediata, caracterizada por manchas avermelhadas devido a dilatação das arteríolas e capilares, caracterizando muitas vezes o primeiro estágio de sintomatologia da fase aguda, com intumescimento e prurido – dermatite cercariana. A resistência dos esquistossômulos a ação dos anticorpos específicos, deve-se provavelmente a capacidade da membrana tegumentar do parasito de camuflar sua atividade antigênica através da adsorção de uma grande variedade de proteínas como antígenos eritrocíticos, imunoglobulinas (GOLDRING *et al.*, 1976; YONG e DAS, 1983) e fragmentos celulares do hospedeiro. Estes esquistossômulos atingem os pulmões ainda na primeira semana de infecção e podem desencadear tosse seca, anorexia, sudorese e astenia (NEVES, DA LUZ e TONELLI, 1966). Muitas vezes estas reações são assintomáticas até o início da fase de postura dos ovos, que são os agentes responsáveis por desencadear as maiores alterações patológicas no hospedeiro.

Foi demonstrado, em camundongos BALB/c e C57Bl/6, que a capacidade de oviposição diária das fêmeas de *S. mansoni* corresponde respectivamente a 315 e 340 ovos/fêmea/dia (CHEEVER, MACEDONIA *et al.*, 1994). Estima-se que aproximadamente 50 % dos ovos eliminados pelas fêmeas cheguem à luz intestinal, sendo os demais carreados pela circulação portal e retidos nos tecidos provocando um processo inflamatório peculiar denominado reação

granulomatosa (WARREN, 1978). Por esta razão, a patologia da infecção, mais frequentemente, advém da patogenicidade dos ovos que desencadeiam alterações nos tecidos onde se encontram, em especial no fígado. Inicialmente, tem-se a formação dos granulomas, representados por um infiltrado inflamatório celular que circundam os ovos individualmente devido a resposta imunológica do sistema do hospedeiro aos antígenos liberados pelos ovos de *S. mansoni*. Estas estruturas aproximadamente esféricas são constituídas por uma heterogeneidade de células dispostas em uma matriz extracelular rica principalmente em colágenos (I e III), proteoglicanas, fibronectina, vitronectina, laminina, tenascina e fibras elásticas (LENZI *et al.*, 1991).

Contudo, em relação as alterações hepáticas, estas parecem não decorrer apenas do processo granulomatoso, mas também da liberação de substâncias hepatotóxicas produzidas pelos ovos do parasito (AMIRI *et al.*, 1992). As manifestações clínicas nesta fase inicial são dominadas por prostração, cefaléia, leucocitose acompanhada de eosinofilia, diarreia característica com presença de muco e sangue, anorexia, dor abdominal, podendo ainda evoluir para uma síndrome febril aguda eosinofílica denominada de febre Katayama. Estes sintomas frequentemente desaparecem após cerca de 120 dias (MONTENEGRO *et al.*, 1999).

As distribuições dos granulomas periovulares nas ramificações terminais mais finas da veia porta, geralmente caracterizam uma infecção leve (ANDRADE e PRATA, 1963). Porém a distribuição destes granulomas em regiões periportais denota uma infecção mais grave, que é acompanhada pela simultaneidade do processo inflamatório e pelo depósito contínuo dos ovos, tornando-se elevado o número de granulomas, principalmente na fase crônica da infecção.

Na forma avançada da esquistossomíase, caracterizada pela fibrose hepática, pode haver coalescência das zonas de fibrose que ocupam extensas áreas. Dessa forma, as áreas fibrosadas ao longo dos vasos hepáticos podem levar a uma fibrose perivascular, dita *pipestem*, conhecida como fibrose de Symmers (BOGLIOLO, 1957). Ocorrem então lesões destrutivas e obstrutivas no sistema vascular venoso, caracterizadas pela diminuição da luz e/ou da elasticidade dos vasos intra-hepáticos afetados, desencadeando um consequente aumento da pressão da veia porta com possíveis alterações hiperplásicas e/ou hipertróficas nas estruturas arteriais e biliares. A agressão que sofre a veia porta na esquistossomose provoca a hipertensão portal, tortuosidade vascular, circulações colaterais e varizes esofagianas, além de outras alterações que comprometem o indivíduo infectado. Eventualmente, estas varizes esofagianas (ou gástricas) se rompem provocando hemorragias maciças, responsáveis por um número considerável de óbitos (ANDRADE, 2009).

O aumento do volume do baço é um componente importante no decorrer da infecção esquistossomótica. Na fase aguda a esplenomegalia deve-se a proliferação das linhagens celulares linfocítica e mononuclear fagocítica; contudo, na fase crônica este aumento do órgão tem como origem a congestão passiva decorrente da hipertensão portal (KELNER, 1992). Além disso, tem-se observado dilatações congestivas nos seios venosos e espessamento difuso dos cordões esplênicos que acabam formando inúmeras fístulas entre arteríolas e vênulas intra-esplênicas, favorecendo assim, a sobrecarga sanguínea no sistema porta, vindo sob alta pressão, quase que diretamente da artéria esplênica (FREITAS *et al.*, 1999). O espessamento dos cordões esplênicos deve-se ao aumento dos componentes da matriz extracelular, com a presença de colágeno tipo IV e laminina (FREITAS *et al.*, 1999).

A infecção esquistossomótica provoca no intestino, inflamação, hiperplasia, ulceração, microabscessos, alterações na inervação e vasculatura intestinal, podendo desencadear alterações funcionais (VARILEK *et al.*, 1991). A deposição maciça de ovos em uma mesma região pode estimular a formação de lesões tumorais no interior da cavidade abdominal, com extensa fibrose (BICALHO, 1978). Em geral as lesões situam-se no intestino grosso e reto (GRYSEELS *et al.*, 2006).

O desenvolvimento de circulação colateral pela intensa fibrose hepática e a hipertensão portal, pode culminar na anastomose porta-cava, facilitando o transporte dos ovos para outros órgãos (ANDRADE, 2009). Frequentemente estes ovos atingem os pulmões, provocando aglutinação de plaquetas, formação de granulomas, trombos intravasculares e necrose dos vasos (REY, 2008). Esta pneumopatia esquistossomática pode provocar hipertensão pulmonar e conseqüentemente hipertrofia e insuficiência cardíaca (*cor pulmonale*).

Outros órgãos podem ser afetados nesta infecção. Há indicações de que a incidência global de glomerulopatia na esquistossomíase varia entre 5 e 6%, podendo atingir 15% dos pacientes na forma hepatoesplênica (VAN VELTHUYSEN, 1996). Acredita-se que a presença de circulações colaterais promovem a incapacidade dos macrófagos e das células de Kupffer, no ambiente hepática, de capturarem antígenos derivados dos vermes ou dos ovos (BRITO *et al.*, 1999). Estas circulações colaterais promovem o desvio dos antígenos para a circulação geral que se depositam principalmente na região mesangial dos glomérulos.

Granuloma

A esquistossomíase é uma doença causada predominantemente pela resposta imune do hospedeiro aos ovos dos helmintos e as reações granulomatosas que o envolvem. O granuloma que se desenvolve ao redor dos ovos, é decorrente da eliminação de antígenos do

miracídio, denominados genericamente de SEA (*Soluble egg antigens* – Antígenos solúveis do ovo). Estes antígenos são liberados pelo ovo e estimulam células específicas (HANG, WARREN e BOROS, 1974; WYLER, WAHL e WAHL, 1978), favorecendo assim, a formação de um infiltrado de células inflamatórias ao redor dos ovos (BOROJEVIC e GRIMAUD, 1980; BOROS, 1989). As reações granulomatosas destroem os ovos e sequestram e/ou neutralizam os seus diversos antígenos patogênicos, além disso, estimulam a fibrogênese no tecido do hospedeiro (WILSON *et al.*, 2007). Majoritariamente a patologia se desenvolve nos locais de maior acumulação de ovos, intestino e fígado. No entanto a gravidade da doença fibro-obstrutiva crônica depende diretamente da intensidade e duração da infecção, já que estes fatores determinam a quantidade de antígenos liberados pelos ovos (BURKE *et al.*, 2009).

Experimentalmente a infecção pelo *S. mansoni* vem sendo amplamente estudada em vários modelos de animais. As observações histopatológicas quanto a resposta granulomatosa em torno dos ovos se desenvolve em cinco estágios: granuloma de reatividade fraca, exsudativo, exsudativo-produtivo, produtivo e estágio involutivo (HURST, WILLINGHAM e LINDBERG, 2000).

O estágio de reatividade fraca é caracterizado pela acumulação gradual de células mononucleares, neutrófilos e eosinófilos, ao redor dos ovos recém depositados. Este primeiro aporte celular leva a formação de microabscessos neutrofílicos característicos da fase exsudativa (BURKE *et al.*, 2009). O surgimento de histiócitos e células epitelióides na periferia do granuloma, substituindo gradualmente as zonas leucocitárias, representam o estágio exsudativo-produtivo, havendo nesta etapa a interação de fibrócitos ao redor dos granulomas. A degeneração e desintegração dos ovos caracterizam a fase produtiva, onde os fibrócitos e as fibras de colágeno tornam-se mais proeminentes, formando-se ainda uma zona mais periférica de linfócitos, histiócitos e plasmócitos. À medida que se tem predominância dos fibrócitos e das fibras de colágeno ocorre a diminuição numérica dos diferentes tipos celulares que envolvem o granuloma. Com a evolução do processo, os granulomas tendem a regredir ficando inicialmente reduzidos a estruturas fibróticas e depois a restos hialinos que podem calcificar ou serem reabsorvidos, caracterizando a fase involutiva (BURKE *et al.*, 2009).

Embora, inicialmente, os granulomas sejam avasculares, o deslocamento das células para o centro do granuloma pode estar relacionado com o efeito quimiotático dos antígenos do miracídio, que costumam se difundir do centro do granuloma para a periferia, além disso, as células neste processo se aderem de maneira a formarem verdadeiras redes ou circuitos. A

modulação, assim como as variações estruturais e celulares dos granulomas, são específicas para cada órgão. Na sua totalidade, os granulomas hepáticos além de apresentarem uma quantidade maior de colágeno do que os intestinais, por serem mais fibrogênicos (GRIMAUD *et al.*, 1987), apresentam também um número maior de eosinófilos (54%), linfócitos T (11%) e B (4%) e mastócitos (< 1%), enquanto os granulomas intestinais são constituídos, na região do íleo, principalmente de macrófagos e um número pequeno de células T e na região do colon de macrófagos, eosinófilos e linfócitos T (WEINSTOCK e BOROS, 1983). Todavia, avaliações *in vivo* demonstram que camundongos desprovidos de eosinófilos apresentam alta mortalidade associada com retenção de 80 % mais ovos no tecido hepático (OLDS e MAHMOUD, 1980). Deste modo, os eosinófilos parecem desempenhar um importante papel sobre a passagem dos ovos para o lúmen intestinal, já que os eosinófilos e os monócitos/macrófagos parecem ser responsáveis pela corrosão da membrana basal atuando sobre as células epiteliais de maneira a abrirem canais para a passagem dos ovos para o lúmen intestinal (LENZI, LENZI e SOBRAL, 1987).

Papel da Imunidade

A resposta imune na esquistossomíase esta envolvida no desenvolvimento de muitas das alterações patológicas desta infecção. O processo reacional inflamatório granulomatoso, parece seguir mecanismos diferentes conforme a fase da infecção. Durante o período de maturação do parasito, que decorre aproximadamente das primeiras 5 semanas de infecção, há uma expressão imune dominante de linfócitos T CD4⁺ de perfil TH1 (PEARCE *et al.*, 1991; PEARCE e MACDONALD, 2002; BURKE *et al.*, 2009), com um aumento na produção de IFN- γ , IL-1, IL-2, IL-6 e TNF. Após a maturação dos parasitos e o início da oviposição, a partir da 6^a semana de infecção, esta resposta imune é direcionada para o perfil TH2, apresentando uma resposta inflamatória exsudativa exuberante (PEARCE e MACDONALD, 2002), com aumento na produção de IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13. Com a cronicidade da infecção, a resposta TH2 é modulada e os granulomas que se formam a partir de então apresentam acentuada diminuição no seu tamanho quando comparados com os da fase anterior, este processo foi denominado por (DOMINGO e WARREN, 1968) como estágio de dessensibilização endógena.

Em 2002, de Jesus e colaboradores, estudando as alterações imunológicas de 31 pacientes infectados por *Schistosoma mansoni*, observaram que durante a resposta TH1, 87% dos pacientes apresentaram elevadas concentrações de TNF nos níveis séricos e foram associadas com dores abdominais. Os níveis de citocinas pró-inflamatórias (TNF, IL-1 e IL-6)

foram elevadas em sobrenadantes de cultura de células mononucleares do sangue periférico (PBMC). Além disso, foram observados níveis elevados de IFN- γ e baixa produção de IL-5 e IL-10. Sendo assim, as citocinas pró-inflamatórias elevadas da resposta TH1 e as baixas concentrações dos complexos de resposta TH2 (IL-5 e IL-10) podem explicar o processo agressivo de resposta imune da fase aguda, relacionando esta etapa a lesão tecidual cardíaca, pulmonar e hepática (DE JESUS *et al.*, 2002).

A incapacidade do desenvolvimento da resposta TH2 para regular a resposta pró-inflamatória – associada com a esquistossomíase aguda – é letal quando esta doença é analisada em camundongos (PEARCE e MACDONALD, 2002). Utilizando camundongos C57BL/6, *knockout* de IL-4, Brunet e colaboradores (1997), tentaram avaliar a resposta TH2 na infecção pelo *S. mansoni* e mostraram que durante a fase aguda da infecção estes animais apresentavam uma caquexia severa seguida de morte, possivelmente mediada por TNF e a correlação com níveis elevados de óxido nítrico nos órgãos. Estes autores pressupõem que a IL-4 impede a severidade da doença por regular a ativação de macrófagos.

Durante todo o curso da infecção a resposta humoral desempenha um papel relevante, tornando-se mais intensa com o início da oviposição. As infecções parasitárias causadas por helmintos são caracterizadas pela eosinofilia e pelos elevados níveis séricos de IgE (LAWLEY *et al.*, 1979). A destruição dos esquistossômulos está associada com a degranulação dos eosinófilos que é estimulada pela IgE (DESSEIN *et al.*, 1992; WEBSTER *et al.*, 1996), além disso, a resistência contra a reinfeção pelo *S. mansoni*, parece estar vinculada, em humanos, com este imunocomplexo, como demonstrado por Rihet e colaboradores (1991) ao observarem a resposta imune pré e pós-tratamento, e comparando-as, posteriormente, com a intensidade das reinfeções, correlacionaram a resistência à infecção – aos indivíduos que apresentavam maiores concentrações de IgE sérica.

Camundongos infectados com *S. mansoni* e inoculados com anticorpos monoclonais neutralizantes de IL-4 e IL-5, revelam que a inativação ou ausência destas citocinas secretadas pelo perfil TH2, respectivamente inibem a produção de IgE sérico e promovem a ausência de eosinófilos circulantes e no tecido (SHER *et al.*, 1990). Assim a deflagração na produção de IgE e de eosinófilos, juntamente com outras manifestações de hipersensibilidade imediata, estão sob o controle de citocinas secretadas pela resposta TH2 e não pela resposta do tipo TH1 (FINKELMAN *et al.*, 1986; FINKELMAN *et al.*, 1990).

Em indivíduos atópicos (incluindo a asma), assim como nas infecções por helmintos, há o desenvolvimento das células TH2, dos mastócitos e altos títulos de IgE sérica (PEARCE e MACDONALD, 2002), no entanto Medeiros e colaboradores (2003) ao avaliarem a evolução

da asma em pacientes com e sem infecção pelo *Schistosoma mansoni*, observaram um curso mais leve da asma nos esquistossomóticos. Estes autores sugerem que na esquistossomíase a síntese de IL-10 pode modular a reação de hipersensibilidade ao diminuir a liberação de histamina e outros mediadores liberados pelos mastócitos, proporcionando um curso mais ameno para a asma.

No início da oviposição, a produção das citocinas é direcionada para o perfil TH2. Embora a resposta TH2 pareça ter um papel crucial nesta infecção, a sua ação prolongada contribui para o desenvolvimento da fibrose hepática e da morbidade crônica. Foi demonstrado que camundongos transgênicos deficientes de IL-13 apresentam uma sobrevida prolongada, correlacionada com o não desenvolvimento de fibrose hepática grave, o que normalmente ocorre durante a infecção (FALLON *et al.*, 2000). No entanto, os camundongos com receptores ineficientes de IL-4 apresentaram uma alta mortalidade, relacionada com a lesão nas células hepáticas e a patologia intestinal (FALLON *et al.*, 2000). Portanto, o mecanismo pelo qual a IL-13 é capaz de promover a fibrogênese torna esta citocina à principal responsável pela fibrose hepática, e assim, prejudicial na sobrevivência no modelo murina nesta infecção (CHIARAMONTE *et al.*, 2001). Já a citocina IL-4 é considerada benéfica, por apresentar uma atividade inibitória das citocinas IL-1, IL-6 e TNF (RALPH *et al.*, 1992). Além disso, glicoproteínas presentes nos ovos de *S. mansoni* parecem induzir a produção de IL-4 por basófilos de forma antígeno-independente (SCHRAMM *et al.*, 2007).

A alteração da resposta imune para um tipo TH1 dominante tem sido altamente eficaz na diminuição da deposição de colágeno. Como demonstrado por Hesse e colaboradores (2001) mediadores associados com a resposta TH1 como o IFN- γ , IL-12 e TNF podem suprimir o desenvolvimento da resposta TH2, e portanto de IL-13. Contudo, mesmo sendo a patogenicidade da esquistossomíase decorrente da resposta reacional inflamatória granulomatosa, o desenvolvimento da reação periovular é de fundamental importância para o sequestro e/ou inativação das toxinas liberadas pelos ovos, visto que este processo evita a degeneração das células hepáticas e o possível comprometimento do fígado, como demonstrado por Amiri e colaboradores (1992). Estes autores observaram que a ausência de reações granulomatosas promove extensas áreas de necrose e acentuada mortalidade em camundongos imunodeficientes SCID (*Severe Combined Immuno-Deficiency*), que apresentam macrófagos normais, porém ausência de linfócitos T ou B funcionais, nesta infecção.

Em avaliações envolvendo camundongos *knockout* para IL-10, observa-se um aumento de IFN- γ , IL-2, IL-1 β , TNF, porém apesar da polarização da resposta TH1, não há redução

significativa nas citocinas do perfil TH2 (WYNN *et al.*, 1998). O papel de imunomodulação exercido pela citocina IL-10 na fase crônica desta infecção tem sido amplamente estudado (FLORES VILLANUEVA, REISER e STADECKER, 1994; BOOTH *et al.*, 2004; SARAIVA e O'GARRA, 2010). Esta citocina é essencial para estabelecer a resposta específica polarizada dos linfócitos T *helper* CD4 *in vivo*. Deste modo a IL-10 parece controlar as respostas TH1 e TH2, exercendo uma função “estabilizadora”, evitando a polarização da resposta imune na infecção esquistossomótica (HOFFMANN *et al.*, 1999), uma vez que a resposta TH1 dominante promove uma alta mortalidade na fase aguda e a polarização para a resposta TH2 uma severa morbidade associada a fibrose (HOFFMANN, CHEEVER e WYNN, 2000).

A deposição de colágeno e matriz extracelular, não é atribuída apenas aos fibroblastos e miofibroblastos. Desde que foram descritas por von Kupffer em 1876, as células estreladas hepáticas (HSC), anteriormente denominadas de células de Ito, lipócitos ou células perisinusoidais, despertam interesse dos patologistas (MOREIRA, 2007). Diversos estudos têm sido realizados na tentativa de elucidar os processos de ativação das células estreladas, que no seu estado quiescente são as principais responsáveis pelo armazenamento de vitaminas lipossolúveis (vitamina A) na forma de éster de retinila (WAKE, 1971). No entanto, estas células que normalmente distribuem-se na proporção de uma a cada vinte hepatócitos e representam 1,4% do volume total do fígado (MOREIRA, 2007), desempenham um papel fundamental na fibrogênese hepática, independente da etiologia (BRIDLE, CRAWFORD e RAMM, 2003). A atividade desta célula é amplificada *in vivo* pela depleção de antioxidantes, como normalmente ocorre em hepatopatias (FRIEDMAN, 2000). Foi demonstrado por (SVEGLIATI BARONI *et al.*, 1998) em cultura de células estreladas, condicionadas em meio de hepatócitos, que o estresse oxidativo promove um aumento da proliferação celular e da síntese de colágeno. Além do mais o TGF- β 1, que pode ser produzido de forma autócrina por estas células, parece desempenhar um importante papel no processo da fibrogênese, visto que a inibição da síntese de TGF- β 1 em modelo experimental reduz significativamente a fibrose hepática (KONDOU *et al.*, 2003).

As severas sequelas, as reinfecções após o tratamento e os altos índices de mortalidade causados pela esquistossomíase mostram a necessidade de novos modelos experimentais na tentativa de revelar medicamentos para terapêutica desta infecção e elucidar fatores ainda obscuros. Desta forma, este trabalho se propõe a estudar um modelo experimental que utiliza a silimarina como agente imunomodulador/ hepatoprotetor /antioxidante agindo na fase aguda da infecção esquistossomótica.

Silimarina

As plantas medicinais são utilizadas desde as mais antigas civilizações. Os conhecimentos empíricos de suas atividades foram transmitidos para grupos étnicos de acordo com a própria necessidade humana. Com o desenvolvimento da ciência e da tecnologia, as plantas medicinais tornaram-se objetos de análise.

A terapêutica moderna se desenvolve direta ou indiretamente de produtos de origens naturais para tratar enfermidades que acometem o homem. Além disto, os produtos fitoterápicos estão sendo cada vez mais utilizados no Brasil e no resto do mundo. Nos EUA é relatado que doze a dezessete por cento da população adulta utilizam produtos à base de plantas (JOHNSON *et al.*, 2000). O Instituto Nacional de Saúde dos EUA (*National Institute of Health* - NIH) realizou uma pesquisa ambulatorial e verificou que um em cada seis pacientes utilizam produtos fitoterápicos adicionados no tratamento prescrito (JOHNSON *et al.*, 2000). Estes dados ampliam a necessidade de maiores pesquisas visando caracterizar os componentes de produtos naturais quanto a suas ações e interações sobre o organismo humano, e em especial sobre o sistema imune.

Agentes imunomodulatórios podem auxiliar o sistema imune de pacientes com infecções. Inúmeros estudos relatam o “*milke thistle*” (*Silybum marianum* (L.) Gaertn.), como um excelente agente imunoestimulatório (RAMASAMY e AGARWAL, 2008; GHARAGOZLOO *et al.*, 2010). O *Silybum marianum* é citada como um dos medicamentos mais antigos, o chá das sementes desta planta era utilizado por Dioscorides, na Grécia antiga, para o tratamento de veneno de cobra (FLORA *et al.*, 1998). Porém foi Plínio, o velho, um naturalista romano, quem descreveu o *Silybum marianum* como sendo excelente para problemas biliares (LUPER, 1998).

A silimarina é um extrato lipofílico (GALHARDI *et al.*, 2009) isolado das sementes e dos frutos do *Silybum marianum*, uma planta herbácea, pertencente à família das Asteraceae e nativa de uma estreita área do Mediterrâneo. Mesmo com o uso desta planta para o tratamento de injúrias hepáticas e da vesícula biliar há mais de 2000 anos, as investigações clínicas são relativamente recentes.

A planta ganhou proeminência na década de 60, quando Janiak & Hänsel isolaram os princípios ativos do extrato e Pelter & Hänsel elucidaram as estruturas químicas. Os principais componentes (Figura 5) isolados e caracterizados estruturalmente da silimarina são silibina, isosilibina, silicristina e silidianina (SONNENBICHLER *et al.*, 1999). No entanto, Johnson e colaboradores (2002) descrevem o produto como uma mistura de sete isômeros denominados

taxofolina, silicristina, silidianina, silibina A, silibina B, isosilibina A e isosilibina B. Uma série de outros flavolignóides pode ser encontrados nas sementes, incluindo dehidrosilibina, desoxisilicristina, desoxisilidianina, silandrina, silibinoma, silihermina, e neosilihermina (KVASNICKA *et al.*, 2003).

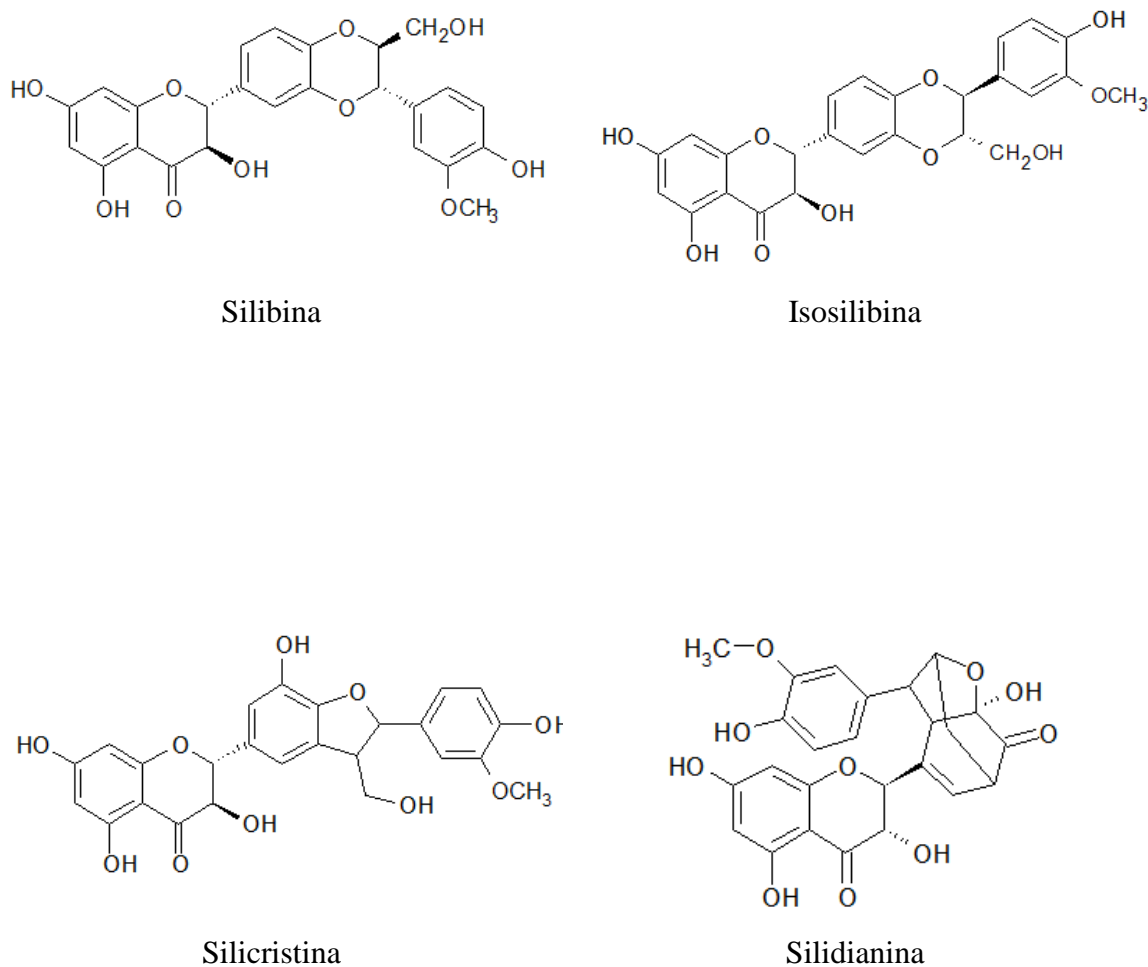


Figura 5 - Estrutura química dos principais componentes da silimarina.
Extraído e adaptado de Sonnenbichler e colaboradores (1999).

As sementes do *S. marianum* também contêm betaína, que apresenta comprovado efeito hepatoprotetor (LUPER, 1998). Atualmente, a silimarina é utilizada como controle positivo na avaliação de novos fármacos que possam apresentar atividade hepatoprotetora (CHANNABASAVARAJ, BADAMI e BHOJRAJ, 2008).

Além disso, a silimarina é constituída de ácidos graxos essenciais o que pode contribuir para sua atividade antiinflamatória (LUPER, 1998). Outro importante produto é a silibina – componente com maior grau de atividade biológica – que além de ser relatada em inúmeros trabalhos com atividade hepatoprotetora (NAJAFZADEH *et al.*, 2010)), também apresenta ação quimiopreventiva para câncer *in vitro* e *in vivo* (KAUR e AGARWAL, 2007).

Além da silibina, tem-se observado em avaliações *in vitro*, que dois diastereoisômeros presentes na silimarina, a isosilibina A e isosilibina B, também apresentam atividade antineoplásica. Deep e colaboradores (2007), ao avaliarem células de câncer de próstata humanas LNCaP e 22Rv1, observaram que ambos diastereoisômeros promovem a inibição do crescimento e morte celular juntamente com um forte controle sobre ciclina G1 e a indução da apoptose nas duas linhagens celulares. Deste modo a silimarina tem se mostrado uma boa candidata para o tratamento de diversas neoplasias (KOHNO *et al.*, 2002; GALLO *et al.*, 2003; SINGH e AGARWAL, 2004; TYAGI *et al.*, 2006; DEEP e AGARWAL, 2007; DEEP *et al.*, 2008), como demonstrado em numerosos ensaios clínicos que buscam avaliar a eficácia terapêutica da silimarina, já que este produto apresenta influência sobre as expressões reguladoras do ciclo celular e sobre proteínas envolvidas na apoptose, modulando o desequilíbrio entre a sobrevivência celular e a apoptose (RAMASAMY e AGARWAL, 2008).

Outros importantes papéis da silimarina estão relacionados às atividades de estabilização de membrana, antiperoxidação lipídica, antioxidante, hepatoregeneradora, imunomodulatória, antifibrótica, hipocolesterolêmico e cardioprotetor (KREN e WALTEROVA, 2005; CROCENZI e ROMA, 2006). Além disso, a silimarina pode ter um longo tempo de ação no fígado (HE *et al.*, 2002) e não é hepatotóxica baseadas em observações clínicas, já que apresenta valores muito altos de dose letal 50 - LD₅₀ (FLORA *et al.*, 1998). Conforme Rainone (2005) a silimarina apresenta recirculação enterohepática, o que resulta em um aumento de sua concentração nas células hepáticas maior do que no plasma.

Estudos em animais sugerem um amplo espectro de efeito hepatoprotetor da silimarina, podendo desta maneira proteger animais expostos a diversas lesões tóxicas (HOOFNAGLE, 2005), como *Amanita phalloides* (ANTWEILER, 1977; VOGEL *et al.*, 1984), tetracloreto de carbono (RAUEN *et al.*, 1973), galactosamina (RAUEN e SCHRIEWER, 1971) e etanol (SONG *et al.*, 2006).

Recentemente a ação antioxidante foi demonstrada em diferentes modelos (TOKLU, TUNALI-AKBAY *et al.*, 2007; TOKLU, TUNALI AKBAY *et al.*, 2007). As propriedades imunoestimulatórias da silimarina são descritas em diversos estudos *in vivo* e *in vitro*. Flora e colaboradores (1998) afirmam que os efeitos hepatoprotetores da silimarina são múltiplos:

apresentando atividade antioxidante; aumento do conteúdo glutatônico celular; efeitos estabilizantes na membrana; aumento da síntese protéica; e ativação do RNA polimerase. Corroborando este dado, Machicao e Sonnenbichler (1977) demonstraram *in vitro*, que a atividade enzimática da RNA polimerase I é estimulada pela silibina. Outro trabalho demonstrou que a silimarina acelera a síntese das subunidades ribossomais 28S, 18S e 5S, promovendo também a formação de ribossomos completos (SONNENBICHLER e ZETL, 1984). Além disso, a silimarina parece alterar a expressão genética do fígado, como se tem demonstrado em camundongos normais através do aumento da expressão de TGF- β 1 e c-myc (HE *et al.*, 2002).

Estudos demonstram que os linfócitos T são de fundamental importância para a inibição e reparação nos estágios de danos hepáticos. A administração de silimarina em pacientes com cirrose alcoólica estimula a proliferação de linfócitos T (LANG *et al.*, 1988). Esta proliferação dos linfócitos também é observada em camundongos (AGOSTON *et al.*, 2001). No entanto, já foi demonstrado que a silibina (componente de maior grau de atividade da silimarina) pode suprimir a proliferação induzida dos linfócitos T (MERONI *et al.*, 1988). Como observado *in vivo* por Johnson e colaboradores (2002) ao avaliarem que a silimarina provoca uma diminuição e uma inibição dos linfócitos T quando administrada em baixas concentrações, porém quando utilizado em altas doses estimulam o processo inflamatório. Estas populações de células são sensíveis à silimarina tanto *in vivo* quanto *in vitro*.

O papel antifibrótico da silimarina no modelo experimental já é conhecido. Boigk e colaboradores (1997) induziram ratos a uma fibrose portal progressiva através de uma completa oclusão dos ductos biliares, processo este que tende a culminar em ascite e hepatoesplenomegalia. Estes autores observaram que os ratos não tratados com silimarina apresentaram um aumento do colágeno hepático de até nove vezes, quando comparados com o grupo controle, enquanto os ratos tratados com silimarina obtiveram uma redução de 35% na formação de hidroxiprolina. Uma possível explicação vem a partir de dados bioquímicos que mostram que a silimarina suprime a expressão do procolágeno α -1 (I) e de metaloproteinases 1 provavelmente pela diminuição de mRNA TGF- β 1 em ratos com fibrose biliar secundária (JIA *et al.*, 2001). O efeito antifibrótico da silimarina também é demonstrada em outros modelos experimentais que induzem a fibrose utilizando toxinas hepáticas como a dimetilnitrosamina (LIN *et al.*, 2007). Desta maneira, devido à atividade antifibrótica atribuída à silimarina, este produto pode atuar na morbidade provocada pela esquistossomíase, já que grande parte das lesões nesta infecção são decorrentes da deposição de fibrose hepática.

Mesmo com a ampla utilização da silimarina em várias condutas terapêuticas, há

mecanismos subjacentes desconhecidos. Os estudos em animais experimentais e até mesmo *in vitro*, não contribuem apenas para compreender os mecanismos da silimarina, mas também para prever novas aplicações terapêuticas (CROCENZI e ROMA, 2006) podendo assim, proporcionar subsídios para a elaboração de novas estratégias de controle e suporte para a esquistossomíase. Desta forma, as ações apresentadas pela silimarina (imunomoduladoras, hepatoprotetoras/hepatoregeneradoras, antioxidante, e antifibrótica) podem auxiliar minimizando a morbidade observada na infecção pelo *Schistosoma mansoni*.

Ainda que não se tenha uma avaliação direta da silimarina sobre o sistema do parasito, Hessien e colaboradores (2009) avaliaram os efeitos da silimarina frente diversas hepatopatias. Estes autores também avaliaram a capacidade da silimarina em atenuar as lesões provocadas pelo *Schistosoma mansoni* durante os primeiros 42 dias de infecção, período este que de acordo com inúmeros trabalhos, antecede o ápice das alterações anatomopatológicas de fase aguda da esquistossomíase (ROMANHA, 1999; NETO, 2001; PYRRHO *et al.*, 2002), visto que a maturação dos parasitos e início da oviposição ocorrem por volta da 6^a semana de infecção (PEARCE e MACDONALD, 2002). Estes autores concluem que a silimarina promove a regressão da patologia induzida por diferentes etiologias, de modo que há possibilidade de redução substancial da progressão de cirrose e de carcinoma hepatocelular.

O Centro Nacional para Medicina Complementar e Alternativa (NCCAM) em colaboração com o Instituto Nacional de Diabetes e Doenças Digestivas e Renais (NIDDK) realizou um seminário de pesquisa para o desenvolvimento da silimarina na terapia de doenças hepáticas e destacou como elemento crítico a necessidade de se padronizar o produto silimarina para as investigações clínicas, bem como realizar estudos pilotos de fase I e II para definir a dose ideal e o regime de doses (HOOFNAGLE, 2005).

Trabalhos anteriores realizados pelo nosso grupo de estudo demonstraram que a utilização de dexametasona – um produto com atividade imunomodulatória – pode proporcionar um curso mais ameno na infecção esquistossomótica (PYRRHO *et al.*, 2002; PYRRHO *et al.*, 2004). Neste trabalho nosso objetivo foi avaliar a ação da silimarina na fase aguda da esquistossomíase.

OBJETIVOS

Gerais:

- Avaliar a ação da silimarina sobre a infecção aguda experimental murina pelo *Schistosoma mansoni*

Específicos:

- Avaliar a ação da silimarina sobre os parâmetros de morbidade – curva ponderal, taxa de sobrevivência e hepatoesplenomegalia – quando o fármaco é administrado na infecção esquistossomótica aguda.
- Avaliar o impacto da administração da silimarina utilizando diferentes esquemas posológicos em animais infectados pelo parasito.
- Avaliar a ação da silimarina sobre aspectos histopatológicos quanto à formação de granulomas hepáticos e a consequente fibrose na infecção esquistossomótica aguda.
- Verificar possíveis alterações nos aspectos parasitológicos nos animais infectados tratados ou não com silimarina.
- Verificar as alterações bioquímicas clínicas encontradas nos animais infectados e infectados e tratados com silimarina nos diferentes momentos da infecção.

MATERIAL E MÉTODOS

Fármaco

Para as administrações orais foi utilizado uma suspensão comercial de silimarina, LEGALON[®] - extrato seco do *Silybum marianum* (L.) Gaertn. (Laboratório ALTANA, Lote 704166, padronizada para 75 a 80,9% de silibina, silidianina, silicristina e isosilibina). Para administração intraperitoneal foi usado durante todos os ensaios a silimarina adquirida da Sigma-Aldrich (Lote # 107K0762, padronizada para 47% de silibina, determinada por CLAE).

Inoculações via oral

Sendo a via oral mais preconizada no homem pela sua conveniência, segurança e economia, foi utilizado em um primeiro momento, uma suspensão comercial de silimarina. Essa fase do experimento além de testar a via de administração, serviu também para avaliar a dose (2, 10, 50 e 250 mg/kg). Todos os animais foram tratados pela manhã, com intervalos de 24 horas entre as inoculações e receberam ao total 10 doses, respeitando nosso desenho experimental. Ao longo das inoculações foi feito um acompanhamento do peso dos animais e anotadas as datas das eventuais mortes que ocorreram nos diversos grupos. Estes dados serviram para a confecção da curva ponderal e de sobrevivência, respectivamente.

Inoculações via intraperitoneal

A via de administração intraperitoneal além de substituir classicamente a via intravenosa em camundongos tem sido a mais utilizada experimentalmente para a administração de silimarina em roedores.

Em função das características físico-químicas da silimarina, a diluição foi feita em carboximetilcelulose a 1% com “água para injetáveis”. Tal suspensão foi realizada visando diminuir a velocidade de deposição da silimarina, uma vez que há um aumento da viscosidade.

As injeções foram aplicadas pela manhã na cavidade peritoneal e o volume para as inoculações sempre foi de 100 µL.

As doses de silimarina usadas foram de 40, 200 e 1000 µg por animal, o que corresponde, respectivamente a 2, 10 e 50 mg/kg. Estas doses foram administradas em intervalos de 24 e 48 horas e o número de inoculações respeita cada desenho experimental. Ao longo das inoculações foram realizadas avaliações dos pesos dos animais e anotadas as

datas das eventuais mortes ou alterações comportamentais que ocorreram nos diversos grupos. Estes dados serviram para a confecção da curva ponderal e de sobrevivência.

Esterilidade dos materiais

Para as inoculações sempre foram utilizadas seringas descartáveis e as soluções com água e carboximetilcelulose, antes da diluição do fármaco, eram autoclavadas a 121°C por 15 minutos, sendo a manipulação destas soluções sempre realizada em capela de fluxo laminar para evitar contaminações. Após esse procedimento, os medicamentos foram acondicionados em tubos de ensaios previamente autoclavados, vedados, recobertos com papel alumínio e armazenados em local com temperatura controlada de $\pm 1^\circ\text{C}$. Para o controle microbiológico amostras dos produtos eram separadas e submetidas a culturas em caldo *Brain Heart Infusion* (BHI), a 37° C, por até 7 dias e em ágar sangue, a 35° C por 24 a 48 horas, na tentativa de isolar microorganismos presentes nos produtos a serem inoculados. Esta etapa foi elaborada em colaboração com o Laboratório de Bacteriologia Clínica do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da UFRJ.

Camundongos/Grupos

Para realização dos experimentos foram utilizadas fêmeas de camundongos isogênicos da linhagem BALB/c, de 7 a 8 semanas de idade, provenientes do Biotério Central do Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes da UFRJ. Os animais foram então mantidos nas instalações do biotério do Laboratório de Imunoparasitologia e Análises Toxicológicas, onde receberam alimentação balanceada e água *ad libitum*, com ambiente climatizado ($21 \pm 2^\circ\text{C}$) e condições padronizadas de luminosidade, ciclo claro-escuro de 10/14 h.

A gaiola dos camundongos, constituída de polipropileno, era recoberta com maravalha e a sua manutenção realizada 2 vezes por semana. Após o período de adaptação dos camundongos no biotério e antes da infecção pelo *S. mansoni*, os animais foram submetidos ao tratamento com MEBENDAZOL[®] (Laboratório EMS, Lote 189656) na apresentação de 20 mg/mL de suspensão, para evitar a interferência de outras infecções parasitárias no resultado final do experimento.

Foram criados grupos de animais que não sofreram inoculações, grupos tratados com silimarina nas doses indicadas e grupos inoculados apenas com o veículo (água para injeção e carboximetilcelulose a 1%).

Durante este trabalho foram realizados cinco lotes experimentais.

O presente projeto de pesquisa foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética de Uso

de Animais em Pesquisa (CEUA) do Centro de Ciências da Saúde da UFRJ, o número do protocolo aprovado é DBFCICB032.

Infecção

Os camundongos foram infectados com cercárias de *S. mansoni* (cepa BH - Belo Horizonte, Minas Gerais), oriundas de moluscos de *Biomphalaria glabrata*, previamente infectados, expostos à luz artificial, para obtenção das cercárias. Após a aquisição das cercárias fornecidas pela Dr^a. Lygia dos Reis Corrêa do *Laboratório de Malacologia* da Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, os camundongos eram expostos a um lava-pés, com objetivo de evitar possíveis interferentes – fezes e urina – no processo de fixação das cercárias. A infecção dos animais foi feita por via transcutânea em banho individual de água desclorada por 30-40 minutos com ± 80 cercárias vivas previamente quantificadas com o auxílio de lupa estereoscópica (Olympus SZ40). A carga parasitária média utilizada neste modelo experimental não altera sistematicamente a taxa de mortalidade dos animais, uma vez que o acompanhamento fora planejado para ser feito por 55 dias.

Peso dos camundongos

Os camundongos foram marcados e pesados duas vezes por semana durante os 55 dias do experimento para avaliação do percentual do peso corporal através da curva ponderal provocada pela infecção e/ou tratamento.

Primeiro Lote experimental

O primeiro lote experimental utilizou o Legalon[®] – suspensão comercial de silimarina administrada pela via oral. Nesta etapa foram analisadas diferentes concentrações de silimarina, respeitando o mesmo intervalo entre as doses. Os camundongos foram divididos em sete grupos, os grupos normais foram compostos por um número amostral de seis animais e os infectados apresentaram nove animais por grupo.

Os sete grupos do experimento com Legalon[®] eram:

- Normais (N) → animais não infectados e não tratados com Legalon[®].
- Normais + Legalon[®] 250 (N+Leg 250 -10D- 24h) → animais não infectados e tratados com 250 mg/kg de Legalon[®] a partir do 45º dia de infecção.

- Infectados (**I**) → animais infectados e não tratados com Legalon[®].
- Infectados + Legalon[®] 2 (**I+Leg 2 -10D- 24h**) → animais infectados e tratados com 2 mg/kg de Legalon[®] a partir do 45º dia de infecção.
- Infectados + Legalon[®] 10 (**I+Leg 10 -10D- 24h**) → animais infectados e tratados com 10 mg/kg de Legalon[®] a partir do 45º dia de infecção.
- Infectados + Legalon[®] 50 (**I+Leg 50 -10D- 24h**) → animais infectados e tratados com 50 mg/kg de Legalon[®] a partir do 45º dia de infecção.
- Infectados + Legalon[®] 250 (**I+Leg 250 -10D- 24h**) → animais infectados e tratados com 250 mg/kg de Legalon[®] a partir do 45º dia de infecção.

Todos os grupos tratados receberam dez doses do produto com intervalos de 24 horas entre as doses. A inoculação da suspensão foi feita através de sonda oral. Após o tratamento os animais foram submetidos a eutanásia (55º dia), sendo esta época o ápice da fase aguda da esquistossomíase experimental em murinos. Nesta etapa foram coletados: soro, baço, fígado e intestino. Com exceção dos soros que foram armazenados em *pools* de três animais dos respectivos grupos, todos os demais materiais foram processados e estocados individualmente. A Figura 6 mostra esquematicamente o desenho experimental com Legalon[®].

utilizados mais dois grupos controles (Infectado e Normal) inoculados apenas com o veículo do produto.

Além disso, com o objetivo de avaliar se o intervalo de aplicação do fármaco pode ter influências sobre a infecção, foi adicionado neste lote experimental um grupo infectado tratado com intervalo diferente do utilizado anteriormente (24 horas). Para este grupo foi respeitado um período de 48h entre uma aplicação e outra, sendo utilizado o mesmo número de inoculações (10 doses). A concentração de 10 mg/kg de silimarina foi escolhida, visto que esta promoveu no experimento anterior uma diferença significativa na hepatomegalia. Para este grupo também foi criado um grupo controle normal inoculado com as mesmas condições.

Os camundongos foram divididos em doze grupos, cada grupo era composto por um número amostral de seis animais.

Os doze grupos do segundo lote experimental eram:

- Normais (**N**) → animais não infectados e não tratados com silimarina (ip).
- Normais + Carboximetilcelulose 1% (**N+CMC -10D- 24h**) → animais não infectados e injetados com carboximetilcelulose a 1% (em solução aquosa) a partir do 45° dia de infecção com intervalos de 24 horas entre as doses.
- Normais + Silimarina 2 (**N+Sil 2 -10D- 24h**) → animais não infectados e tratados com 2 mg/kg de silimarina (ip) a partir do 45° dia de infecção com intervalos de 24 horas entre as doses.
- Normais + Silimarina 10 (**N+Sil 10 -10D- 24h**) → animais não infectados e tratados com 10 mg/kg de silimarina (ip) a partir do 45° dia de infecção com intervalos de 24 horas entre as doses.
- Normais + Silimarina 50 (**N+Sil 50 -10D- 24h**) → animais não infectados e tratados com 50 mg/kg de silimarina (ip) a partir do 45° dia de infecção com intervalos de 24 horas entre as doses.
- Normais + Silimarina 10 (**N+Sil 10 -10D- 48h**) → animais não infectados e tratados com 10 mg/kg de silimarina (ip) a partir do 45° dia de infecção com intervalos de 48 horas entre as doses.
- Infectados (**I**) → animais infectados e não tratados com Silimarina.
- Infectados + Carboximetilcelulose 1% (**I+CMC -10D- 24h**) → animais infectados e injetados com carboximetilcelulose a 1% (em solução aquosa) com intervalos de 24

horas entre as doses.

- Infectados + Silimarina 2 (**I+Sil 2 -10D- 24h**) → animais infectados e tratados com 2 mg/kg de silimarina (ip) a partir do 45º dia de infecção com intervalos de 24 horas entre as doses.
- Infectados + Silimarina 10 (**I+Sil 10 -10D- 24h**) → animais infectados e tratados com 10 mg/kg de Silimarina (ip) a partir do 45º dia de infecção com intervalos de 24 horas entre as doses.
- Infectados + Silimarina 50 (**I+Sil 50 -10D- 24h**) → animais infectados e tratados com 50 mg/kg de silimarina (ip) a partir do 35º dia de infecção com intervalos de 24 horas entre as doses.
- Infectados + Silimarina 10 (**I+Sil 10 -10D- 48h**) → animais infectados e tratados com 10 mg/kg de silimarina (ip) a partir do 35º dia de infecção com intervalos de 48 horas entre as doses.

Os grupos que receberam silimarina e carboximetilcelulose foram inoculados ao total com 10 doses, este parâmetro de controle foi utilizado para que não houvesse a interferência do número de inoculações na avaliação do efeito da silimarina sobre a lesão hepática provocada pelo parasito. Os grupos normais inoculados com silimarina e carboximetilcelulose foram introduzidos como parâmetro de controle, para avaliar se estes produtos poderiam provocar alguma alteração nestes animais. O material coletado para análise foi o mesmo do experimento anterior. Com exceção dos soros que foram armazenados em *pools* de três animais dos respectivos grupos, todos os demais materiais foram processados e estocados individualmente. A Figura 7 ilustra esquematicamente o modelo experimental utilizado nesta etapa.

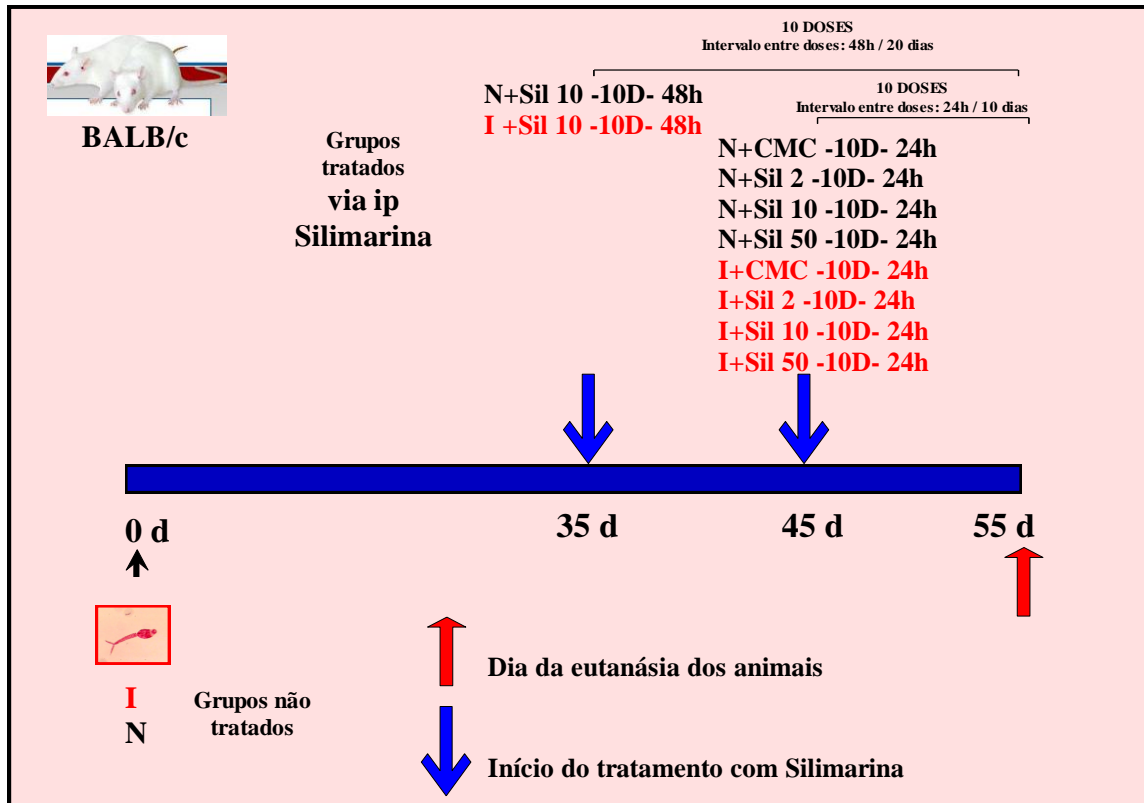


Figura 7 - Desenho do segundo lote experimental. Diagrama que mostra a distribuição dos grupos, o esquema de inoculações e o ponto de eutanásia dos animais durante o segundo lote experimental. Os animais foram infectados no dia zero (0 d), com exceção dos grupos (N), (N+CMC -10D- 24h), (N+Sil 2 -10D- 24h), (N+Sil 50 -10D- 24h) e (N+Sil 10 -10D- 48h). Os grupos (N+Sil 10 -10D- 48h) e (I+Sil 10 -10D- 48h) inoculados a partir do 35º dia do experimento (35 d) tiveram intervalos de 48 horas entre uma dose e outra, completando ao final deste 10 inoculações em um total de 20 dias de tratamento. Contudo, nos grupos (N+CMC -10D- 24h), (N+Sil 2 -10D- 24h), (N+Sil 10 -10D- 24h) e (N+Sil 50 -10D- 24h), assim como os grupos (I+CMC -10D- 24h), (I+Sil 2 -10D- 24h), (I+Sil 10 -10D- 24h) e (I+Sil 50 -10D- 24h) as inoculações tiveram início a partir do 45º dia do experimento (45 d), completando 10 inoculações em um total de 10 dias de tratamento com intervalos de 24 horas entre as doses. Os animais dos grupos I e N não receberam a administração do fármaco ou veículo.

Terceiro Lote Experimental

A etapa anterior tinha como finalidade avaliar uma via de inoculação que não apresentasse interferência sobre os resultados. No entanto, este terceiro lote experimental foi realizado para confirmar os resultados obtidos do desenho experimental anterior no qual utilizou a via de administração intraperitoneal. Além disso, os intervalos de 24h entre as doses, utilizado no experimento anterior, foram substituídos por 48h, para avaliar se este o intervalo de aplicação poderia ter influências sobre os efeitos da silimarina utilizadas nesta infecção.

Os camundongos foram divididos em oito grupos, cada grupo era composto por um

número amostral de sete animais. Foram utilizados, além dos grupos (Normal e Infetado), mais dois grupos controles, sendo um grupo Normal inoculado com a maior concentração de silimarina (50 mg/kg) e um grupo Infetado inoculado apenas com o veículo (CMC 1%). Os demais grupos, todos infectados, foram utilizados para avaliação das variáveis posológicas na aplicação da silimarina nesta infecção.

Os oito grupos do terceiro lote experimental eram:

- Normais (**N**) → animais não infectados e não tratados com Silimarina (ip).
- Normais + Silimarina 50 (**N+Sil 50 -10D- 48h**) → animais não infectados e tratados com 50 mg/kg de Silimarina (ip) a partir do 35º dia de infecção com intervalos de 48 horas entre as doses.
- Infectados (**I**) → animais infectados e não tratados com Silimarina.
- Infectados + Carboximetilcelulose 1% (**I+CMC -10D- 48h**) → animais infectados e injetados com carboximetilcelulose a 1% (em solução aquosa) com intervalos de 48 horas entre as doses.
- Infectados + Silimarina 2 (**I+Sil 2 -10D- 48h**) → animais infectados e tratados com 2 mg/kg de Silimarina (ip) a partir do 35º dia de infecção com intervalos de 48 horas entre as doses.
- Infectados + Silimarina 10 (**I+Sil 10 -10D- 48h**) → animais infectados e tratados com 10 mg/kg de Silimarina (ip) a partir do 35º dia de infecção com intervalos de 48 horas entre as doses.
- Infectados + Silimarina 50 (**I+Sil 50 -10D- 48h**) → animais infectados e tratados com 50 mg/kg de Silimarina (ip) a partir do 35º dia de infecção com intervalos de 48 horas entre as doses.
- Infectados + Silimarina 10 (**I+Sil 10 -10D- 24h**) → animais infectados e tratados com 10 mg/kg de Silimarina (ip) a partir do 45º dia de infecção com intervalos de 24 horas entre as doses.

Os grupos que receberam silimarina e carboximetilcelulose foram inoculados ao total com 10 doses (-10D-), este parâmetro de controle foi utilizado para que não houvesse a interferência do número de inoculações na avaliação da concentração de silimarina, já que esta variável pode influenciar o resultado obtido do efeito da silimarina frente as lesões provocadas pela infecção, ou até mesmo uma possível influência da silimarina no

desenvolvimento do parasito, que ocorre entre a 5^o e 6^o semana de infecção (PEARCE e MACDONALD, 2002).

Foi adicionado apenas um grupo com intervalo de aplicação de 24 horas, o (I+Sil 10 - 10D- 24h). Este grupo permitiu avaliar sob as mesmas variáveis experimentais a efetividade no intervalo terapêutico, assim como o papel da silimarina quando o início do tratamento se dá em diferentes momentos da oviposição. Visto que as inoculações com intervalos de 48 horas devem ter início após o 35^o dia de infecção para que se possa completar 10 doses, enquanto o grupo tratado com intervalo de 24 horas deve ter o início do tratamento após o 45^o dia de infecção, para que também possa completar 10 doses. Após a eutanásia o material coletado para análise foi o mesmo do experimento anterior. A Figura 8 mostra esquematicamente o descrito acima.

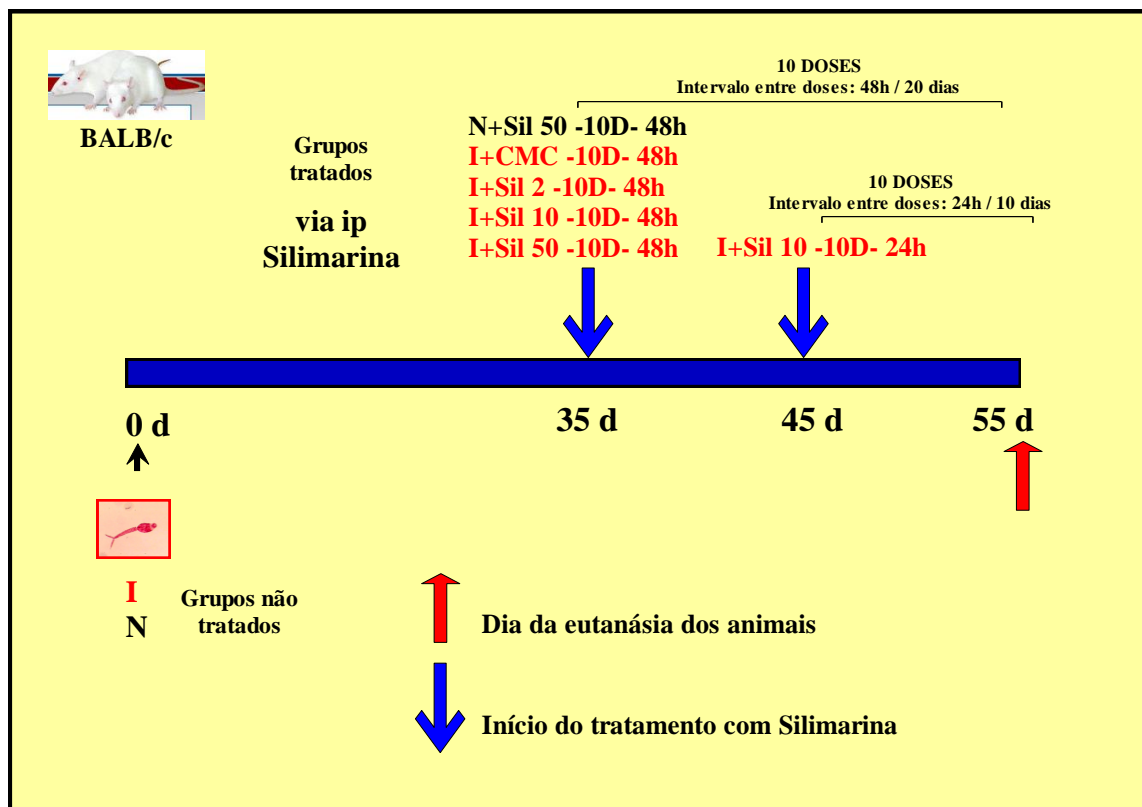


Figura 8 - Desenho do terceiro lote experimental. Diagrama que mostra a distribuição dos grupos, o esquema de inoculações e o ponto de eutanásia dos animais durante o terceiro lote experimental. Os animais foram infectados no dia zero (0 d), com exceção dos grupos (N) e (N+Sil 50 -10D- 48h). Os grupos (N+Sil 50 -10D- 48h), (I+CMC -10D- 48h), (I+Sil 2 -10D- 48h), (I+Sil 10 -10D- 48h) e (I+Sil 50 -10D- 48h) inoculados a partir do 35^o dia do experimento (35 d) tiveram intervalos de 48 horas entre uma dose e outra, completando ao final deste 10 inoculações em um total de 20 dias de tratamento. Contudo, no grupo (I+Sil 10 -10D- 24h), a inoculação foi iniciada a partir do 45^o dia do experimento (45 d), completando 10 inoculações em um total de 10 dias de tratamento com intervalos de 24 horas entre as doses. Os animais dos grupos I e N não receberam a administração do fármaco ou veículo.

Quarto Lote Experimental

Após a análise do intervalo de aplicação de silimarina foi avaliado o efeito deste produto com tratamentos mais prolongados. Deste modo, o quarto lote experimental buscou avaliar a possibilidade de reduções mais significativas sugestivas de menor morbidade. Além disso, o início do tratamento em diferentes períodos da infecção possibilitou correlacionar uma eventual interferência da silimarina, no desenvolvimento do parasito e até mesmo na capacidade da oviposição. Os grupos infectados e tratados com silimarina receberam diferentes esquemas posológicos com inoculações de 5, 10, 20 e 25 doses. Já os grupos controles Normal e Infectado, injetados com carboximetilcelulose 1% (N+CMC -20D- 48h), (I+CMC -20D- 48h), receberam 20 doses, assim como o grupo Infectado tratado com silimarina na concentração de 2mg/kg (I+Sil 2 -20D- 48h).

O intervalo de 48h entre as doses foi utilizado em todos os grupos inoculados, com exceção do (I+Sil 2 -20D- 24h). Os camundongos foram divididos em nove grupos, cada grupo era composto por um número amostral de nove animais.

Os nove grupos do quarto lote experimental eram:

- Normais (**N**) → animais não infectados e não tratados com Silimarina (ip).
- Normais + Carboximetilcelulose 1% (**N+CMC -20D- 48h**) → animais não infectados e injetados com carboximetilcelulose a 1% (em solução aquosa) a partir do 45° dia de infecção com intervalos de 48 horas entre as doses.
- Infectados (**I**) → animais infectados e não tratados com Silimarina.
- Infectados + Carboximetilcelulose 1% (**I+CMC -20D- 48h**) → animais infectados e injetados com carboximetilcelulose a 1% (em solução aquosa) a partir do 45° dia de infecção com intervalos de 48 horas entre as doses.
- Infectados + Silimarina 10 (**I+Sil 10 -5D- 48h**) → animais infectados e tratados com 10 mg/kg de Silimarina (ip) a partir do 35° dia de infecção com intervalos de 48 horas entre as doses.
- Infectados + Silimarina 10 (**I+Sil 10 -10D- 48h**) → animais infectados e tratados com 10 mg/kg de Silimarina (ip) a partir do 35° dia de infecção com intervalos de 48 horas entre as doses.
- Infectados + Silimarina 10 (**I+Sil 10 -20D- 48h**) → animais infectados e tratados com 10 mg/kg de Silimarina (ip) a partir do 35° dia de infecção com intervalos de 48

horas entre as doses.

- Infectados + Silimarina 10 (**I+Sil 10 -25D- 48h**) → animais infectados e tratados com 10 mg/kg de Silimarina (ip) a partir do 35º dia de infecção com intervalos de 48 horas entre as doses
- Infectados + Silimarina 2 (**I+Sil 2 -20D- 24h**) → animais infectados e tratados com 2 mg/kg de Silimarina (ip) a partir do 45º dia de infecção com intervalos de 24 horas entre as doses.

O esquema abaixo (Figura 9) ilustra o modelo experimental utilizado nesta etapa.

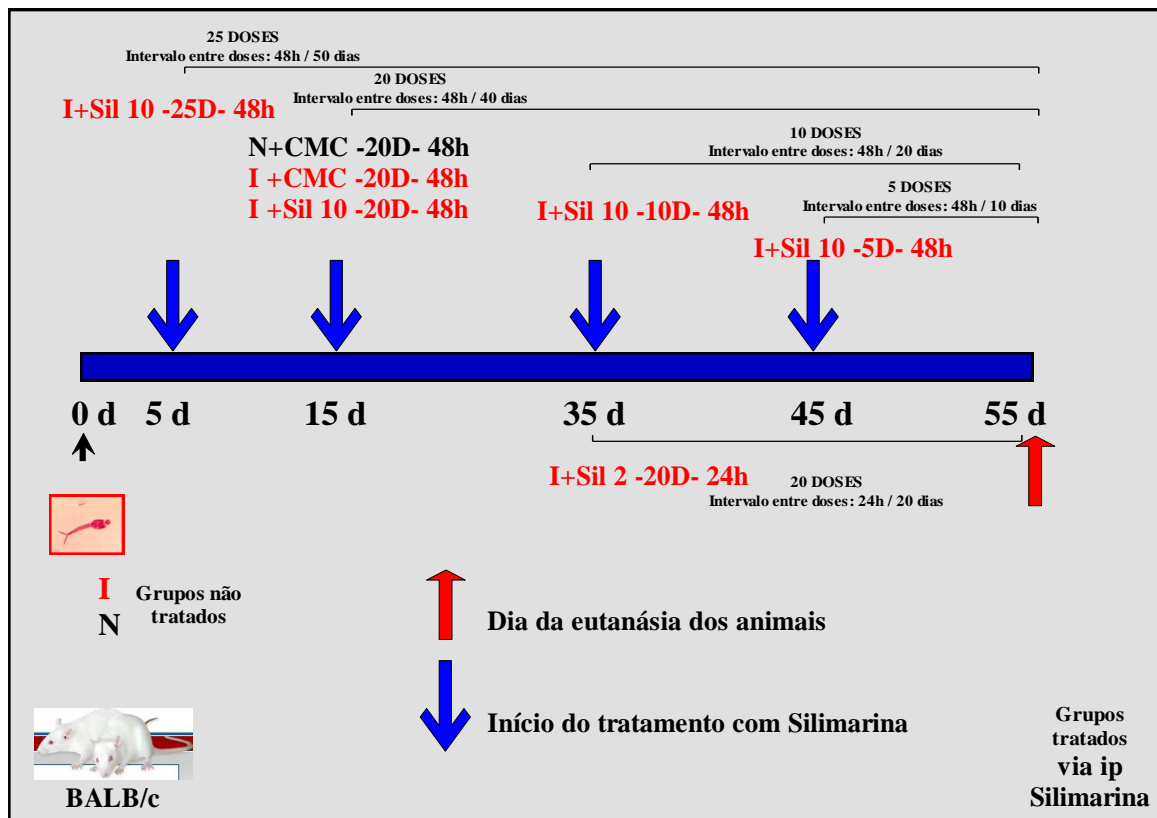


Figura 9 - Desenho do quarto lote experimental. Diagrama que mostra a distribuição dos grupos, o esquema de inoculações e o ponto de eutanásia dos animais durante o quarto lote experimental. Os animais foram infectados no dia zero (0 d), com exceção dos grupos (N) e (N+CMC -20D- 48h). Os grupos (I+Sil 10 -25D- 48h), (I+Sil 10 -20D- 48h), (I+Sil 10 -10D- 48h), (I+Sil 10 -5D- 48h) foram inoculados com intervalos de 48 horas entre uma dose e outra, iniciando-se o tratamento a partir do 5º, 15º, 35º e 45º dia do experimento, respectivamente. Contudo, no grupo (I+Sil 2 -20D- 24h) as inoculações tiveram início a partir do 35º dia do experimento (35 d), completando 20 inoculações com intervalos de 24 horas entre as doses. Os animais dos grupos I e N não receberam a administração do fármaco ou veículo.

Eutanásia

Os animais foram submetidos à eutanásia no 55º dia de infecção, visto que a carga parasitária utilizada no modelo experimental murino representa nesta fase o ápice da forma aguda da esquistossomíase, caracterizando alterações patológicas fundamentais, devido à presença de ovos nos tecidos que geram uma forte reação granulomatosa ao redor destes. A eutanásia dos camundongos segue a Resolução nº 714, de 20 de junho de 2002, do Conselho Federal de Medicina Veterinária – CFMV (CONSELHO, 2002), sendo assim, os camundongos foram anestesiados em câmara contendo éter etílico seguida de deslocamento cervical. Com exceção dos soros que foram armazenados em *pools* de três animais dos respectivos grupos, e extraídos através da punção do plexo venoso retro-orbital, todos os demais materiais foram processados e estocados individualmente.

Pesagem dos órgãos

Após a eutanásia, os camundongos foram necropsiados para análise macroscópica, os baços, intestinos e fígado foram removidos e pesados. O peso de todos os órgãos foram registrados inteiros, em seguida o fígado foi fragmentados em três partes padronizadas para avaliação da quantificação de ovos no tecido, dosagem de hidroxiprolina hepática e histologia.

Quantificação de ovos nos tecidos

A digestão do tecido hepático, esplênico e intestinal foi realizada visando quantificar a carga parasitária entre os grupos através da determinação do número de ovos presentes nos tecidos analisados. Para esta avaliação, foi utilizada a técnica descrita por (CHEEVER, 1968a) que consiste em manter os tecidos individualmente em solução aquosa de KOH 4% em temperatura ambiente por 12 horas e com posterior incubação em banho-maria a 37° C por aproximadamente 1 hora para que ocorra a digestão destes.

Processamento histológico

Para a avaliação morfológica dos granulomas foram realizados ensaios histopatológicos a partir dos fragmentos padronizados dos fígados dos camundongos. Os materiais selecionados para histologia foram identificados e acondicionados em cassetes, em seguida preservados em solução de formol tamponado. Após 24 horas procedeu-se ao emblocamento, corte e coloração pela Hematoxilina-Eosina (HE). Após o preparo das lâminas foram avaliadas as áreas de infiltrado celular inflamatório que apresentavam um ovo central

de *Schistosoma mansoni*, como representado na Figura 10. Para a avaliação destes granulomas hepáticos foi utilizado microscopia de campo claro seguida de captura das imagens, com o auxílio de um microscópio NIKON ECLIPSE E-200[®] acoplado a uma vídeo-câmera digital COOLPIX 995[®] (NIKON), o processamento das imagens foi realizado com o auxílio do programa Scion Image versão 4b (Scioncorp - <http://www.scioncorp.com>).

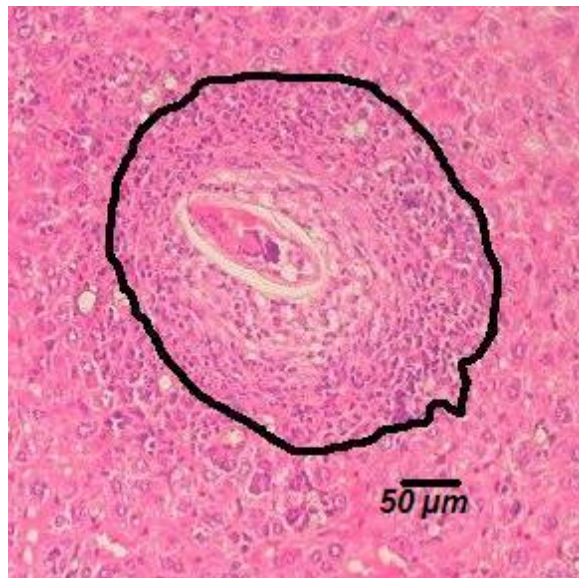


Figura 10 - Modelo da avaliação do infiltrado inflamatório granulomatoso periovular. Corte histológico visualizando um granuloma periovular do tecido hepático corado com hematoxilina-eosina (HE) e mensurado com o auxílio do programa Scion Image versão 4b.

Dosagem de hidroxiprolina hepática

A dosagem do aminoácido hidroxiprolina foi realizada visando quantificar a deposição de fibrose hepática entre os grupos, através da oxidação do aminoácido pela cloramina-T – em tampão (pH 6,0) contendo ácido cítrico, ácido acético, acetado de sódio e hidróxido de sódio – e da união do cromogeneo formado com o aldeído de Ehrlich em ácido perclórico 60%, na proporção de 1:2. Para esta avaliação foi utilizada a técnica prescrita por (STEGEMANN e STALDER, 1967), que consiste em desidratar o fígado com acetona por 24 horas, hidrolisar este material com ácido clorídrico (6N) a 107° C por 16 horas, subsequentemente remover o ácido com um rotavapor e ressuspender em tampão para adicionar a solução de cloramina-T e

após 20 minutos a solução de aldeído/ácido perclórico para posteriormente incubar em banho-maria a 60° C por 15 minutos. A leitura foi realizada com espectrofotômetro em absorvância de 550nm.

Avaliação estatística

A avaliação estatística dos dados foi feita utilizando-se o programa Excel[®] versão 2003 (Microsoft Inc.). Foram calculadas as médias e os desvios padrão. A comparação entre os grupos foi avaliada pelo teste *t* de Student não pareado. Os valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

RESULTADOS

Este trabalho avaliou o efeito da silimarina na infecção experimental pelo *Schistosoma mansoni* em camundongos isogênicos (BALB/c), sobre os parâmetros parasitológicos, bioquímicos e histopatológicos na fase aguda desta infecção. Os resultados obtidos foram apresentados conforme cada lote experimental. Ao total foram realizados quatro experimentos em tempos distintos, sendo avaliado o paralelismo entre os grupos de cada lote.

Primeiro Lote Experimental (administração oral)

Visando avaliar alguma possível atividade da silimarina sobre a morbidade da infecção experimental pelo *Schistosoma mansoni* foi realizado um ensaio piloto utilizando uma suspensão oral de silimarina comercial - LEGALON[®]. A importância na avaliação de uma via de administração que não seja agressiva a longo ou médio prazo e principalmente que não tenha influência nas alterações anatomopatológicas desencadeadas pela infecção esquistossomótica no modelo murino, foi avaliada. A utilização de sonda oral para a administração da silimarina no decorrer desta infecção possibilitou uma avaliação quanto ao desconforto desta via no modelo experimental utilizado.

Neste lote experimental foram analisados: a variação percentual do peso corporal dos camundongos, curva de sobrevivência dos animais, a distribuição de ovos no tecido hepático e o índice dos órgãos (fígado e baço).

Percentual do peso corporal dos camundongos

Com o objetivo de verificar possíveis efeitos do Legalon[®] sobre as alterações na morbidade, como crescimento e desenvolvimento dos camundongos foi realizado, duas vezes por semana, um acompanhamento do peso corporal durante os 55 dias de duração do experimento. Na Figura 11 esta ilustrada a curva ponderal de todos os grupos, e pode-se observar que os grupos infectados apresentaram um déficit no peso corporal a partir do 40^o DPI, sendo este déficit mais acentuado nos camundongos infectados que receberam tratamento com 250 mg/kg de Legalon[®] em intervalos de 24h entre as doses (I + Leg 250 -10D- 24h), o mesmo observado no grupo normal controle (N + Leg 250 -10D- 24h). As alterações orgânicas observadas nos grupos tratados com 250 mg/kg não parecem ser atribuídas apenas a agressividade das constantes inoculações, mas também ao volume

inoculado (0,5 μ L).

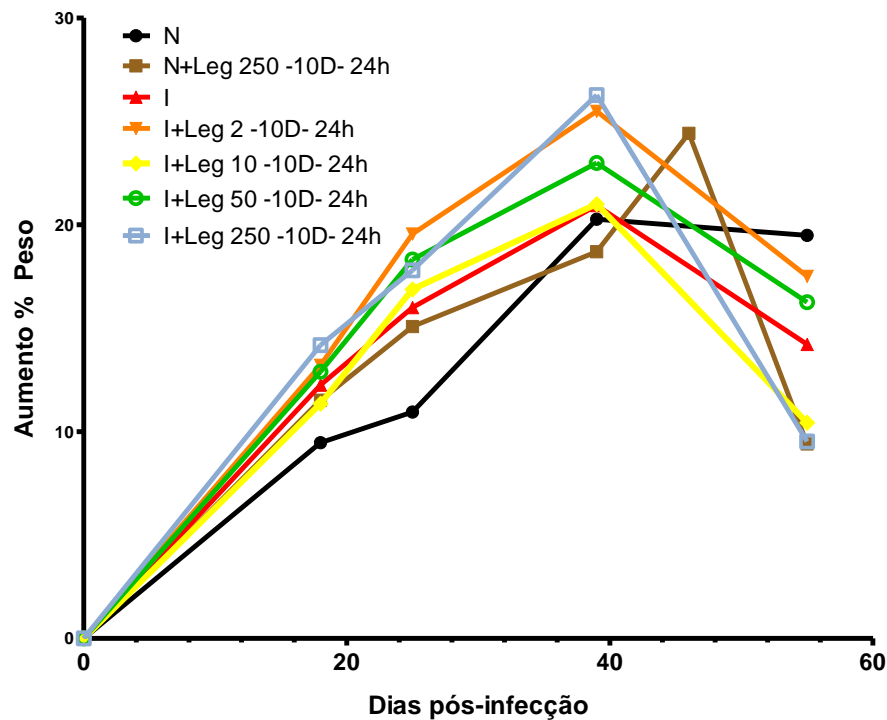


Figura 11 - Curva ponderal (1º Lote). Médias percentuais da oscilação do peso corporal dos grupos de camundongos normais e infectados com *S. mansoni*. O aumento do percentual do peso corporal até o 40º DPI foi normal para todos os grupos. A curva foi traçada a partir da média dos grupos, o “n” para os grupos normais foi 6 enquanto os grupos infectados apresentavam (n=9).

Curva de sobrevivência

Independente da data de eutanásia pré-definida (55 DPI) foram registradas as mortes dos camundongos ao longo do experimento, incluindo alterações comportamentais dos mesmos. Ao analisar os resultados obtidos (Figura 12) pode-se notar que os grupos tratados através de sonda oral com Legalon® apresentaram uma mortalidade de aproximadamente 50%. Esta mortalidade foi observada em todos os grupos infectados e tratados, sendo assim, a via de administração oral neste desenho experimental parece provocar alterações orgânicas, podendo deste modo, apresentar influência sobre os resultados.

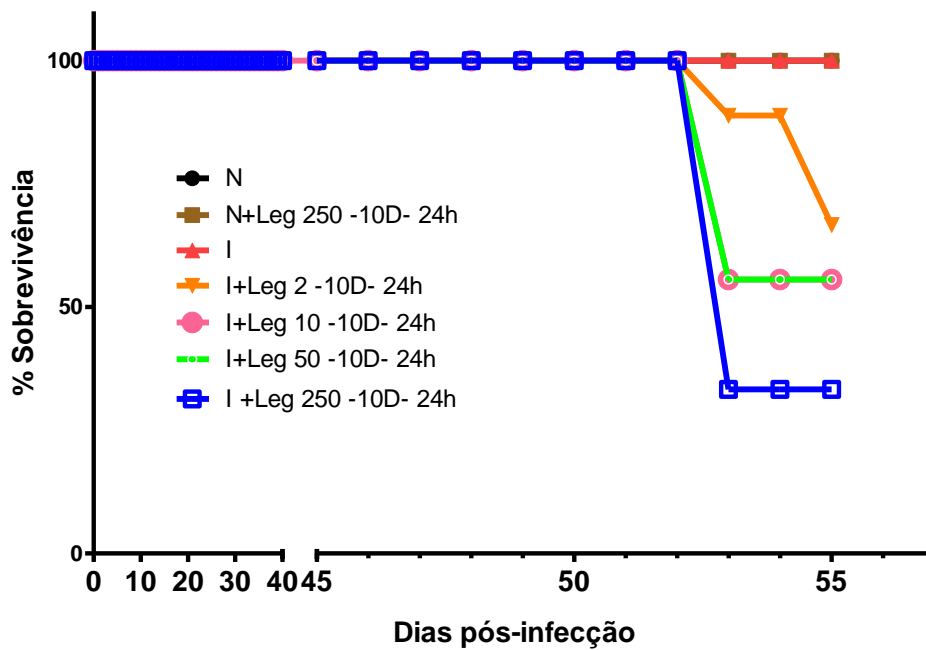


Figura 12 - Curva de sobrevivência (1º Lote). Acompanhamento, durante os 55 dias de infecção, dos percentuais de sobrevivência. Alterações comportamentais também foram consideradas. O “n” para os grupos normais foi 6, enquanto os grupos infectados apresentavam (n=9).

Distribuição de ovos nos tecidos

Com o objetivo de verificar a carga parasitária foi realizado uma quantificação de ovos presentes no tecido hepático, através da digestão deste tecido em KOH 4% como descrito por (CHEEVER, 1968a). Na Figura 13 pode-se observar que não há diferença significativa de carga parasitária entre os grupos infectados ($p > 0,05$), possibilitando a avaliação comparativa entre todos os grupos infectados já que estes apresentam a mesma carga parasitária.

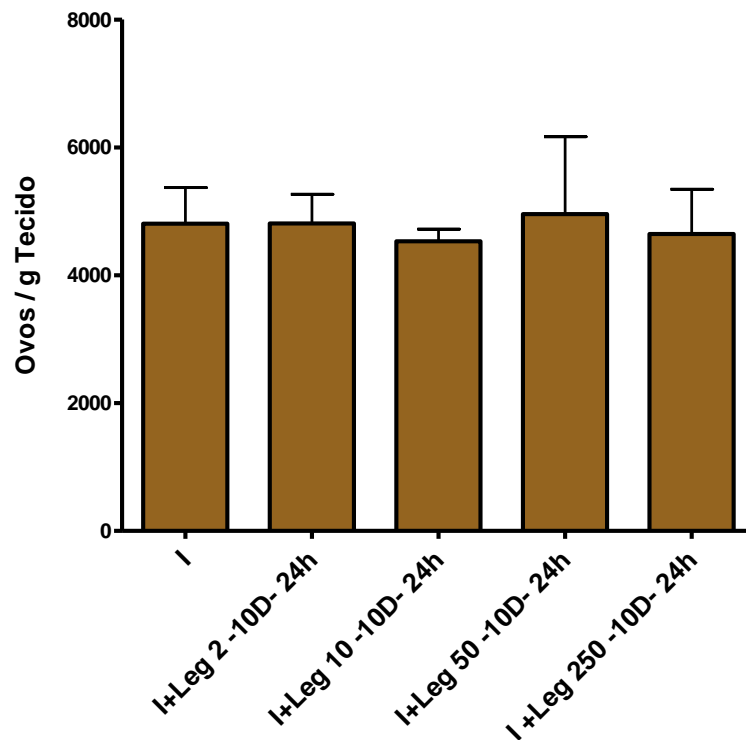


Figura 13 - Ovos no tecido hepático (1º Lote). Médias e erros padrões do número de ovos de *Schistosoma mansoni* presente no tecido hepático. Devido a mortalidade ao longo do experimento o número amostral para esta avaliação foi (I = 9), (I+Leg 2 -10D- 24h = 6), (I+Leg 10 -10D- 24h = 5), (I+Leg 50 -10D- 24h = 5), (I+Leg 250 -10D- 24h = 3). A comparação entre os grupos foi avaliada pelo teste t de Student não pareado.

Média do peso dos Órgãos

Com o objetivo de avaliar o grau de alterações hepáticas e esplênicas foram realizadas pesagens dos mesmos em todos os grupos. Estas pesagens foram correlacionadas com o peso corporal de cada camundongo respectivamente, para obtenção do índice hepático e esplênico, conforme ilustrado na Figura 14. Pode-se notar que o tratamento utilizando concentrações mais baixa do produto (2 e 10 mg/kg) proporcionaram redução na hepatomegalia (Figura 14 A). Embora haja uma pequena diminuição na esplenomegalia dos grupos tratados, esta não é significativa (Figura 14 B).

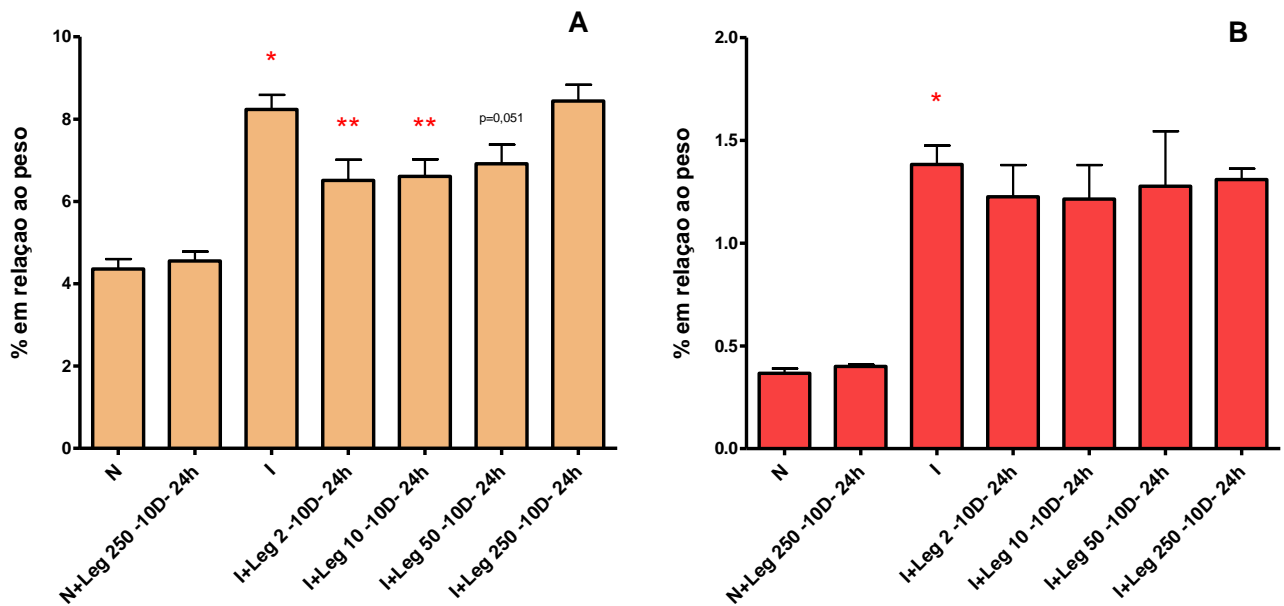


Figura 14 - Índices fígado e baço (1º Lote). O gráfico A e B representam respectivamente os índices do fígado e baço. O número amostral para esta avaliação nos grupos normais foi $n = 6$, enquanto os demais grupos foram (I = 9), (I+Leg 2 -10D- 24h = 6), (I+Leg 10 -10D- 24h = 5), (I+Leg 50 -10D- 24h = 5), (I+Leg 250 -10D- 24h = 3). A comparação entre os grupos foi avaliada pelo teste t de Student não pareado, sendo expressa a barra de erro padrão das médias. Os valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos. * $p < 0,05$ se refere a diferença entre os grupos N e I. ** $p < 0,05$ se refere a diferença entre os grupos infectado não tratado (I) e os grupos infectados tratados. O valor de “p” expresso no gráfico se refere a diferença entre os grupos (I) e o (I+Leg 50 -10D- 24h).

Segundo Lote Experimental (administração intraperitoneal)

Frente aos resultados obtidos no experimento anterior e dadas as dificuldades da utilização, neste desenho experimental, de inúmeras inoculações do Legalon[®] utilizando a via oral, foi realizada a avaliação de uma via de administração diferente desta. A via escolhida para a administração do fármaco foi a intraperitoneal, onde há uma rápida absorção do produto devido a localização dos vasos mesentéricos e da veia porta. Para a realização da avaliação da via intraperitoneal foi utilizado o mesmo número de inoculações (10 doses) do experimento anterior, mantendo-se o intervalo de aplicação de 24 horas entre as doses. No entanto, foi adicionado neste desenho experimental grupos normais controles para cada grupo infectado tratado. Outro diferencial utilizado neste desenho experimental foi a avaliação de um grupo inoculado com um novo esquema de tratamento (48 horas).

Todos os animais foram inoculados, alternadamente, no quadrante inferior direito e esquerdo. O ângulo utilizado para as injeções era de 45° e sempre após a penetração da agulha era realizado uma aspiração, com o objetivo de evitar uma possível agressão aos vasos sanguíneos.

Devido a baixa solubilidade da silimarina, foi utilizado para o preparo deste produto carboximetilcelulose em água para injeção, com o objetivo de diminuir a velocidade de sedimentação do fármaco, como já utilizado por Lin, Tsai e Yen (1995) e Huber e colaboradores (2008). Para garantir a esterilização do produto final a ser inoculado foi realizado autoclavação de todos os materiais utilizados, com exceção da silimarina. Após a obtenção das preparações a serem inoculadas (silimarina em carboximetilcelulose e água para injeção), amostras dos produtos foram separadas aleatoriamente e submetidas a culturas de caldo *Brain Heart Infusion* (BHI) e ágar sangue, para realização dos testes de esterilidade. Nos resultados obtidos não foram observados a presença de microorganismos nos produtos a serem inoculados, este resultado foi observado em todos os demais lotes experimentais.

Para este ensaio foram analisados: a variação percentual do peso corporal dos camundongos, curva de sobrevivência dos animais, a distribuição de ovos no tecido hepático, índices dos pesos dos órgãos (fígado e baço), tamanho dos granulomas e dosagem de hidroxiprolina no tecido hepático.

Percentual do peso corporal dos camundongos

Com o objetivo de verificar possíveis efeitos da silimarina sobre as alterações na morbidade, como crescimento e desenvolvimento dos camundongos foi realizado, duas vezes por semana, um acompanhamento do peso corporal durante os 55 dias de duração do experimento. Na Figura 15 esta ilustrada a curva ponderal de todos os grupos, e pode-se observar que os grupos infectados apresentaram um déficit no peso corporal a partir do 40º DPI, o mesmo não é observado nos grupos normais. Através destes dados pode-se observar que as constantes aplicações intraperitoneais não apresentam o mesmo grau de agressividade (estresse), quando comparado com o experimento anterior no qual foi utilizada a via oral. Desde modo a via intraperitoneal não parece ter influência negativa sobre os resultados, já que não foram observadas alterações orgânicas nos grupos normais tratados.

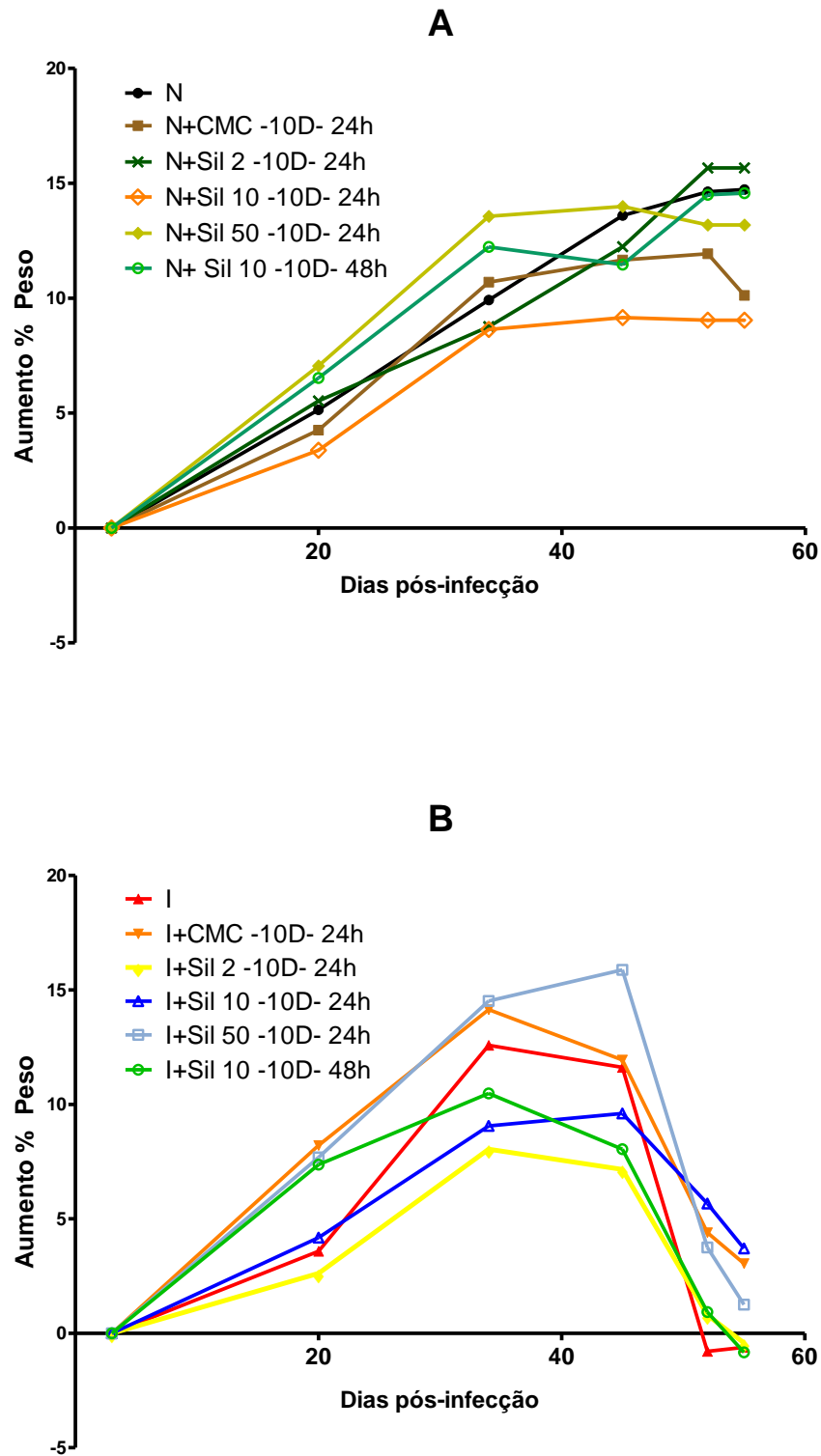


Figura 15 - Curva ponderal dos grupos Normais e Infectados (2º Lote). O gráfico A e B representam respectivamente as médias percentuais da oscilação do peso corporal dos grupos de camundongos normais e infectados com *S. mansoni*. Todos os grupos eram compostos com n=6. Os grupos normais inoculados e não inoculados apresentaram desenvolvimento semelhantes (Figura 15 A), assim como todos os grupos infectados tratados ou não, que apresentam um déficit no desenvolvimento a partir do 40º DPI (Figura 15 B).

Curva de sobrevivência

Independente da data de eutanásia pré-definida (55 DPI) foi realizado o acompanhamento de alterações comportamentais assim como de eventuais mortes dos camundongos ao longo do experimento. Ao analisar os resultados obtidos (Figura 16), observa-se que não houve mortalidade no decorrer do experimento, confirmando que a via intraperitoneal não parece interferir sobre os resultados, já que não foram observadas alterações comportamentais, assim como mortalidade ao longo deste experimento.

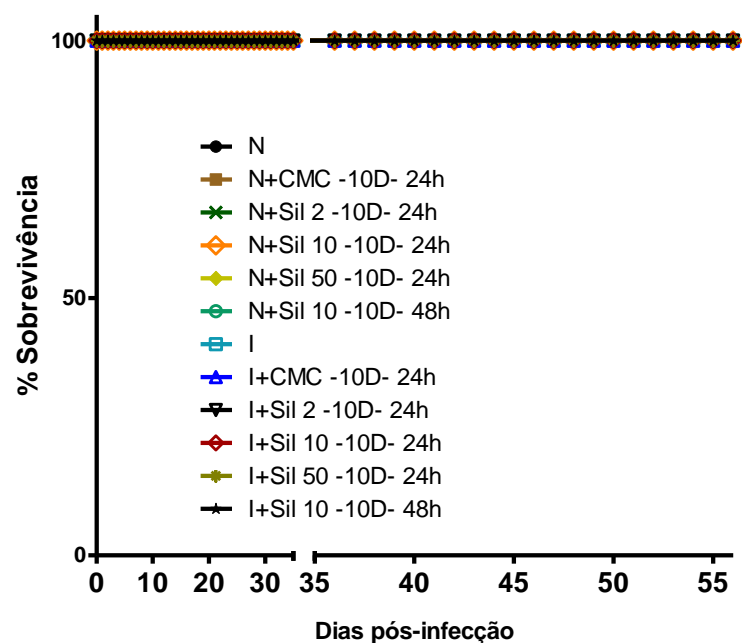


Figura 16 - Curva de sobrevivência (2º Lote). Acompanhamento, durante os 55 dias de infecção, dos percentuais de sobrevivência. Alterações comportamentais também foram consideradas. O “n” para todos os grupos foi 6.

Distribuição de ovos nos tecidos

Com o objetivo de verificar a carga parasitária foi realizado uma quantificação de ovos presentes no tecido hepático, como previamente descrito no Material e Métodos através do ensaio de quantificação de ovos nos tecidos. Na Figura 17 pode-se observar que mesmo com o aumento do número de ovos neste lote experimental, quando comparado com o experimento anterior, não há diferença significativa de carga parasitária entre os grupos infectados, possibilitando a avaliação comparativa entre todos os grupos infectados já que estes apresentam a mesma carga parasitária.

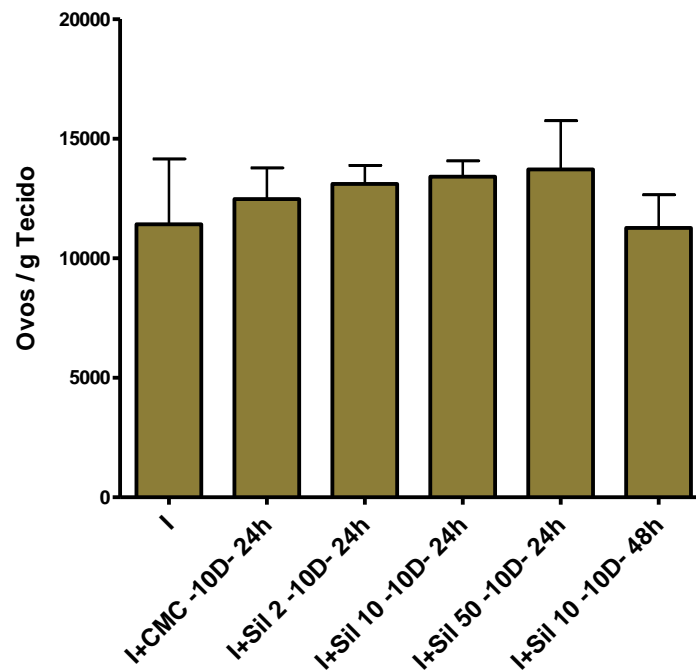


Figura 17 - Ovos no tecido hepático (2º Lote). Médias e erros padrões do número de ovos de *Schistosoma mansoni* presente no tecido hepático. A comparação entre os grupos foi avaliada pelo teste *t* de Student não pareado. O “n” para todos os grupos foi 6.

Média do peso dos Órgãos

A Figura 18 permite observar o efeito da silimarina sobre a evolução do quadro patológico, já que a hepatomegalia (gráfico A) e a esplenomegalia (gráfico B) são alterações relevantes na esquistossomíase.

Através dessas avaliações pode-se observar que as inoculações utilizando silimarina ou apenas o veículo (CMC), nos grupos normais, não foram responsáveis por promover alterações no índice hepático (Figura 18 A). No entanto, pode-se observar uma redução da hepatomegalia nos grupos infectados tratados com silimarina. Esta redução foi significativa apenas nos grupos (I+Sil 2 -10D- 24h), (I+Sil 10 -10D- 48h) e (I+Sil 50 -10D- 24h).

Apesar da redução na hepatomegalia, a silimarina não parece atuar de forma direta sobre o índice esplênico dos animais infectados (Figura 18 B). O aumento deste órgão durante a fase aguda da infecção esquistossomótica, indica proliferação celular que aparentemente não foi inibida nem mesmo com as concentrações mais baixa de silimarina.

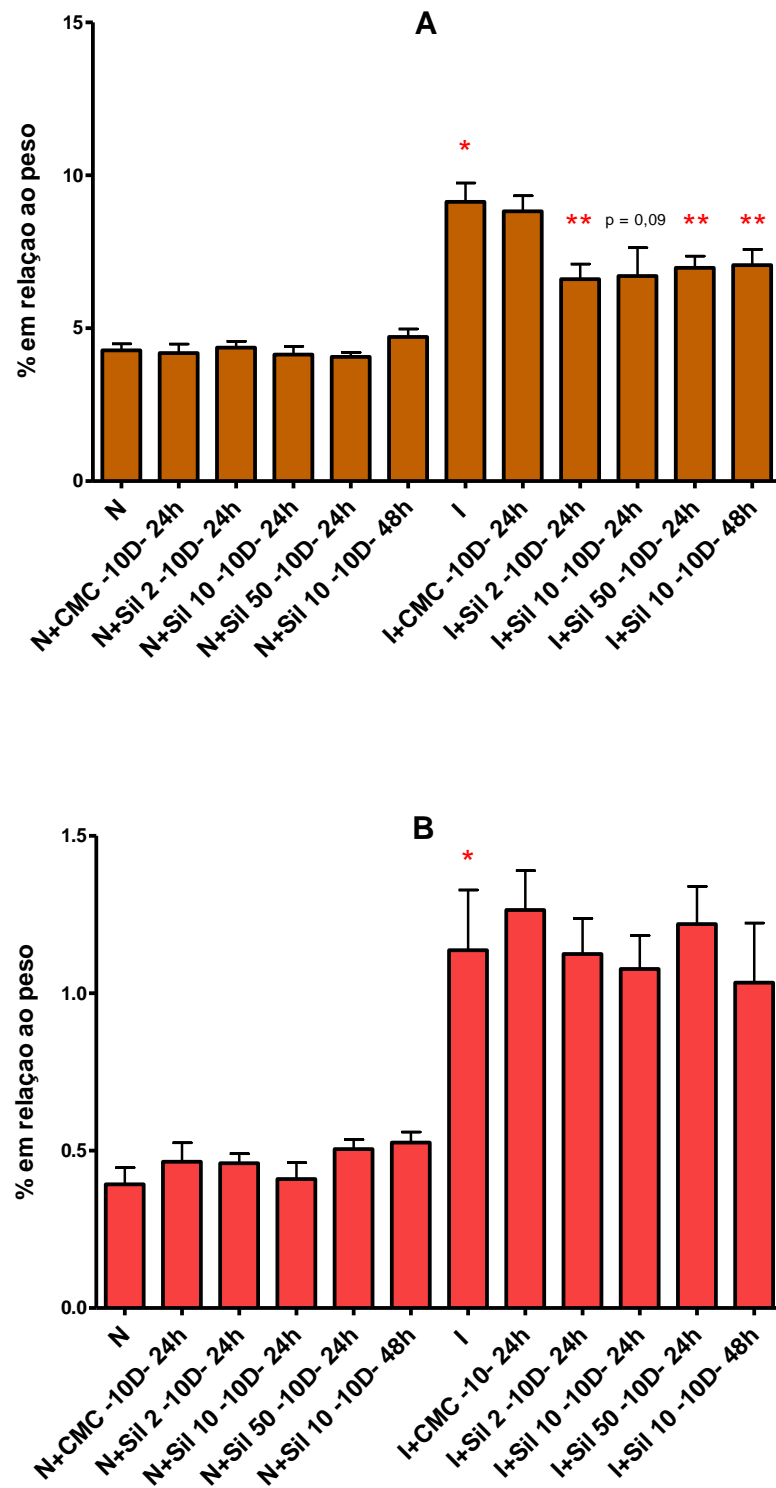


Figura 18 - Índices fígado e baço (2º Lote). O gráfico A e B representam as médias e os erros padrões dos índices do fígado e baço, respectivamente. A comparação entre os grupos foi avaliada pelo teste *t* de Student não pareado, ($n = 6$). Os valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos. * $p < 0,05$ se refere a diferença entre os grupos (N) e (I). ** $p < 0,05$ se refere a diferença entre os grupos infectado não tratado (I) e os grupos infectados tratados. O valor de “p” expresso no gráfico se refere a diferença entre os grupos (I) e o (I+Sil 10 -10D- 24h).

Dados Histopatológicos

Visando avaliar a área dos granulomas hepáticos, foi realizada a captura de imagens que continham um ovo central evidente. Para a avaliação do tamanho dos granulomas foi utilizado microscopia de campo claro seguida de captura das imagens e processamento com o auxílio do programa Scion Image versão 4b. Deste modo, pode-se observar na Figura 19 que o tratamento com silimarina promove diminuição da resposta inflamatória granulomatosa ao redor dos ovos. No entanto, esta redução foi significativa apenas nos grupos (I+Sil 2 -10D- 24h), (I+Sil 10 -10D- 24h) e (I+Sil 10 -10D- 48h). Já que as alterações patológicas desta infecção são decorrentes do processo inflamatório que ocorre em resposta a oviposição do parasito, uma menor reação inflamatória é de fundamental importância na patogênese da esquistossomíase. No entanto a silimarina não parece atuar diretamente sobre a resposta esplênica (Figura 18 B), mas sim na reação inflamatória do granulomas hepático.

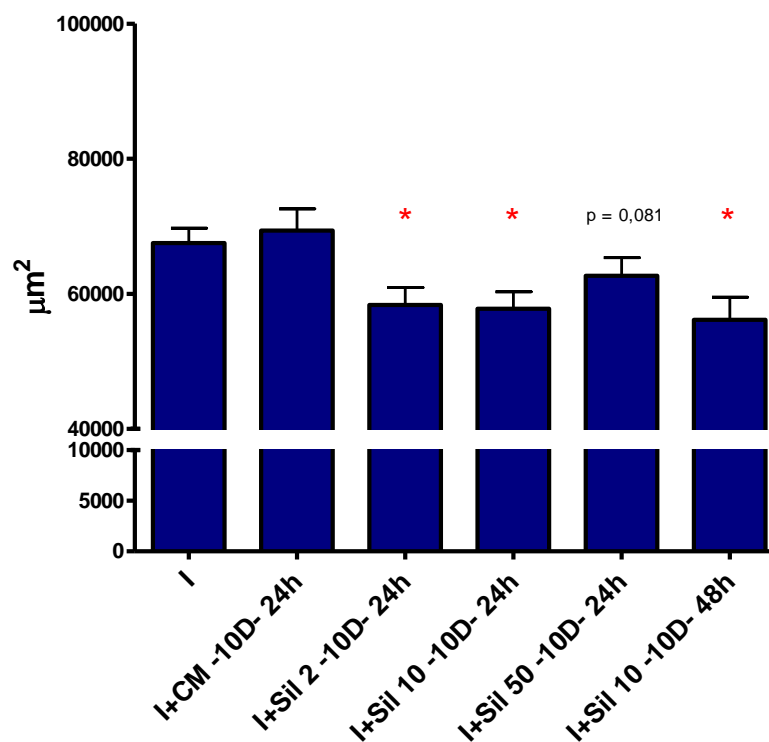


Figura 19 - Área dos granulomas hepáticos (2º Lote). Médias e erros padrões dos granulomas hepáticos expressa em μm^2 . A comparação entre os grupos foi avaliada pelo teste *t* de Student não pareado. * $p < 0,01$ se refere a diferença entre os grupos infectado não tratado (I) e os grupos infectados tratados. O “n” para todos os grupos foi 6.

Dosagem de hidroxiprolina

A patologia da esquistossomíase é correlacionada principalmente com a deposição de fibrose no tecido hepático, já que esta infecção promove alterações significativas no metabolismo de colágeno. Na Figura 20 foi quantificado a hidroxiprolina, um aminoácido presente em concentrações elevadas no colágeno, utilizado como indicador de fibrose. Na avaliação do comportamento deste órgão frente a administração de silimarina, pode-se observar a redução da concentração de hidroxiprolina em todos os grupos tratados, contudo, as diferenças foram significativas apenas nos grupos (I + Sil 2 -10D- 24h), (I + Sil 10 -10D- 24h) e (I + Sil 10 -10D- 48h). Este dado é corroborado com o efeito da silimarina sobre a reação inflamatória granulomatosa periovular (Figura 19).

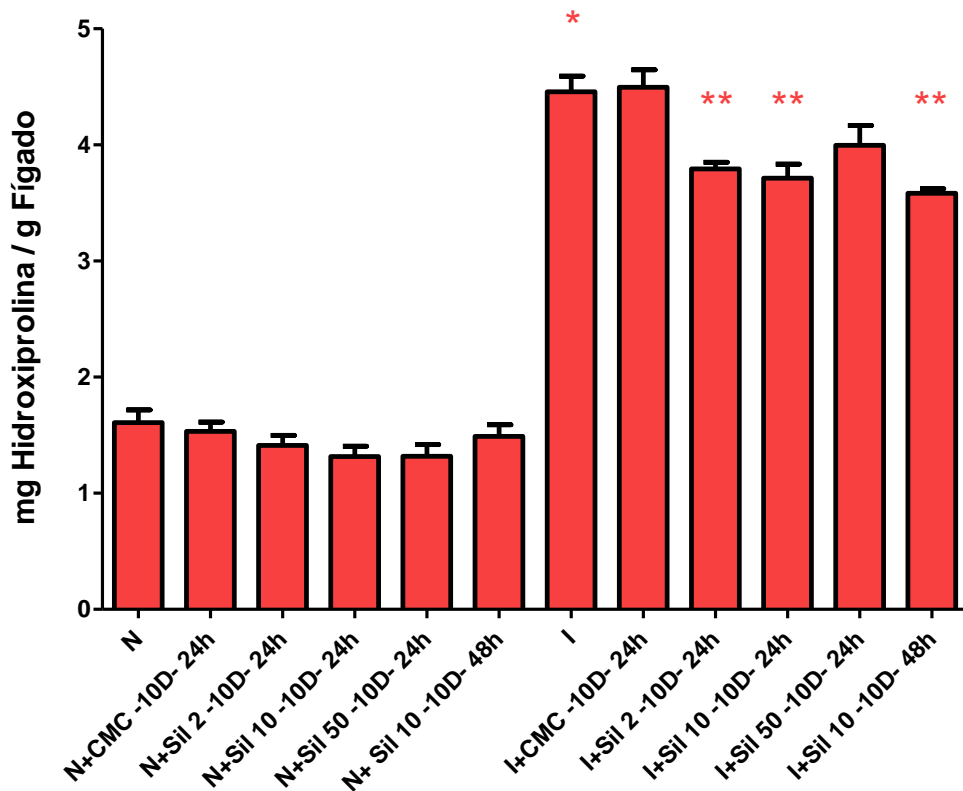


Figura 20 - Dosagem de hidroxiprolina (2º Lote). Médias e erros padrões das concentrações de hidroxiprolina no tecido hepático. A comparação entre os grupos foi avaliada pelo teste t de Student não pareado. * $p < 0,05$ se refere a diferença entre os grupos N e I. ** $p < 0,05$ se refere a diferença entre os grupos infectado não tratado (I) e os grupos infectados tratados. O “n” dos grupos foi composto por 3 pools, sendo cada um constituído por 2 animais.

Terceiro Lote Experimental (administração intraperitoneal)

Os resultados obtidos anteriormente sugerem que a administração intraperitoneal não parece ter influência direta sobre os resultados, já que a utilização desta via não promoveu desordens orgânicas ou metabólicas.

O terceiro lote experimental foi realizado com o objetivo de confirmar os resultados obtidos do desenho experimental anterior no qual utilizou a via de administração intraperitoneal. No entanto, como o intervalo de aplicação pode ter influências sobre os efeitos do medicamento frente a infecção esquistossomótica, também foi avaliado esquemas posológicos distintos, onde foi respeitado para todos os grupos o mesmo número de doses (10 inoculações), porém os intervalos utilizados anteriormente de 24h entre as doses, foram substituídos por 48h.

Para este ensaio foram analisados: a variação percentual do peso corporal dos camundongos, curva de sobrevivência dos animais, a distribuição de ovos no tecido hepático, índices dos pesos dos órgãos (fígado e baço), tamanho dos granulomas e dosagem de hidroxiprolina no tecido hepático.

Percentual do peso corporal dos camundongos

A avaliação do crescimento e desenvolvimento dos camundongos foi realizada, através do acompanhamento do peso corporal, realizado duas vezes por semana durante todo o experimento. Na Figura 21 esta ilustrada a curva ponderal de todos os grupos, e pode-se observar que os grupos infectados apresentaram um déficit no peso corporal a partir do 40º DPI, o mesmo não é observado no grupo normal e normal tratado (N+Sil 50 -10D- 48h). Confirmando-se que as constantes aplicações intraperitoneais não parecem ter influência negativa sobre os resultados, já que não foram observadas alterações orgânicas nos grupos normais tratados.

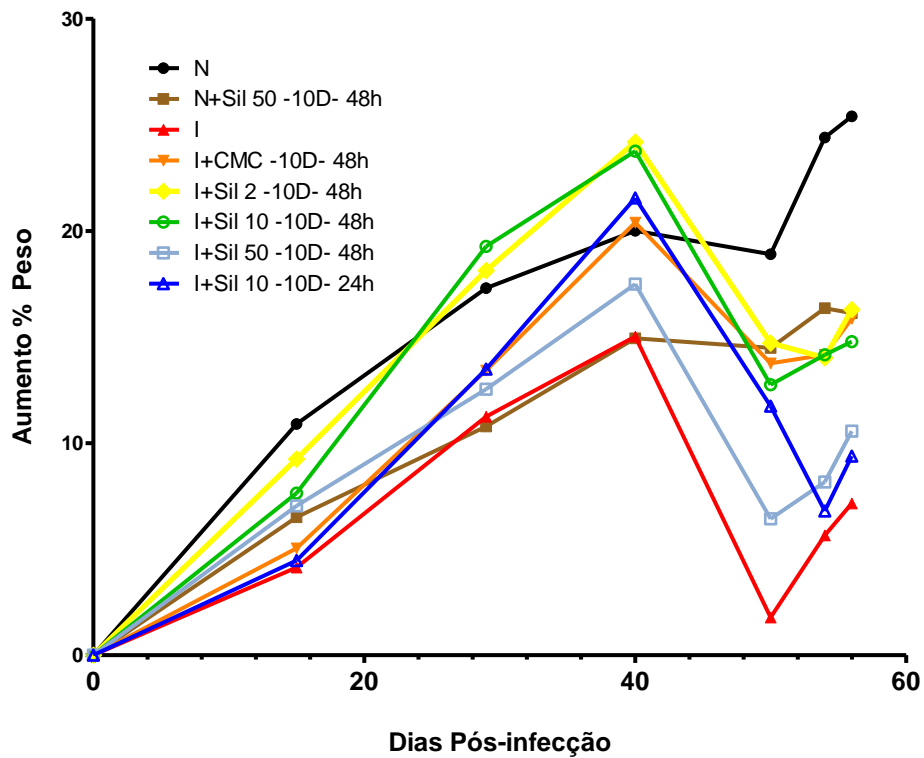


Figura 21 - Curva ponderal (3º Lote). Médias percentuais da oscilação do peso corporal dos grupos de camundongos normais e infectados com *S. mansoni*. O aumento do percentual do peso corporal até o 40º DPI foi normal para todos os grupos. A curva foi traçada a partir da média dos grupos, todos os grupos eram compostos de (n=7).

Curva de sobrevivência

Independente da data de eutanásia pré-definida (55 DPI) foi realizado acompanhamento de alterações comportamentais, assim como o registro de eventuais óbitos. Através da Figura 22 pode ser observado que não houve mortalidade no decorrer do experimento. Corroborando com a avaliação do crescimento e desenvolvimento dos camundongos, realizada através da pesagem dos mesmos (Figura 21). Confirmando-se que a via intraperitoneal não parece interferir sobre os resultados, já que não foram observadas alterações orgânicas, comportamentais, assim como mortalidade ao longo do experimento.

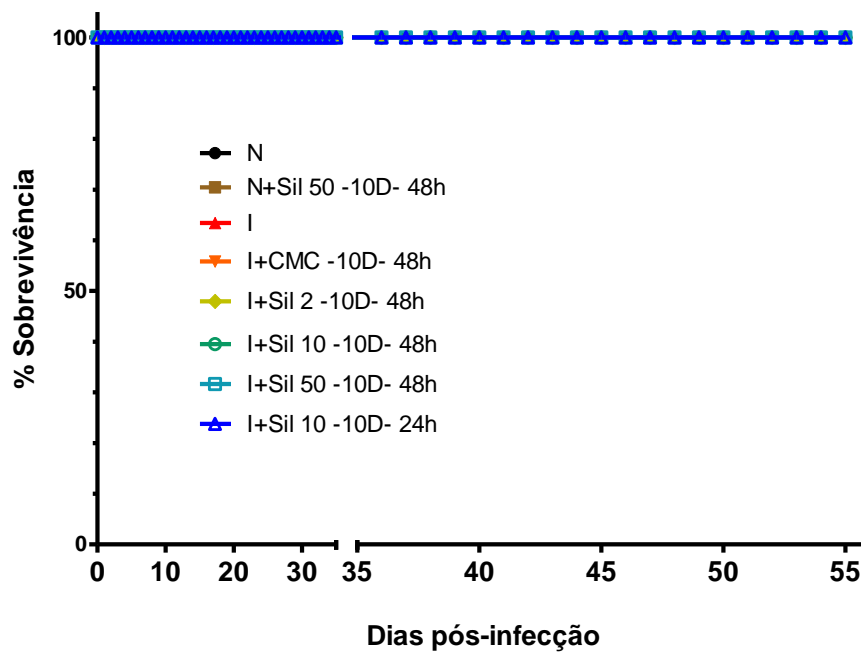


Figura 22 - Curva de sobrevivência (3º Lote). Acompanhamento, durante os 55 dias de infecção, dos percentuais de sobrevivência. Alterações comportamentais também foram consideradas. O “n” para todos os grupos foi 7.

Distribuição de ovos nos tecidos

Com o objetivo de verificar a carga parasitária foi realizado uma quantificação de ovos presentes no tecido hepático. Na Figura 23 pode-se observar que não há diferença significativa de carga parasitária entre os grupos infectados, possibilitando a avaliação comparativa entre todos os grupos infectados já que estes apresentam a mesma carga parasitária.

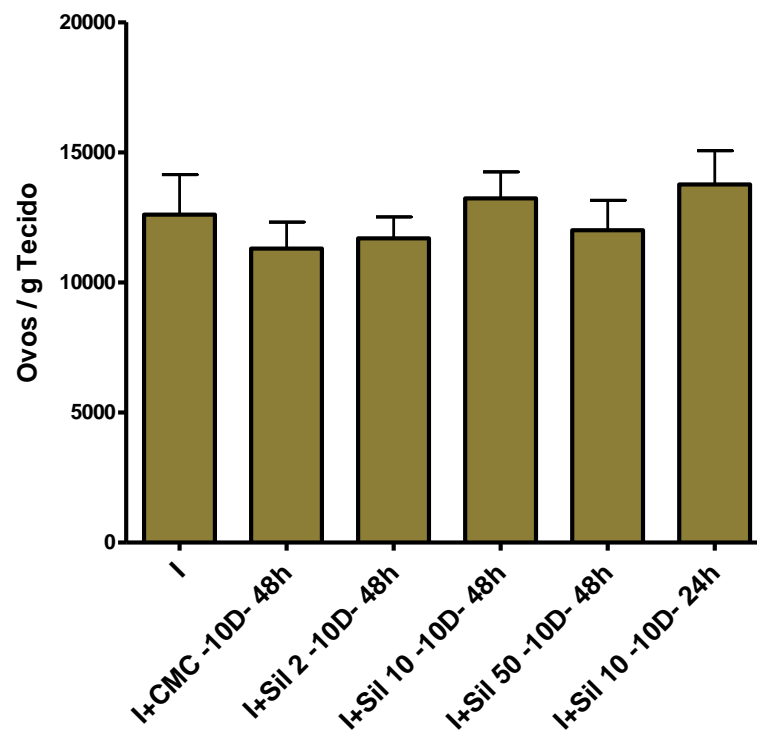


Figura 23 - Ovos no tecido hepático (3º Lote). Médias e erros padrões do número de ovos de *Schistosoma mansoni* presente no tecido hepático. A comparação entre os grupos foi avaliada pelo teste t de Student não pareado. O “n” para todos os grupos foi 7.

Média do peso dos Órgãos

As avaliações das alterações hepáticas e esplênicas foram realizadas através das pesagens dos mesmos, que posteriormente foram correlacionadas com o peso corporal de cada camundongo respectivamente, para obtenção dos índices. A Figura 24 apresenta o efeito da silimarina sobre a evolução do quadro patológico, já que a hepatomegalia (gráfico A) e a esplenomegalia (gráfico B) são alterações relevantes na esquistossomíase. Através dessas avaliações pode-se observar uma redução da hepatomegalia nos grupos infectados tratados com silimarina (Figura 24 A). No entanto, esta redução foi significativa apenas nos grupos (I+Sil 10 -10D- 48h) e (I+Sil 50 -10D- 48h). Como já observado nos experimentos anteriores, apesar da redução na hepatomegalia, a silimarina não parece atuar de forma direta sobre o índice esplênico dos animais infectados (Figura 18 B).

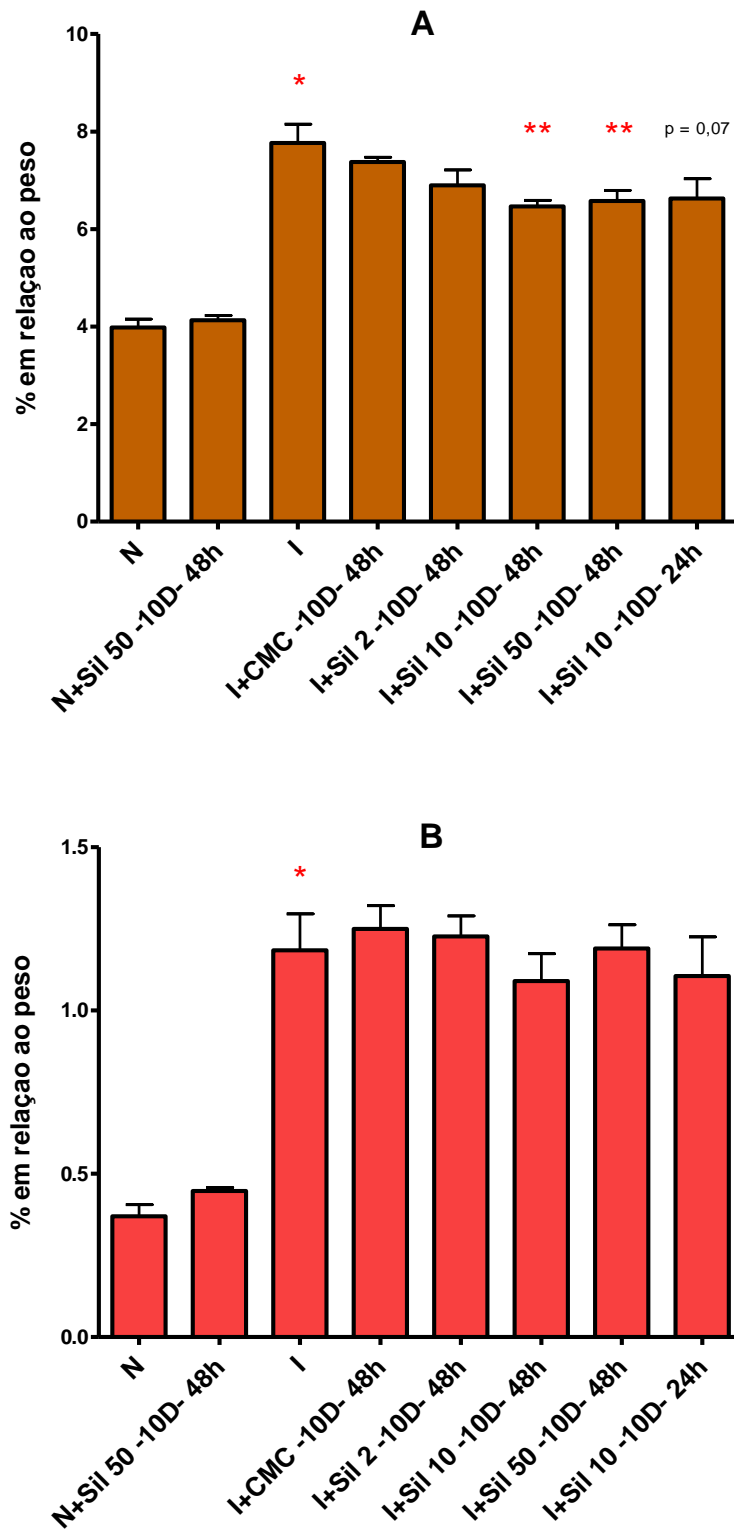


Figura 24 - Índices fígado e baço (3º Lote). O gráfico A e B representam as médias e os erros padrões dos índices do fígado e baço, respectivamente. A comparação entre os grupos foi avaliada pelo teste *t* de Student não pareado. Os valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos. * $p < 0,05$ se refere a diferença entre os grupos N e I. ** $p < 0,05$ se refere a diferença entre os grupos infectado não tratado (I) e os grupos infectados tratados. O valor de “p” expresso no gráfico se refere à diferença entre os grupos (I) e o (I+Sil 10 -10D- 24h). O “n” para todos os grupos foi 7.

Dados Histopatológicos

Para a avaliação do tamanho dos granulomas foi utilizado microscopia de campo claro seguida de captura das imagens como previamente descrito no Material e Métodos através do ensaio de processamento histológico. Deste modo, pode-se observar na Figura 25 que o intervalo de tratamento com silimarina tem influência sobre o efeito deste produto na esquistossomíase. Com a alteração do esquema posológico para 48 horas, apenas o grupo (I + Sil 10 -10D- 48h) reduziu significativamente o infiltrado inflamatório. No entanto, assim como nas avaliações anteriores o grupo (I + Sil 10 -10D- 24h), também reduziu a área inflamatória granulomatosa.

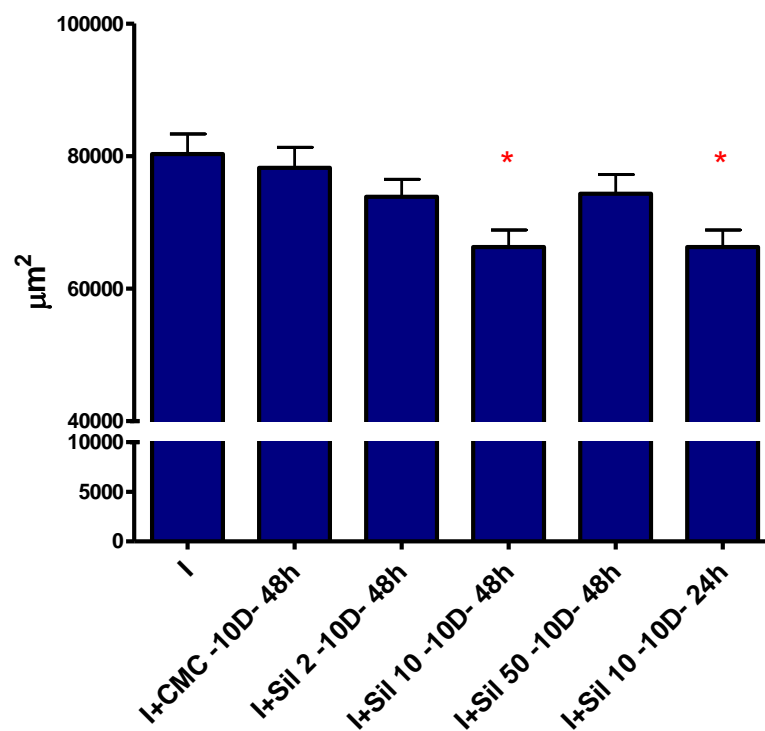


Figura 25 - Área dos granulomas hepáticos (3º Lote). Médias e erros padrões dos granulomas hepáticos expressa em μm^2 . A comparação entre os grupos foi avaliada pelo teste *t* de Student não pareado. * $p < 0,01$ se refere a diferença entre os grupos infectado não tratado (I) e os grupos infectados tratados. O “n” para todos os grupos foi 7.

Dosagem de hidroxiprolina

Corroborando com os resultados obtidos anteriormente, pode-se observar na Figura 26 a redução da concentração de hidroxiprolina em todos os grupos tratados com silimarina. No entanto, a diferença mais marcante e significativa foi observada no grupo (I + Sil 10 -10D- 48). Assim, o efeito da silimarina frente a esquistossomíase além de depender da concentração do produto, varia também de acordo com o intervalo de aplicação.

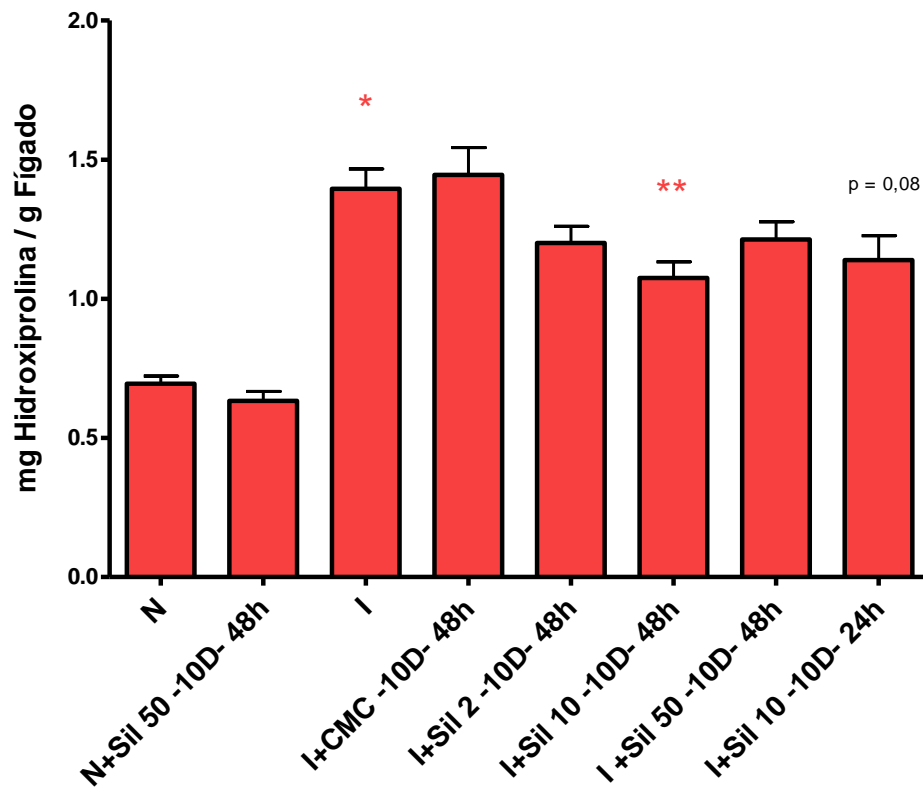


Figura 26 - Dosagem de hidroxiprolina (3º Lote). Médias e erros padrões das concentrações de hidroxiprolina no tecido hepático. A comparação entre os grupos foi avaliada pelo teste *t* de Student não pareado. * $p < 0,05$ se refere a diferença entre os grupos N e I. ** $p < 0,05$ se refere a diferença entre os grupos infectado não tratado (I) e os grupos infectados tratados. O valor de “p” expresso no gráfico se refere a diferença entre os grupos (I) e o (I+Sil 10 -10D- 24h). O “n” dos grupos foi composto por 3 pools, sendo cada um constituído por 2, 2 e 3 animais.

Quarto Lote Experimental (administração intraperitoneal)

O estresse da manipulação dos animais, nesta infecção, pode influenciar sobre os resultados, como foi observado com a utilização de inúmeras inoculações orais. No entanto, alterações orgânicas e/ou metabólicas não foram observadas frente as avaliações do desenvolvimento e mortalidade dos camundongos manipulados com a via intraperitoneal. A otimização da via de inoculação permitiu a avaliação do comprometimento da resposta da silimarina frente a concentração e os intervalos de inoculações do produto. Desta forma, os grupos tratados com as concentrações de 2 mg/kg inoculados a cada 24 horas e 10 mg/kg a cada 48 horas, apresentaram reduções marcantes, sugestivas de menor morbidade.

Contudo, como as reduções podem ser mais significativas com o tratamento prolongado, foi realizado o quarto lote experimental. Para avaliar esta possibilidade foram criados grupos de animais inoculados com 25, 20, 10 e 5 doses de silimarina na concentração de 10 mg/kg a cada 48 horas.

Para este ensaio foram analisados: a variação percentual do peso corporal dos camundongos, curva de sobrevivência dos animais, a distribuição de ovos no tecido hepático, índices dos pesos dos órgãos (fígado e baço), tamanho dos granulomas e dosagem de hidroxiprolina no tecido hepático.

Percentual do peso corporal dos camundongos

Os efeitos da silimarina não parecem influenciar diretamente no déficit de crescimento e desenvolvimento provocados pela esquistossomíase, como demonstrado na Figura 27. As alterações orgânicas observadas através da curva ponderal mostram uma acentuada diminuição do peso corporal em todos os grupos infectados a partir do 40º DPI, corroboram com os experimentos anteriores.

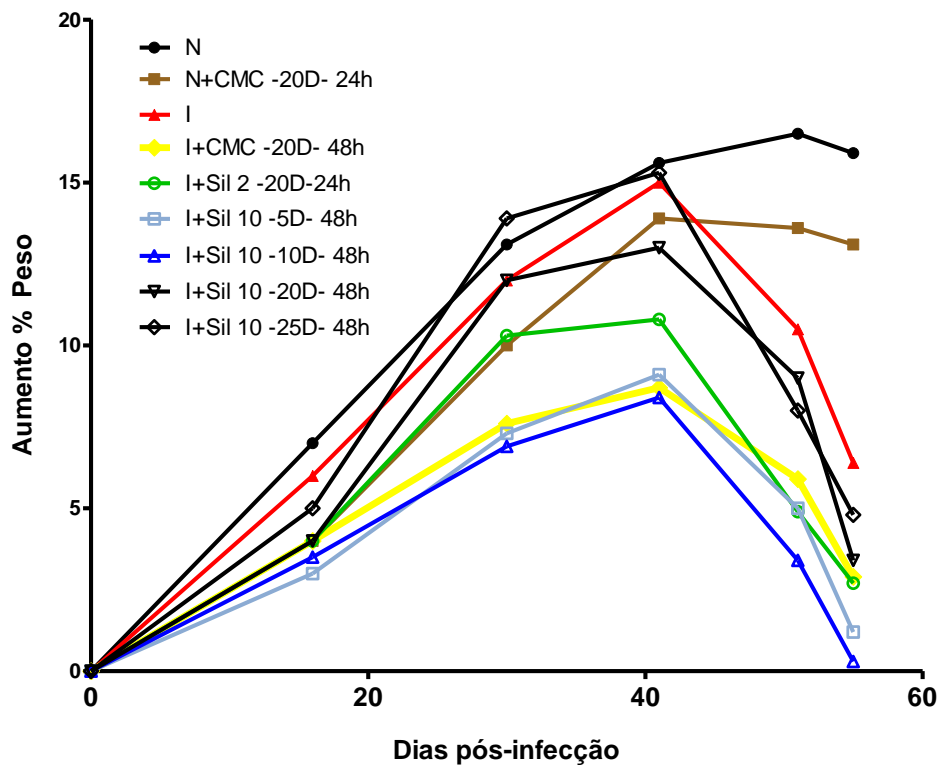


Figura 27 - Curva ponderal (4^o Lote). Médias percentuais da oscilação do peso corporal dos grupos de camundongos normais e infectados com *S. mansoni*. O aumento do percentual do peso corporal até o 40^o DPI foi normal para todos os grupos. Todos os grupos eram compostos por nove animais.

Curva de sobrevivência

Independente da data de eutanásia pré-definida (55 DPI) foram registradas as datas das mortes, assim como as alterações comportamentais dos camundongos. A Figura 28 mostra uma taxa de mortalidade de aproximadamente 11% nos grupos (N), (N+CMC -20D- 48h), (I) e (I+Sil 10 -20D- 48h), diferentemente do observado nos experimentos anteriores onde não houve mortalidade. No decorrer deste experimento foram observados: no 7^o DPI uma baixa no grupo (I+Sil 10 -20D- 48h) devido uma apatia com claudicação em decorrência do intumescimento na pata, provavelmente ocasionado por uma reação de hipersensibilidade que pode estar associada com o acúmulo dos parasitos nos linfonodos axilares dos camundongos, como observado por (GEORGI, WADE e DEAN, 1987); no 8^o e 31^o DPI foi excluído um animal dos grupos (N) e (N+CMC -20D- 48h), devido a alterações associadas a inquietação dos animais; e no 21^o DPI houve uma morte natural no grupo (I).

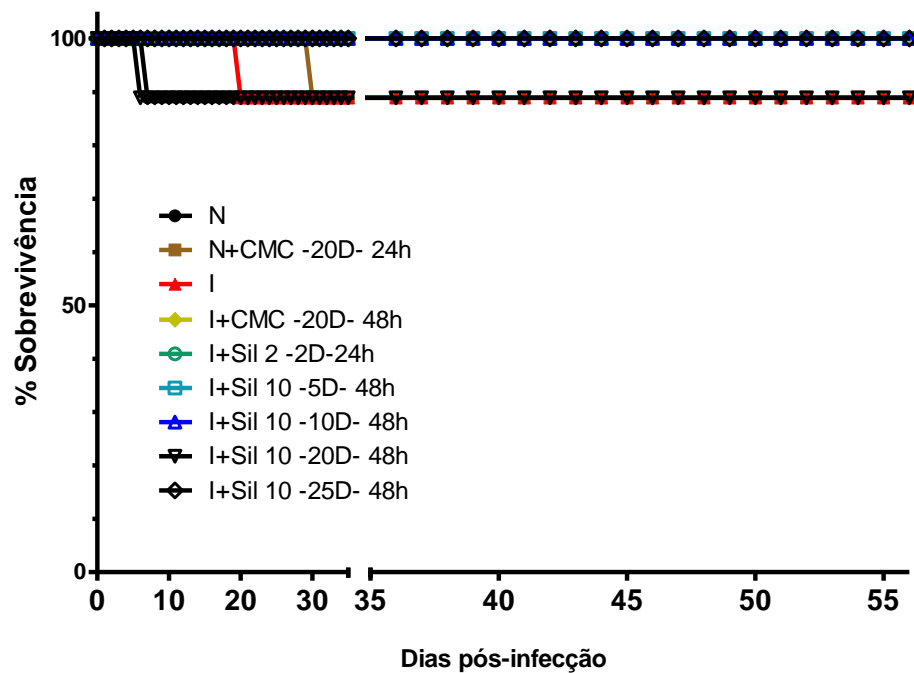


Figura 28 - Curva de sobrevivência (4º Lote). Acompanhamento, durante os 55 dias de infecção, dos percentuais de sobrevivência. Alterações comportamentais também foram consideradas. As baixas ocorreram no 7º DPI no grupo (I+Sil 10 -20D- 48h), no 8º e 31º DPI nos grupos (N) e (N+CMC -20D- 48h), respectivamente e no 21º DPI no grupo (I). O “n” para todos os grupos foi 9.

Distribuição de ovos nos tecidos

A Figura 29 ilustra o ensaio de quantificação de ovos no tecido hepático. Pode-se observar que não há diferença significativa de carga parasitária entre os grupos infectados, possibilitando a avaliação comparativa entre todos os grupos infectados já que estes apresentam a mesma carga parasitária.

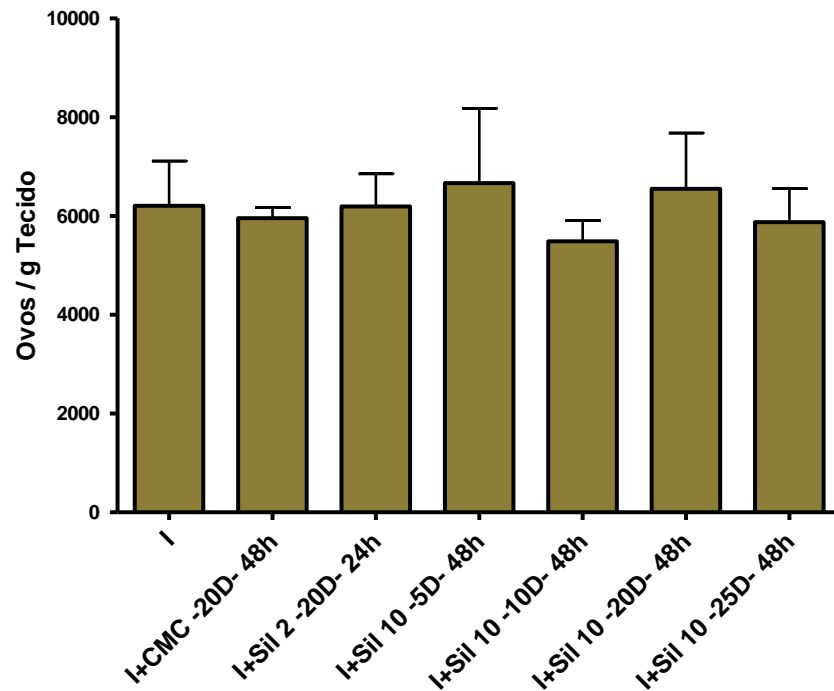


Figura 29 - Ovos no tecido hepático (4º Lote). Médias e erros padrões do número de ovos de *Schistosoma mansoni* presente no tecido hepático. O número amostral para esta avaliação foram (I = 8), (I+Sil 10 -10D- 48h = 8), (I+Sil 2 -20D- 24h =8), demais grupos “n = 9”. A comparação entre os grupos foi avaliada pelo teste t de Student não pareado.

Média do peso dos Órgãos

Ao final do experimento foi realizada a pesagem do fígado e do baço, para identificação do índice hepático e esplênico. Deste modo, a Figura 30 permite observar o efeito da silimarina sobre a evolução do quadro patológico, já que a hepatomegalia (gráfico A) e a esplenomegalia (gráfico B) são muitas vezes associadas com o comprometimento destes órgãos.

Conforme observado, as inoculações utilizando apenas o veículo (CMC), no grupo normal (N+CMC -20D- 48h) e infectado (I+CMC -20D- 48h), não foram responsáveis por promover alterações no índice hepático (Figura 18 A). No entanto, pode-se observar uma redução da hepatomegalia nos grupos infectados tratados com silimarina. Esta redução foi significativa nos grupos (I+Sil 2 -20D- 24h), (I+Sil 10 -10D- 48h), (I+Sil 10 -20D- 48h) e (I+Sil 10 -25D- 48h). A redução do índice hepático dos animais infectados e tratados com silimarina pode ser reflexo de um menor comprometimento deste órgão. O único grupo que não apresentou redução significativa foi (I+Sil 10 -5D- 48h). Deste modo, pode-se observar

que as reduções são mais marcantes com o tratamento prolongado.

Corroborando com os experimentos anteriores, apesar da redução na hepatomegalia, a silimarina não parece atuar de forma direta sobre o índice esplênico dos animais infectados (Figura 30 B). O aumento deste órgão durante a fase aguda da infecção esquistossomótica, indica proliferação celular que aparentemente não foi inibida.

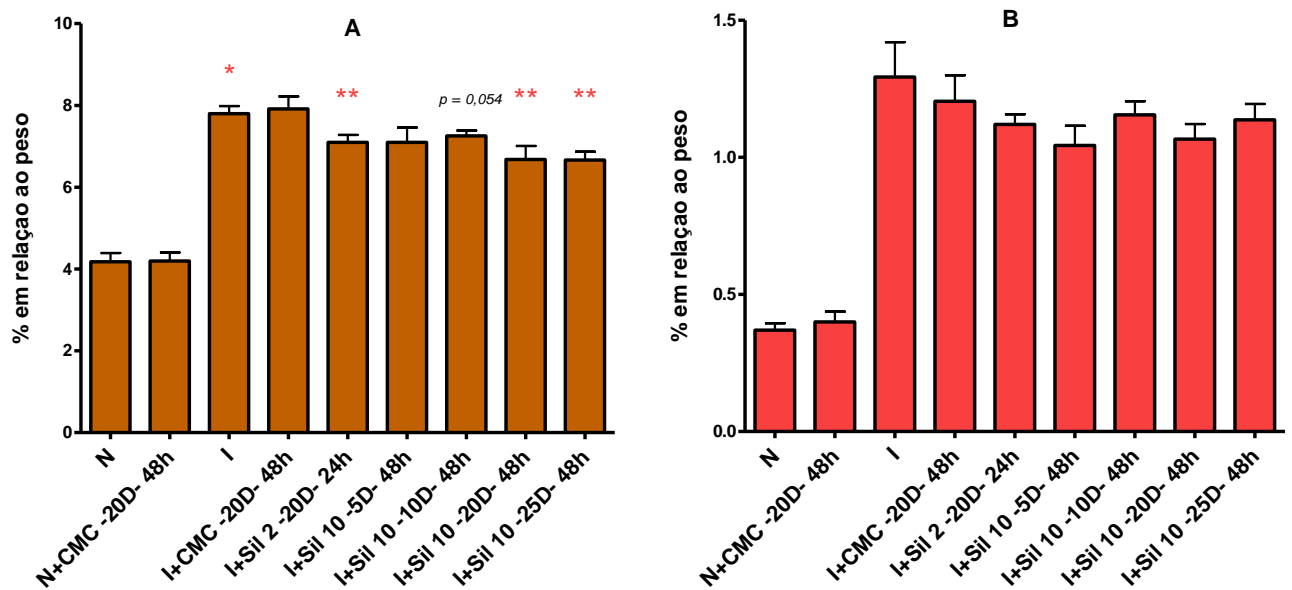


Figura 30 - Índices fígado e baço (4º Lote). O gráfico A e B representam as médias e os erros padrões dos índices do fígado e baço, respectivamente. O “n” desta avaliação foi (I = 8), (I+Sil 10 -10D- 48h = 8), (I+Sil 2 -20D- 24h = 8), os demais grupos “n = 9”. A comparação entre os grupos foi avaliada pelo teste *t* de Student não pareado. Os valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos. * $p < 0,05$ se refere a diferença entre os grupos N e I. ** $p < 0,05$ se refere a diferença entre os grupos infectado não tratado (I) e os grupos infectados tratados. O valor de “p” expresso no gráfico se refere a diferença entre os grupos (I) e o (I+Sil 10 -10D- 48h).

Dados Histopatológicos

Conforme observado na Figura 31, a silimarina foi capaz de reduzir a área do infiltrado inflamatório hepático, significativamente, em todos os grupos tratados. Corroborando com os dados obtidos através do índice hepático (Figura 30 A) pode-se observar que as reduções são mais marcantes com tratamentos prolongados.

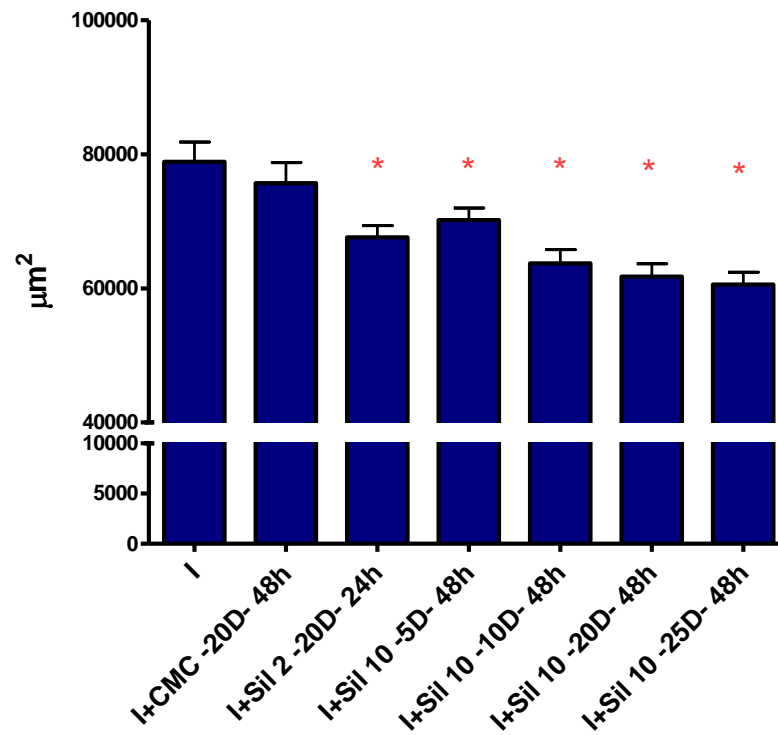


Figura 31 - Área dos granulomas hepáticos (4º Lote). Médias e erros padrões dos granulomas hepáticos expressa em μm^2 . O “n” desta avaliação foi (I = 8), (I+Sil 10 -10D- 48h = 8), (I+Sil 2 -20D- 24h = 8), os demais grupos “n = 9”. A comparação entre os grupos foi avaliada pelo teste *t* de Student não pareado. Os valores de $p < 0,01$ foram considerados significativos (*).

Dosagem de hidroxiprolina

A quantificação de hidroxiprolina utilizada como indicador de fibrose foi expressa na Figura 32 e pode-se observar a potente atividade antifibrótica da silimarina. Deste modo, observa-se que todos os grupos tratados com silimarina promoveram uma redução na deposição de colágeno hepático, e não há diferença significativa entre os grupos tratados.

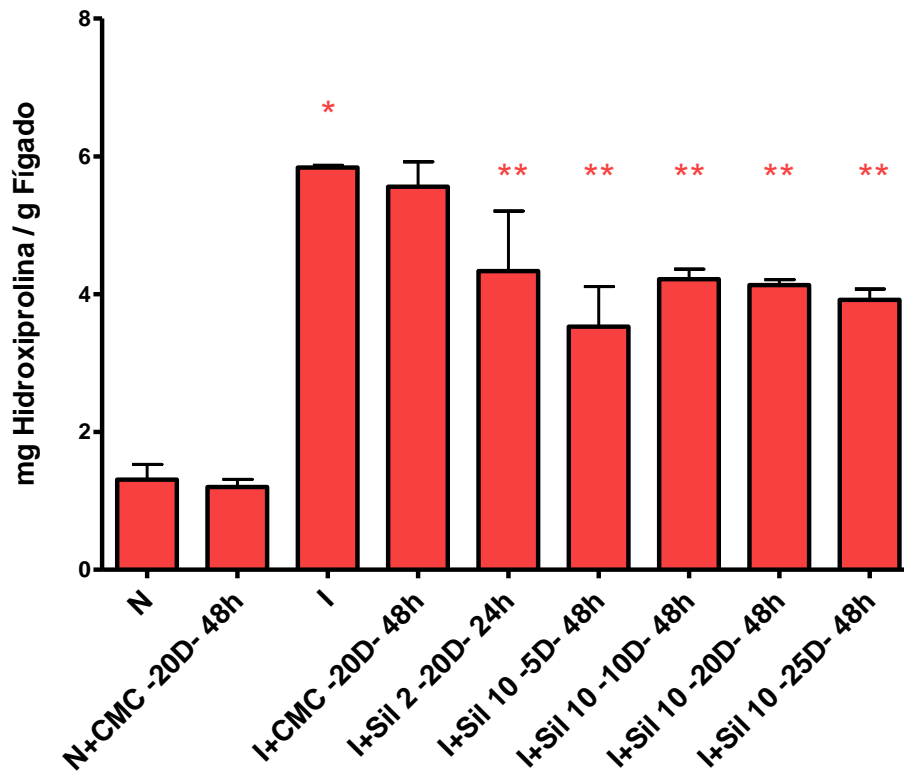


Figura 32 - Dosagem de hidroxirolina (4º Lote). Médias e erros padrões das concentrações de hidroxirolina no tecido hepático. A comparação entre os grupos foi avaliada pelo teste *t* de Student não pareado. * $p < 0,05$ se refere a diferença entre os grupos N e I. ** $p < 0,05$ se refere a diferença entre os grupos infectado não tratado (I) e os grupos infectados tratados. O “n” dos grupos foi composto por 3 pools.

DISCUSSÃO

A esquistossomíase é umas das infecções parasitárias de maior morbidade e mortalidade. Dentre os seus agravantes, o mais frequente esta associado com reações inflamatórias que culminam em subsequente fibrose hepática que conduz à hipertensão portal. O aumento na dificuldade circulatória – devido às reações granulomatosas, deposição de colágeno no tecido hepático e outros fenômenos ainda não plenamente esclarecidos – levam à formação de varizes gastroesofágicas que eventualmente se rompem levando a óbito um número considerável de pessoas.

A busca de novas estratégias para atenuar o processo reacional inflamatório e consequentemente a fibrose hepática é de fundamental importância para o tratamento da morbidade desta infecção. Mesmo com o desenvolvimento dos métodos alternativos para as avaliações científicas – *in vitro* – a utilização do modelo murino permite avaliar as alterações anatomopatológicas desta infecção no organismo como um todo, através da perda de peso corporal, curva de sobrevivência, carga parasitária, hepatoesplenomegalia, infiltrado inflamatório granulomatoso e deposição de colágeno no tecido hepático.

A realização deste trabalho teve como objetivo a análise dos efeitos da silimarina sobre a infecção aguda experimental murina pelo *Schistosoma mansoni*, uma vez que este fármaco apresenta propriedades que podem atuar amenizando os sintomas e as sequelas desta infecção. Este trabalho foi realizado avaliando-se as vias de administração oral e intraperitoneal, as concentrações de 2 mg/kg, 10 mg/kg e 50 mg/kg, os intervalos de 24h e 48h entre as doses e o período de tratamento durante a infecção.

Ao longo das avaliações experimentais, o acompanhamento do peso corporal dos animais permitiu observar alterações orgânicas que não foram remediadas pelo tratamento com silimarina. Os grupos de animais infectados e não-infectados apresentaram ganho de peso corporal semelhantes até o quadragésimo dia pós-infecção. No entanto, a redução do crescimento ponderal, dos animais infectados tratados ou não, sobretudo parece estar atribuída principalmente ao início da oviposição. Como o fator responsável pela maior parte da patologia, no hospedeiro definitivo, esta relacionado com a presença dos ovos nos tecidos (OTHMAN *et al.*, 2010), as alterações no desenvolvimento ponderal dos camundongos parecem estar diretamente relacionadas com a liberação de SEA (antígeno solúvel do ovo). De acordo com Atta e colaboradores (1981), estes antígenos, promovem o comprometimento do fígado quanto as funções relacionadas com o processamento e distribuição de nutrientes,

originando alterações do metabolismo hepático. Esta insuficiência hepática é acompanhada pela elevação na expressão de AST e ALT (SADUN e WILLIAMS, 1966) e a redução dos valores de albuminemia e elevação das globulinas (COUTINHO e LOUREIRO, 1960). Outro fator importante que pode contribuir para o decréscimo na curva ponderal foi demonstrado na fase pré-postural da infecção esquistossomótica através das alterações dos compartimentos lisossômicos dos hepatócitos. Durante os primeiros trinta dias de infecção Rodrigues (1988) observou a diminuição de triglicerídeos, colesterol livre, ésteres de colesterol e fosfatidilcolina – na membrana destas organelas, demonstrando-se assim, uma maior fragilidade dos lisossomos na esquistossomíase.

Além dos fatores hepáticos, a infecção esquistossomótica parece provocar alterações funcionais que interferem na absorção de glicose no intestino (SADEK, BORGES e MISZPUTEN, 1986).

Corroborando com os resultados obtidos, vários autores demonstram, em diferentes linhagens de camundongos que a infecção pelo *Schistosoma mansoni* promove diminuição do peso corporal entre a quinta e a sexta semana de infecção (COUTINHO *et al.*, 1992; FERREIRA *et al.*, 1993; COUTO *et al.*, 2002). A administração intraperitoneal da silimarina não promoveu interferências na curva ponderal dos grupos normais, assim como dos grupos infectados. No entanto, a administração oral do Legalon[®], um dos produtos de silimarina mais comumente utilizados em ensaios clínicos (RAMASAMY e AGARWAL, 2008), promoveu alteração no desenvolvimento do peso corporal do grupo normal (Figura 11). Esta diminuição da taxa ponderal foi relacionada com o estresse do número de inoculações administradas pela via oral, já que a silimarina não apresenta efeito colateral baseado em observações clínicas (FLORA *et al.*, 1998).

Com o objetivo de padronizar a via de administração para avaliação dos efeitos da silimarina, ao longo da infecção foram avaliadas as alterações comportamentais e a mortalidade dos camundongos. A sobreposição do estresse das constantes inoculações orais e da infecção esquistossomótica afetou negativamente a sobrevivência dos animais. O percentual de mortalidade de aproximadamente 50% observado nos animais inoculados pela via oral, não se repetiu quando a silimarina foi administrada em animais infectados e tratados pela via intraperitoneal. Justificando-se assim, a utilização da via intraperitoneal ao longo de todos os demais lotes experimentais na busca da avaliação dos efeitos da silimarina na patogênese da infecção esquistossomótica murina.

As buscas na eficácia do tratamento das lesões provocadas pelo *Schistosoma* vão desde intervenções cirúrgicas, como a esplenectomia (FERRAZ, BACELAR *et al.*, 2001; FERRAZ,

LOPES *et al.*, 2001), à tratamentos medicamentosos. No entanto, a eficácia de interferon, colchicina, pelicinamina e corticóides para o tratamento de injúrias hepáticas se deparam com a incidência de profundos efeitos colaterais (LUPER, 1998).

De maneira geral, a administração de amplas doses de cortisona durante infecções experimentais utilizando diferentes patógenos resultam em uma depressão da resistência natural do hospedeiro (LAMBERTUCCI *et al.*, 1989). Em trabalhos anteriores realizados pela nossa equipe foi avaliado o papel de um glicocorticóide (dexametasona) frente à infecção pelo *S. mansoni* (PYRRHO, 2001). Ao longo desta avaliação pôde-se observar uma mortalidade de aproximadamente 10% dos animais não infectados e tratados com dexametasona. Esta mortalidade nos grupos normais, atribuída a atividade imunossupressora dos corticóides, não foi observada com o uso de silimarina ao longo das avaliações experimentais neste trabalho.

A silimarina apresenta valores muito altos de LD₅₀ e não é hepatotóxica baseado em observações clínicas (FLORA *et al.*, 1998). No entanto, mesmo tendo-se demonstrados em animais experimentais efeitos imunossupressores atribuídos a silimarina (GHARAGOZLOO *et al.*, 2010), as concentrações inoculadas do produto (2, 10, 50 mg/kg) ao longo dos lotes experimentais, não parecem ter comprometido do sistema imunológico dos animais, já que não houve mortalidade dos mesmos.

As manifestações anatomopatológicas da esquistossomíase observadas em modelos experimentais estão diretamente relacionadas com a intensidade da infecção. Para identificar eventuais variáveis envolvidas na carga parasitária foi utilizada uma metodologia clássica que permitiu confirmar que na avaliação individual de cada lote experimental, não houve diferença significativa entre os grupos infectados. Já foi demonstrado no modelo murino que a ação de glicocorticóides, dependendo da fase de infecção, promove diminuição do número de parasitos responsáveis pela esquistossomíase (COKER, 1957; HARRISON e DOENHOFF, 1983; HERMETO *et al.*, 1990). Por esta razão, é de fundamental importância avaliar a atividade do fármaco utilizado sobre a carga parasitária em infecções experimentais, já que uma redução do número de ovos no tecido hepático esta relacionada com um menor número de reações granulomatosas e consequente deposição de fibrose (CHEEVER *et al.*, 1983). Dessa forma o medicamento pode apresentar atividade parasiticida ou interferir na capacidade de oviposição das fêmeas do parasito, e não estar vinculado às alterações dos parâmetros patológicos.

Ao longo dos desenhos experimentais foram administradas doses de silimarina em diferentes fases da infecção; após a maturação completa do parasito (1º, 2º e 3º lotes experimentais); e antes do seu completo desenvolvimento (4º lote experimental). Embora, a

silibina – componente de maior grau de atividade biológica da silimarina – apresente atividade antiviral (FERENCI *et al.*, 2008) e potente ação antibacteriana (LEE *et al.*, 2003), não foi observado qualquer alteração na capacidade de oviposição do parasito, tanto no tecido hepático, quanto no tecido intestinal dos camundongos infectados (dados não mostrados). Desde modo, a silimarina parece não apresentar efeito inibitório sobre o desenvolvimento e fecundidade do metazoário *Schistosoma mansoni*, possibilitando assim a correlação das alterações dinâmicas entre os grupos infectados e os grupos infectados tratados com silimarina.

Do ponto de vista anatômico, são evidentes as manifestações patológicas da esquistossomíase ao longo do desenvolvimento do parasito, durante este período a resposta imunológica dominante é mediada pelos linfócitos CD4⁺ TH1. No entanto, dados experimentais mostram a exacerbação da doença após a oviposição (ANDRADE e DE AZEVEDO, 1987). O granuloma esquistossomótico é composto por uma inflamação granulomatosa mista (HIRSH e JOHNSON, 1984). Esta população celular heterogênea tem por finalidade destruir os ovos e sequestrar ou neutralizar os agentes patogênicos produzidos, levando à fibrogênese no tecido adjacente. Notoriamente nesta fase há o contraste da diminuição dos componentes TH1 com o surgimento de uma forte resposta TH2 (PEARCE e MACDONALD, 2002). Com a cronicidade da infecção a resposta TH2 é modulada e os granulomas que se formam ao redor dos ovos são menores do que os da fase anterior. Ao longo deste trabalho foram avaliadas as alterações anatomopatológicas decorrentes da fase aguda da esquistossomíase. Os efeitos da silimarina não foram avaliados sobre as alterações decorrentes de fase crônica.

Visto que o curso da infecção progride em pelo menos três fases distintas, e a intensidade e duração da infecção podem determinar a quantidade de antígenos liberados, e assim a gravidade da doença fibro-obstrutiva (BURKE *et al.*, 2009), é de fundamental importância a investigação do composto silimarina durante a fase crônica, já que os resultados obtidos durante a fase aguda são sugestivos de menor morbidade.

Alguns trabalhos já demonstraram que a formação dos granulomas, principalmente no modelo murino, é mediada por uma vigorosa resposta conduzida por linfócitos CD4⁺ TH2, regulada por citocinas, quimiocinas e várias populações de células (FLORES VILLANUEVA, REISER e STADECKER, 1994; RATHORE *et al.*, 1996; PEARCE e MACDONALD, 2002). A diminuição no tamanho da área do processo reacional inflamatório granulomatoso no tecido hepático dos grupos de animais tratados com silimarina apresentou variações quando relacionados com os esquemas terapêuticos utilizados. Os grupos de

animais tratados com silimarina nas concentrações de 2 mg/kg e 10 mg/kg, nos intervalos de 24 e 48 horas, respectivamente, sofreram uma marcante redução no tamanho do infiltrado granulomatoso, indicando uma atividade imunomodulatória deste fármaco de acordo com a posologia. Contudo, também houve diferença marcante com tratamentos mais prolongados, deste modo, a área do infiltrado inflamatório parece estar inversamente relacionada com o número de aplicações, visto que quanto maior o número de inoculações, menor o infiltrado granulomatoso hepático.

Estudos recentes relatam que as atividades imunomodulatórias, imunoestimulatórias, imunossupressoras e antiinflamatórias da silimarina dependem da concentração e/ou procedimento do tratamento (GHARAGOZLOO *et al.*, 2010). Deste modo, pode-se supor que a concentração e o procedimento no tratamento da esquistossomíase utilizando silimarina possa realmente ter correlação com o infiltrado inflamatório periovular, já que este fármaco apresenta recirculação enterohepática, o que resulta em um aumento de sua concentração nas células hepáticas maior do que no plasma (RAINONE, 2005).

A relação dose-dependente da silimarina observada ao longo deste trabalho, já foi avaliada em células T por Johnson e colaboradores (2003). Estes autores demonstraram em camundongos BALB/c que o tratamento intraperitoneal de silimarina em baixa concentração, 10 mg/kg, promove a supressão de linfócitos T CD3⁺, CD4⁺ e CD8⁺, já a concentração de 250 mg/kg foi responsável por estimular o processo reacional inflamatório. Utilizando a mesma linhagem de animais foi demonstrado que a concentração de 25 mg/kg de silibina além de inibir a injúria hepática induzida por concanavalina-A (Con A), também promove uma supressão das células T dependentes e a inibição intrahepática da expressão de TNF, IFN- γ , IL-4 e IL-2, assim como a redução de óxido-nítrico síntase induzível (iNOS) e o aumento na síntese de IL-10 com a inibição da ativação do fator nuclear Kappa B (NF- κ B) (SCHUMANN *et al.*, 2003).

A resposta efetiva das células T na esquistossomíase é crítica para o desenvolvimento do granuloma e a sobrevivência do hospedeiro (BURKE *et al.*, 2009). A resposta TH2 caracteriza-se pelo aumento na expressão de IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13 (WILSON *et al.*, 2007). O papel da citocina IL-4 na esquistossomíase parece determinar o tamanho do granuloma e a proliferação do perfil TH2, assim como a produção das citocinas IL-5 e IL-13 (CHEEVER, WILLIAMS *ET AL.*, 1994). Já a citocina IL-5, necessária para o recrutamento dos eosinófilos, parece contribuir para a polarização da resposta imune TH2 (MOSMANN e COFFMAN, 1989; REIMAN *et al.*, 2006). A ação dose-dependente da silimarina sobre a diminuição na síntese de IL-4, somado a sua capacidade de aumentar a síntese de IL-10

(SCHUMANN *et al.*, 2003) parece explicar, em parte, a atividade imunomodulatória observada através do infiltrado inflamatório granulomatoso neste trabalho. A interleucina IL-10 tem sido implicada com propriedades antiinflamatórias que regulam as funções das células linfóides e mielóides, sendo reconhecida pela capacidade de suprimir as funções efetoras de macrófagos e linfócitos T (MOORE *et al.*, 1993; SARAIVA e O'GARRA, 2010). Lamentavelmente, por erro metodológico a dosagem das citocinas no soro dos animais tratados, ou não, com silimarina não foi satisfatoriamente obtida.

Estudos em animais experimentais demonstram que a resposta granulomatosa ao redor dos ovos se desenvolve com uma acumulação gradual de células mononucleares, neutrófilos e eosinófilos (HSU *et al.*, 1972), que levam a formação de microabscessos neutrofílicos característicos do estágio exsudativo. Com a maturação do granuloma surgem na periferia histiócitos e células epitelióides que gradualmente substituem as zonas leucocitárias, assim como fibrócitos que gradualmente formam uma zona externa ao redor dos histiócitos e das células epitelióides (HURST, WILLINGHAM e LINDBERG, 2000). Com a degeneração e desintegração dos ovos, os fibrócitos e as fibras de colágeno se tornam mais proeminentes, os linfócitos, histiócitos, plasmócitos e alguns eosinófilos formam uma zona adicional na periferia do granuloma (BURKE *et al.*, 2009). Contudo, a área do infiltrado inflamatório tem sido associada positivamente com a deposição de fibrose no tecido hepático (FANNING *et al.*, 1981; CHEEVER *et al.*, 1987; CHESNEY *et al.*, 1998). Em consequência da resposta ao processo inflamatório granulomatoso neste tecido, há uma deposição da fibrose periovular e periportal (ANDRADE, 2009). Os resultados aqui expostos mostram que os animais infectados e tratados com silimarina que apresentaram menores infiltrados inflamatórios ao redor dos granulomas também apresentam uma produção diminuída de fibrose no tecido hepático (como observado nas Figuras 31 e 32). O percentual de redução na deposição de fibrose foi diretamente proporcional ao número de inoculações, onde 10 doses reduziram 27,73%, 20 doses 29,22% e 25 doses 32,85%. Corroborando com estes dados, Boigk e colaboradores (1997), Jia e colaboradores (2001) e Lin e colaboradores (2008) ao avaliarem a atividade antifibrótica da silimarina em diferentes hepatopatias, observaram reduções nos níveis de colágeno hepático de 35, 35 e 25 %, respectivamente. Embora estes resultados possam ser explicados pelo efeito indireto das atividades antiinflamatórias e imunomodulatórias discutidas acima, também pode estar relacionado diretamente ao papel antifibrótico da silimarina.

É interessante notar que apesar dos tratamentos prolongados estarem associados com reduções significativas sugestivas de menor morbidade, o tratamento utilizando 5 doses de

10 mg/kg de silimarina foi responsável pela maior inibição na concentração de colágeno no tecido hepático. Desde modo, esta atividade antifibrótica da silimarina observada através da quantificação de hidroxiprolina parece ser parcialmente reversível, já que esta acentuada redução observada no grupo (I+SIL 10 -5D- 48h) não apresentou a mesma expressão nos tratamentos prolongados, possivelmente relacionada com vias alternativas no complemento das reações inflamatórias e/ou fibróticas. Contudo, tal dado parece paradoxal e necessita de novas avaliações pelo nosso grupo.

Avaliações em modelos experimentais mostram que a resposta inflamatória é essencial para a sobrevivência dos camundongos, como demonstrado por Amiri e colaboradores (1992) que correlacionaram a total ausência de infiltrado inflamatório periovular com o aumento da necrose hepática e conseqüentemente mortalidade. Nos ensaios realizados neste trabalho, foi observado que a modulação nas áreas dos granulomas e a menor deposição de fibrose não proporcionaram aumento na necrose hepática, assim como na taxa de mortalidade. A relação entre uma reação granulomatosa insuficiente e as lesões no tecido hepático podem ser avaliadas através dos marcadores específicos das células hepáticas, como as enzimas liberadas em decorrência de algumas hepatopatias. A silimarina é utilizada como controle positivo na descoberta de novos fármacos que atuem sobre hepatopatias, principalmente por estabilizar e regular a permeabilidade da membrana celular (CHANNABASAVARAJ, BADAMI e BHOJRAJ, 2008).

Muitos fatores são relacionados com o processo imunológico, antiinflamatório e antifibrótico na esquistossomíase. Vários genes de codificação dos fatores de transcrição estão envolvidos na atividade de regulação dos linfócitos T. Em particular, o NF- κ B, um regulador pleiotrópico que coordena a expressão de vários genes envolvidos na inflamação, morte, diferenciação e crescimento celular (RAMASAMY e AGARWAL, 2008). Inúmeros estudos demonstram que a silimarina é um potente inibidor deste fator de transcrição (RAMASAMY e AGARWAL, 2008; GHARAGOZLOO *et al.*, 2010). A relação entre a ativação do NF- κ B e a fibrose periportal induzida pelo *Schistosoma mansoni* foi recentemente demonstrada através da observação de 40 pacientes diagnosticados com esquistossomíase hepatoesplênica (BRAZ *et al.*, 2010). Estes autores mostraram que a ativação insuficiente do complexo NF- κ B aumenta efetivamente a apoptose das células estreladas hepáticas (HSCs). De modo que, a inibição ou diminuição da ação de NF- κ B pode estar relacionada com o número de HSCs ativadas e a conseqüente redução de fibrose associada a estas células. Talvez este seja um mecanismo que explique, ao menos parcialmente, a ação da silimarina reduzindo a fibrose neste trabalho.

Além do mais, Lin e colaboradores (2007) avaliaram o efeito da administração oral da silimarina misturada com carboximetilcelulose em ratos com fibrose hepática induzida por dimetilnitrosamina e observaram uma redução significativa na deposição de fibrose no tecido hepático com uma diminuição dos marcadores de células estreladas α -SMA e da translocação nuclear de NF- κ B. Além destes resultados foi observado ainda uma redução nos níveis de mRNA de TGF- β 1, α -SMA, cadeia α 2 do colágeno tipo I, iNOS e ICAM-1. Contudo, diferente dos autores acima citados, já foi demonstrado que a ativação do NF- κ B contribui no processo inflamatório dos macrófagos hepáticos, porém não parece ser essencial para a proliferação e ativação das HSCs (SON *et al.*, 2007).

As células estreladas estão diretamente envolvidas nas alterações patológicas que levam ao desenvolvimento da fibrose hepática (WASMUTH e WEISKIRCHEN, 2010). A ativação destas células por fatores de crescimento, citocinas e quimiocinas produzidas pelos efetores inflamatórios como os linfócitos T e as células de Kupffer, resultam na perda da capacidade das HSCs de armazenarem retinóides e na consequente ativação destas células em miofibroblastos contráteis, que além de se tornarem a principal via fibrogênica hepática, podem ampliar a resposta inflamatória, induzindo a infiltração de leucócitos mono e polimorfonucleares, produzindo peptídeo quimiotático de monócitos (MCP)-1, CCL-21, RANTES e CCR5 (FRIEDMAN, 2008). Estas quimiocinas podem estimular a proliferação ou apoptose dos linfócitos (BONACCHI *et al.*, 2003; KOBAYASHI *et al.*, 2003). O efeito antifibrótico da silimarina em hepatopatias experimentais é provavelmente mediado pela inibição das células estreladas (CROCENZI e ROMA, 2006). A utilização da silimarina parecem envolver os mecanismos de inibição da expressão do procolágeno alpha 1 (I), metaloproteinases I e a citocina profibrogênica TGF- β 1 (FUCHS, WEYHENMEYER e WEINER, 1997; JIA *et al.*, 2001). Além destes mecanismos, a silibina parece inibir as células de Kupffer, responsáveis pela proliferação e ativação das células estreladas, por inibir a via 5-lipoxigenase (DEHMLow, ERHARD e DE GROOT, 1996). Além disso, o não desenvolvimento de fibrose hepática grave na esquistossomíase há muito é relacionado com a deficiência da interleucina IL-13 no modelo murino (FALLON *et al.*, 2000), o que justificaria a avaliação da silimarina frente esta infecção, já que trabalhos recentes confirmam a capacidade da silibina em diminuir significativamente os níveis de várias citocinas e interleucinas, incluindo a IL-13 (47% de redução) (TYAGI *et al.*, 2009). Os resultados presentes neste trabalho podem ser explicados por vários dos fatores acima citados. Novos ensaios serão realizados por nosso grupo com o objetivo de elucidar os mecanismos envolvidos com a redução do tamanho dos granulomas e da fibrose hepática pela silimarina.

Os comprometimentos orgânicos causados pela esquistossomíase podem afetar vários órgãos, a patologia é relacionada com a capacidade dos ovos em estimularem uma resposta reacional inflamatória exacerbada, com conseqüente deposição de colágeno. A área do granuloma hepático pode ser cem vezes maior do que a do ovo (LEÃO *et al.*, 1997). No entanto, a presença do granuloma associada a deposição de fibrose amplificam as alterações anatomopatológicas, associadas com hepatoesplenomegalia (principal indicador da morbidade da doença). Estes parâmetros também foram avaliados, no final do tratamento, através dos índices hepáticos e esplênicos. Assim, como os animais tratados com silimarina que apresentaram uma menor área no infiltrado inflamatório e menor deposição de colágeno hepático, também foi observado uma diminuição do índice hepático. Deste modo, a redução da hepatomegalia observada parece ter correlação com o processo granulomatoso e a deposição de fibrose, como já demonstrado anteriormente (FANNING *et al.*, 1981; CHEEVER *et al.*, 1987; CHESNEY *et al.*, 1998). A redução do peso do fígado dos animais tratados com silimarina pode refletir na diminuição da hipertensão portal, conseqüentemente menor morbidade nesta patologia.

A relação da silimarina sobre o processo inflamatório tem sido amplamente avaliada (GHARAGOZLOO e AMIRGHOFAN, 2007; POLYAK *et al.*, 2007; KUO e JAN, 2009; GHARAGOZLOO *et al.*, 2010). Porém, a diminuição do infiltrado inflamatório periovular hepático, não parece ter relação com uma possível atividade da silimarina sobre o tecido esplênico, já que não foi observado diferenças quanto ao índice do baço. Este fato indica que o efeito da silimarina sobre a modulação periovular esta provavelmente relacionada com a reação granulomatosa em si e não sobre o processo inflamatório em geral, que com muita frequência leva a esplenomegalia. Como tem sido enfatizado por Lambertucci e colaboradores (2001) ao observar que a esquistossomíase pode ser encontrada com ou sem esplenomegalia.

Devido ao grande número de propriedades descritas à silimarina as análises de seus componentes isolados estão sendo cada vez mais investigadas. O complexo silimarina é constituído por aproximadamente 65-80% de flavolignanas, pequena quantidade de flavonóides e cerca de 20-35% de ácidos graxos e outros compostos polifenólicos (RAMASAMY e AGARWAL, 2008). No entanto, a amplitude das atividades dos constituintes deste produto podem potencialmente prevenir e/ou amenizar inúmeras patologias. Atualmente, as pesquisas científicas buscam relacionar os diversos aspectos do potencial terapêutico da silimarina com neoplasias, infecções virais, bacterianas e parasitárias.

A discussão sobre a compreensão dos mecanismos imunopatogênicos elucidadas nos camundongos não são facilmente comparadas com os mecanismos dos seres humanos, de

modo que o conhecimento da resposta na esquistossomíase em humanos esta longe de terminar (BURKE *et al.*, 2009). No entanto, os mecanismos envolvidos nas propriedades da silimarina no modelo murino podem auxiliar a elucidar a progressão desta morbidade, e assim minimizar as alterações anatomopatológicas da fase crônica, principal determinante dos índices de mortalidade desta infecção.

Os resultados obtidos neste trabalho indicam que o tratamento com silimarina leva a uma redução do processo granulomatoso periovular e a uma redução da fibrose hepática. Tais resultados, aliados à menor hepatomegalia podem refletir na diminuição da morbidade desta importante infecção parasitaria, a esquistossomíase.

CONCLUSÃO

A administração de silimarina pela via oral promoveu redução da hepatomegalia nas concentrações de 2, 10 e 50 mg/kg. No entanto, esta via se mostrou inapropriada para este modelo experimental, como demonstrado pelo comprometimento orgânico dos animais, avaliado através da curva ponderal e taxa de mortalidade. Com a administração de silimarina pela via intraperitoneal foi observada uma redução do infiltrado inflamatório granulomatoso periovular, da deposição de fibrose hepática (quantificada pela dosagem de hidroxiprolina), e da hepatomegalia. Estes resultados são relacionados com uma menor morbidade na esquistossomíase.

O prolongamento do tratamento durante a fase aguda da infecção pelo *S. mansoni*, utilizando as concentrações de 2 e 10 mg/kg de silimarina administradas em intervalos de 24 e 48 horas, respectivamente, promovem reduções ainda mais significativas. Como na fase crônica da infecção esquistossomótica a fibrose é mais acentuada, acredita-se que os resultados do tratamento com a silimarina na referida fase poderão ser ainda mais marcantes e benéficos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGOSTON, M.; CABELLO, R. G.; BLAZOVICS, A.; FEHER, J. e VERECKEI, A. The effect of amiodarone and/or antioxidant treatment on splenocyte blast transformation. **Clin Chim Acta** [S.I.], v. 303, n. 1-2, p. 87-94, 2001.
- AMIRI, P.; LOCKSLEY, R. M.; PARSLOW, T. G.; SADICK, M.; RECTOR, E.; RITTER, D. e MCKERROW, J. H. Tumour necrosis factor alpha restores granulomas and induces parasite egg-laying in schistosome-infected SCID mice. **Nature** [S.I.], v. 356, n. 6370, p. 604-7, 1992.
- ANDRADE, Z. A. Schistosomiasis and liver fibrosis. **Parasite Immunol** [S.I.], v. 31, n. 11, p. 656-63, 2009.
- ANDRADE, Z. A. e DE AZEVEDO, T. M. A contribution to the study of acute schistosomiasis (an experimental trial). **Mem Inst Oswaldo Cruz** [S.I.], v. 82, n. 3, p. 311-7, 1987.
- ANDRADE, Z. A. e PRATA, A. Asymptomatic Schistosomiasis Studied by Needle Biopsy of the Liver. **Am J Trop Med Hyg** [S.I.], v. 12, p. 854-8, 1963.
- ANDRADE, Z. A. e SADIGURSKY, M. [A comparative study of the Feira de Santana (Bahia) and Porto Rico strains of *Schistosoma mansoni* in experimental infection of mice]. **Mem Inst Oswaldo Cruz** [S.I.], v. 80, n. 1, p. 37-40, 1985.
- ANTWEILER, H. Silymarin and polyvinylpyridine-N-oxide as experimental antagonists of the intoxication by *Amanita phalloides* or its single toxins. **Curr Probl Clin Biochem** [S.I.], v. 7, p. 111-20, 1977.
- ATTA, A. M.; MAGALHAES, L. A.; DE ALCANTARA, F. G. e PAREJA, G. [Schistosomiasis mansoni. I. Evolution of the pathologic picture: parasitologic, hematologic and histopathologic analyses]. **Rev Saude Publica** [S.I.], v. 15, n. 1, p. 72-92, 1981.
- BICALHO, S. A. [Tumoral form of schistosomiasis mansoni]. **AMB Rev Assoc Med Bras** [S.I.], v. 24, n. 1, p. 31-35, 1978.
- BOGLIOLO, L. Anatomical picture of liver in hepatosplenic schistosomiasis mansoni. **Ann. Trop. Med. Parasitol.** [S.I.], v. 51, p. 1-14, 1957.
- BOIGK, G.; STROEDTER, L.; HERBST, H.; WALDSCHMIDT, J.; RIECKEN, E. O. e SCHUPPAN, D. Silymarin retards collagen accumulation in early and advanced biliary fibrosis secondary to complete bile duct obliteration in rats. **Hepatology** [S.I.], v. 26, n. 3, p. 643-9, 1997.
- BONACCHI, A.; PETRAI, I.; DEFRANCO, R. M.; LAZZERI, E.; ANNUNZIATO, F.; EFSEN, E.; COSMI, L.; ROMAGNANI, P.; MILANI, S.; FAILLI, P.; BATIGNANI, G.; LIOTTA, F.; LAFFI, G.; PINZANI, M.; GENTILINI, P. e MARRA, F. The chemokine CCL21 modulates lymphocyte recruitment and fibrosis in chronic hepatitis C. **Gastroenterology** [S.I.], v. 125, n. 4, p. 1060-76, 2003.

BOOTH, M.; MWATHA, J. K.; JOSEPH, S.; JONES, F. M.; KADZO, H.; IRERI, E.; KAZIBWE, F.; KEMIJUMBI, J.; KARIUKI, C.; KIMANI, G.; OUMA, J. H.; KABATEREINE, N. B.; VENNERVALD, B. J. e DUNNE, D. W. Periportal fibrosis in human *Schistosoma mansoni* infection is associated with low IL-10, low IFN-gamma, high TNF-alpha, or low RANTES, depending on age and gender. **J Immunol** [S.I.], v. 172, n. 2, p. 1295-303, 2004.

BOROJEVIC, R. e GRIMAUD, J. A. Collagen fibers in enlarged basement membranes in human schistosomal liver and spleen. **Cell Mol. Biol.** [S.I.], v. 26, n. 2, p. 247-50, 1980.

BOROS, D. L. Immunopathology of *Schistosoma mansoni* infection. **Clin. Microbiol. Rev.** [S.I.], v. 2, n. 3, p. 250-69, 1989.

BRAZ, M. M.; RAMALHO, F. S.; CARDOSO, R. L.; ZUCOLOTO, S.; COSTA, R. S. e RAMALHO, L. N. Slight activation of nuclear factor kappa-B is associated with increased hepatic stellate cell apoptosis in human schistosomal fibrosis. **Acta Trop** [S.I.], v. 113, n. 1, p. 66-71, 2010.

BRIDLE, K. R.; CRAWFORD, D. H. e RAMM, G. A. Identification and characterization of the hepatic stellate cell transferrin receptor. **Am J Pathol** [S.I.], v. 162, n. 5, p. 1661-7, 2003.

BRITO, T. D.; NUSSENZVEIG, I.; CARNEIRO, C. R. e SILVA, A. M. *Schistosoma mansoni* associated glomerulopathy. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo** [S.I.], v. 41, n. 5, p. 269-72, 1999.

BRUNET, L. R.; FINKELMAN, F. D.; CHEEVER, A. W.; KOPF, M. A. e PEARCE, E. J. IL-4 protects against TNF-alpha-mediated cachexia and death during acute schistosomiasis. **J Immunol.** [S.I.], v. 159, n. 2, p. 777-85, 1997.

BURKE, M. L.; JONES, M. K.; GOBERT, G. N.; LI, Y. S.; ELLIS, M. K. e MCMANUS, D. P. Immunopathogenesis of human schistosomiasis. **Parasite Immunol** [S.I.], v. 31, n. 4, p. 163-76, 2009.

CHANNABASAVARAJ, K. P.; BADAMI, S. e BHOJRAJ, S. Hepatoprotective and antioxidant activity of methanol extract of *Ficus glomerata*. **J Nat Med** [S.I.], v. 62, n. 3, p. 379-83, 2008.

CHEEVER, A. W. Conditions affecting the accuracy of potassium hydroxide digestion techniques for counting *Schistosoma mansoni* eggs in tissues. **Bull. World Health Organ.** [S.I.], v. 39, n. 2, p. 328-31, 1968a.

CHEEVER, A. W. A quantitative post-mortem study of Schistosomiasis mansoni in man. **Am J Trop Med Hyg** [S.I.], v. 17, n. 1, p. 38-64, 1968b.

CHEEVER, A. W.; DUNN, M. A.; DEAN, D. A. e DUVALL, R. H. Differences in hepatic fibrosis in ICR, C3H, and C57BL/6 mice infected with *Schistosoma mansoni*. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** [S.I.], v. 32, n. 6, p. 1364-9, 1983.

CHEEVER, A. W.; DUVALL, R. H.; HALLACK, T. A., JR.; MINKER, R. G.; MALLEY, J.

D. e MALLEY, K. G. Variation of hepatic fibrosis and granuloma size among mouse strains infected with *Schistosoma mansoni*. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** [S.I.], v. 37, n. 1, p. 85-97, 1987.

CHEEVER, A. W.; MACEDONIA, J. G.; MOSIMANN, J. E. e CHEEVER, E. A. Kinetics of egg production and egg excretion by *Schistosoma mansoni* and *S. japonicum* in mice infected with a single pair of worms. **Am J Trop Med Hyg** [S.I.], v. 50, n. 3, p. 281-95, 1994.

CHEEVER, A. W.; WILLIAMS, M. E.; WYNN, T. A.; FINKELMAN, F. D.; SEDER, R. A.; COX, T. M.; HIENY, S.; CASPAR, P. e SHER, A. Anti-IL-4 treatment of *Schistosoma mansoni*-infected mice inhibits development of T cells and non-B, non-T cells expressing Th2 cytokines while decreasing egg-induced hepatic fibrosis. **J. Immunol.** [S.I.], v. 153, n. 2, p. 753-9, 1994.

CHESNEY, J.; METZ, C.; STAVITSKY, A. B.; BACHER, M. e BUCALA, R. Regulated production of type I collagen and inflammatory cytokines by peripheral blood fibrocytes. **J Immunol** [S.I.], v. 160, n. 1, p. 419-25, 1998.

CHIARAMONTE, M. G.; CHEEVER, A. W.; MALLEY, J. D.; DONALDSON, D. D. e WYNN, T. A. Studies of murine schistosomiasis reveal interleukin-13 blockade as a treatment for established and progressive liver fibrosis. **Hepatology** [S.I.], v. 34, n. 2, p. 273-82, 2001.

CHITSULO, L.; ENGELS, D.; MONTRESOR, A. e SAVIOLI, L. The global status of schistosomiasis and its control. **Acta Trop** [S.I.], v. 77, n. 1, p. 41-51, 2000.

COKER, C. Effect of cortisone on natural immunity to *Schistosoma mansoni* in mice. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.** [S.I.], v. 96, p. 1-3, 1957.

CONSELHO, F. D. M. V. Resolução nº 714, de 20 de junho de 2002. Dispões sobre procedimentos e métodos de eutanásia em animais, e dá outras providências., 2002.

COUTINHO, A. e LOUREIRO, P. [Biochemical aspects of hepatic insufficiency in hepatosplenic schistosomiasis manonsoni.]. **Hospital (Rio J)** [S.I.], v. 58, p. 885-902, 1960.

COUTINHO, E. M.; FERREIRA, H. S.; DE FREITAS, L. P.; SILVA, M. R.; CAVALCANTI, C. L. e SAMICO MDE, J. Nutrition and acute schistosomiasis. **Mem Inst Oswaldo Cruz** [S.I.], v. 87 Suppl 4, p. 297-301, 1992.

COUTO, J. L.; FERREIRA HDA, S.; DA ROCHA, D. B.; DUARTE, M. E.; ASSUNCAO, M. L. e COUTINHO EDE, M. Structural changes in the jejunal mucosa of mice infected with *Schistosoma mansoni*, fed low or high protein diets. **Rev Soc Bras Med Trop** [S.I.], v. 35, n. 6, p. 601-7, 2002.

CROCENZI, F. A. e ROMA, M. G. Silymarin as a new hepatoprotective agent in experimental cholestasis: new possibilities for an ancient medication. **Curr Med Chem** [S.I.], v. 13, n. 9, p. 1055-74, 2006.

CUNHA, A. S. **Esquistossomose Mansônica**. São Paulo, 1970.

DAVIES, S. J. e MCKERROW, J. H. Developmental plasticity in schistosomes and other

helminths. **Int J Parasitol** [S.I.], v. 33, n. 11, p. 1277-84, 2003.

DE JESUS, A. R.; SILVA, A.; SANTANA, L. B.; MAGALHAES, A.; DE JESUS, A. A.; DE ALMEIDA, R. P.; REGO, M. A.; BURATTINI, M. N.; PEARCE, E. J. e CARVALHO, E. M. Clinical and immunologic evaluation of 31 patients with acute schistosomiasis mansoni. **J Infect Dis** [S.I.], v. 185, n. 1, p. 98-105, 2002.

DEELDER, A. M.; MILLER, R. L.; DE JONGE, N. e KRIJGER, F. W. Detection of schistosome antigen in mummies. **Lancet** [S.I.], v. 335, n. 8691, p. 724-5, 1990.

DEEP, G. e AGARWAL, R. Chemopreventive efficacy of silymarin in skin and prostate cancer. **Integr Cancer Ther** [S.I.], v. 6, n. 2, p. 130-45, 2007.

DEEP, G.; OBERLIES, N. H.; KROLL, D. J. e AGARWAL, R. Isosilybin B and isosilybin A inhibit growth, induce G1 arrest and cause apoptosis in human prostate cancer LNCaP and 22Rv1 cells. **Carcinogenesis** [S.I.], v. 28, n. 7, p. 1533-42, 2007.

DEEP, G.; OBERLIES, N. H.; KROLL, D. J. e AGARWAL, R. Isosilybin B causes androgen receptor degradation in human prostate carcinoma cells via PI3K-Akt-Mdm2-mediated pathway. **Oncogene** [S.I.], v. 27, n. 28, p. 3986-98, 2008.

DEHMLow, C.; ERHARD, J. e DE GROOT, H. Inhibition of Kupffer cell functions as an explanation for the hepatoprotective properties of silibinin. **Hepatology** [S.I.], v. 23, n. 4, p. 749-54, 1996.

DESPRES, L.; IMBERT-ESTABLET, D. e MONNEROT, M. Molecular characterization of mitochondrial DNA provides evidence for the recent introduction of *Schistosoma mansoni* into America. **Mol Biochem Parasitol** [S.I.], v. 60, n. 2, p. 221-9, 1993.

DESSEIN, A. J.; COUISSINIER, P.; DEMEURE, C.; RIHET, P.; KOHLSTAEDT, S.; CARNEIRO-CARVALHO, D.; OUATTARA, M.; GOUDOT-CROZEL, V.; DESSEIN, H. e BOURGOIS, A. Environmental, genetic and immunological factors in human resistance to *Schistosoma mansoni*. **Immunol. Invest.** [S.I.], v. 21, n. 5, p. 423-53, 1992.

DOMINGO, E. O. e WARREN, K. S. Endogenous desensitization: changing host granulomatous response to schistosome eggs at different stages of infection with *Schistosoma mansoni*. **Am. J. Pathol.** [S.I.], v. 52, n. 2, p. 369-79, 1968.

FALLON, P. G. e DOENHOFF, M. J. Drug-resistant schistosomiasis: resistance to praziquantel and oxamniquine induced in *Schistosoma mansoni* in mice is drug specific. **Am J Trop Med Hyg** [S.I.], v. 51, n. 1, p. 83-8, 1994.

FALLON, P. G.; RICHARDSON, E. J.; MCKENZIE, G. J. e MCKENZIE, A. N. Schistosome infection of transgenic mice defines distinct and contrasting pathogenic roles for IL-4 and IL-13: IL-13 is a profibrotic agent. **J. Immunol.** [S.I.], v. 164, n. 5, p. 2585-91, 2000.

FANNING, M. M.; PETERS, P. A.; DAVIS, R. S.; KAZURA, J. W. e MAHMOUD, A. A. Immunopathology of murine infection with *Schistosoma mansoni*: relationship of genetic background to hepatosplenic disease and modulation. **J. Infect. Dis.** [S.I.], v. 144, n. 2, p.

148-53, 1981.

FERENCI, P.; SCHERZER, T. M.; KERSCHNER, H.; RUTTER, K.; BEINHARDT, S.; HOFER, H.; SCHONIGER-HEKELE, M.; HOLZMANN, H. e STEINDL-MUNDA, P. Silibinin is a potent antiviral agent in patients with chronic hepatitis C not responding to pegylated interferon/ribavirin therapy. **Gastroenterology** [S.I.], v. 135, n. 5, p. 1561-7, 2008.

FERRAZ, A. A.; BACELAR, T. S.; SILVEIRA, M. J.; COELHO, A. R.; CAMARA NETO, R. D.; DE ARAUJO JUNIOR, J. G. e FERRAZ, E. M. Surgical treatment of schistosomal portal hypertension. **Int Surg** [S.I.], v. 86, n. 1, p. 1-8, 2001.

FERRAZ, A. A.; LOPES, E. P.; BARROS, F. M.; SETTE, M. J.; ARRUDA, S. M. e FERRAZ, E. M. [Splenectomy plus left gastric vein ligation and devascularization of the great curvature of the stomach in the treatment of hepatosplenic schistosomiasis. Postoperative endoscopic sclerosis is necessary?]. **Arq Gastroenterol** [S.I.], v. 38, n. 2, p. 84-8, 2001.

FERREIRA, H. S. e COUTINHO, E. M. Should nutrition be considered as a supplementary measure in schistosomiasis control? **Ann Trop Med Parasitol** [S.I.], v. 93, n. 5, p. 437-47, 1999.

FERREIRA, H. S.; COUTINHO, E. M.; TEODOSIO, N. R.; CAVALCANTI, C. L. e SAMICO MDE, J. Intestinal protein absorption in malnourished mice with acute schistosomiasis mansoni. **Mem Inst Oswaldo Cruz** [S.I.], v. 88, n. 4, p. 581-7, 1993.

FINKELMAN, F. D.; HOLMES, J.; KATONA, I. M.; URBAN, J. F., JR.; BECKMANN, M. P.; PARK, L. S.; SCHOOLEY, K. A.; COFFMAN, R. L.; MOSMANN, T. R. e PAUL, W. E. Lymphokine control of in vivo immunoglobulin isotype selection. **Annu Rev Immunol** [S.I.], v. 8, p. 303-33, 1990.

FINKELMAN, F. D.; KATONA, I. M.; URBAN, J. F., JR.; SNAPPER, C. M.; OHARA, J. e PAUL, W. E. Suppression of in vivo polyclonal IgE responses by monoclonal antibody to the lymphokine B-cell stimulatory factor 1. **Proc Natl Acad Sci U S A** [S.I.], v. 83, n. 24, p. 9675-8, 1986.

FLORA, K.; HAHN, M.; ROSEN, H. e BENNER, K. Milk thistle (*Silybum marianum*) for the therapy of liver disease. **Am J Gastroenterol** [S.I.], v. 93, n. 2, p. 139-43, 1998.

FLORES VILLANUEVA, P. O.; REISER, H. e STADECKER, M. J. Regulation of T helper cell responses in experimental murine schistosomiasis by IL-10. Effect on expression of B7 and B7-2 costimulatory molecules by macrophages. **J. Immunol.** [S.I.], v. 153, n. 11, p. 5190-9, 1994.

FREITAS, C. R.; BARBOSA, A. A., JR.; FERNANDES, A. L. e ANDRADE, Z. A. Pathology of the spleen in hepatosplenic schistosomiasis. Morphometric evaluation and extracellular matrix changes. **Mem Inst Oswaldo Cruz** [S.I.], v. 94, n. 6, p. 815-22, 1999.

FRIEDMAN, S. L. Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury. **J Biol Chem** [S.I.], v. 275, n. 4, p. 2247-50, 2000.

FRIEDMAN, S. L. Hepatic stellate cells: protean, multifunctional, and enigmatic cells of the liver. **Physiol Rev** [S.I.], v. 88, n. 1, p. 125-72, 2008.

FUCHS, E. C.; WEYHENMEYER, R. e WEINER, O. H. Effects of silibinin and of a synthetic analogue on isolated rat hepatic stellate cells and myofibroblasts. **Arzneimittelforschung** [S.I.], v. 47, n. 12, p. 1383-7, 1997.

GALHARDI, F.; MESQUITA, K.; MONSERRAT, J. M. e BARROS, D. M. Effect of silymarin on biochemical parameters of oxidative stress in aged and young rat brain. **Food Chem Toxicol** [S.I.], v. 47, n. 10, p. 2655-60, 2009.

GALLO, D.; GIACOMELLI, S.; FERLINI, C.; RASPAGLIO, G.; APOLLONIO, P.; PRISLEI, S.; RIVA, A.; MORAZZONI, P.; BOMBARDELLI, E. e SCAMBIA, G. Antitumour activity of the silybin-phosphatidylcholine complex, IdB 1016, against human ovarian cancer. **Eur J Cancer** [S.I.], v. 39, n. 16, p. 2403-10, 2003.

GEORGI, J. R.; WADE, S. E. e DEAN, D. A. *Schistosoma mansoni*: mechanism of attrition and routes of migration from lungs to hepatic portal system in the laboratory mouse. **J Parasitol** [S.I.], v. 73, n. 4, p. 706-11, 1987.

GHARAGOZLOO, M. e AMIRGHOFRAN, Z. Effects of silymarin on the spontaneous proliferation and cell cycle of human peripheral blood leukemia T cells. **J Cancer Res Clin Oncol** [S.I.], v. 133, n. 8, p. 525-32, 2007.

GHARAGOZLOO, M.; VELARDI, E.; BRUSCOLI, S.; AGOSTINI, M.; DI SANTE, M.; DONATO, V.; AMIRGHOFRAN, Z. e RICCARDI, C. Silymarin suppress CD4+ T cell activation and proliferation: Effects on NF-kappaB activity and IL-2 production. **Pharmacol Res** [S.I.], 2010.

GOLDRING, O. L.; CLEGG, J. A.; SMITHERS, S. R. e TERRY, R. J. Acquisition of human blood group antigens by *Schistosoma mansoni*. **Clin Exp Immunol** [S.I.], v. 26, n. 1, p. 181-7, 1976.

GRIMAUD, J. A.; BOROS, D. L.; TAKIYA, C.; MATHEW, R. C. e EMONARD, H. Collagen isotypes, laminin, and fibronectin in granulomas of the liver and intestines of *Schistosoma mansoni*-infected mice. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** [S.I.], v. 37, n. 2, p. 335-44, 1987.

GRYSEELS, B.; POLMAN, K.; CLERINX, J. e KESTENS, L. Human schistosomiasis. **Lancet** [S.I.], v. 368, n. 9541, p. 1106-18, 2006.

HAGAN, P.; NDHLOVU, P. e DUNNE, D. Schistosome Immunology: more questions than answers. **Parasitol. Today** [S.I.], v. 14, n. 10, p. 407-12, 1998.

HANG, L. M.; WARREN, K. S. e BOROS, D. L. *Schistosoma mansoni*: antigenic secretions and the etiology of egg granulomas in mice. **Exp. Parasitol.** [S.I.], v. 35, n. 2, p. 288-98, 1974.

HARRISON, R. A. e DOENHOFF, M. J. Retarded development of *Schistosoma mansoni* in immunosuppressed mice. **Parasitology** [S.I.], v. 86, n. Pt 3, p. 429-38, 1983.

HE, Q.; OSUCHOWSKI, M. F.; JOHNSON, V. J. e SHARMA, R. P. Physiological responses to a natural antioxidant flavonoid mixture, silymarin, in BALB/c mice: I induction of transforming growth factor beta1 and c-myc in liver with marginal effects on other genes. **Planta Med** [S.I.], v. 68, n. 8, p. 676-9, 2002.

HERMETO, M. V.; BICALHO, R. S.; MELO, A. L. e PEREIRA, L. H. Kinetics of the pulmonary phase of *Schistosoma mansoni* in mice treated with dexamethasone. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo** [S.I.], v. 32, n. 3, p. 168-71, 1990.

HESSE, M.; MODOLELL, M.; LA FLAMME, A. C.; SCHITO, M.; FUENTES, J. M.; CHEEVER, A. W.; PEARCE, E. J. e WYNN, T. A. Differential regulation of nitric oxide synthase-2 and arginase-1 by type 1/type 2 cytokines in vivo: granulomatous pathology is shaped by the pattern of L-arginine metabolism. **J Immunol** [S.I.], v. 167, n. 11, p. 6533-44, 2001.

HESSIEN, M.; SHARKAWI, I.; BARBARY, I. e BELTAGY, D. Regression of Thioacetamide, Alcohol and Schistosomiasis Induced Liver Fibrosis in Mice by Silymarin. **Turk J Biochem** [S.I.], v. 33, n. 4, p. 131-137, 2009.

HIRSH, B. C. e JOHNSON, W. C. Concepts of granulomatous inflammation. **Int J Dermatol** [S.I.], v. 23, n. 2, p. 90-100, 1984.

HOFFMANN, K. F.; CHEEVER, A. W. e WYNN, T. A. IL-10 and the dangers of immune polarization: excessive type 1 and type 2 cytokine responses induce distinct forms of lethal immunopathology in murine schistosomiasis. **J. Immunol.** [S.I.], v. 164, n. 12, p. 6406-16, 2000.

HOFFMANN, K. F.; JAMES, S. L.; CHEEVER, A. W. e WYNN, T. A. Studies with double cytokine-deficient mice reveal that highly polarized Th1- and Th2-type cytokine and antibody responses contribute equally to vaccine-induced immunity to *Schistosoma mansoni*. **J. Immunol.** [S.I.], v. 163, n. 2, p. 927-38, 1999.

HOOFNAGLE, J. H. Milk thistle and chronic liver disease. **Hepatology** [S.I.], v. 42, n. 1, p. 4, 2005.

HSU, S. Y.; HSU, H. F.; DAVIS, J. R. e LUST, G. L. Comparative studies on the lesions caused by eggs of *Schistosoma japonicum* and *Schistosoma mansoni* in livers of albino mice and rhesus monkeys. **Ann Trop Med Parasitol** [S.I.], v. 66, n. 1, p. 89-97, 1972.

HUBER, A.; THONGPHASUK, P.; ERBEN, G.; LEHMANN, W. D.; TUMA, S.; STREMMEL, W. e CHAMULITRAT, W. Significantly greater antioxidant anticancer activities of 2,3-dehydrosilybin than silybin. **Biochim Biophys Acta** [S.I.], v. 1780, n. 5, p. 837-47, 2008.

HURST, M. H.; WILLINGHAM, A. L., 3RD e LINDBERG, R. Tissue responses in experimental schistosomiasis japonica in the pig: a histopathologic study of different stages of single low- or high-dose infections. **Am J Trop Med Hyg** [S.I.], v. 62, n. 1, p. 45-56, 2000.

JIA, J. D.; BAUER, M.; CHO, J. J.; RUEHL, M.; MILANI, S.; BOIGK, G.; RIECKEN, E. O.

e SCHUPPAN, D. Antifibrotic effect of silymarin in rat secondary biliary fibrosis is mediated by downregulation of procollagen alpha1(I) and TIMP-1. **J Hepatol** [S.I.], v. 35, n. 3, p. 392-8, 2001.

JOHNSON, E. M.; WOOTTON, J. C.; KIMZEY, R.; MCCULLAGH, L.; WESLEY, R.; BYRD, D. C.; SINGH, K. K.; RUBINO, D. e PUCINO, F. Use of herbal therapies by adults seen in an ambulatory care research setting: an exploratory survey. **J Altern Complement Med** [S.I.], v. 6, n. 5, p. 429-35, 2000.

JOHNSON, V. J.; HE, Q.; OSUCHOWSKI, M. F. e SHARMA, R. P. Physiological responses of a natural antioxidant flavonoid mixture, silymarin, in BALB/c mice: III. Silymarin inhibits T-lymphocyte function at low doses but stimulates inflammatory processes at high doses. **Planta Med** [S.I.], v. 69, n. 1, p. 44-9, 2003.

JOHNSON, V. J.; OSUCHOWSKI, M. F.; HE, Q. e SHARMA, R. P. Physiological responses to a natural antioxidant flavonoid mixture, silymarin, in BALB/c mice: II. alterations in thymic differentiation correlate with changes in c-myc gene expression. **Planta Med** [S.I.], v. 68, n. 11, p. 961-5, 2002.

KATZ, N. e PEIXOTO, S. V. [Critical analysis of the estimated number of schistosomiasis mansoni carriers in Brazil]. **Rev Soc Bras Med Trop** [S.I.], v. 33, n. 3, p. 303-308, 2000.

KAUR, M. e AGARWAL, R. Silymarin and epithelial cancer chemoprevention: how close we are to bedside? **Toxicol Appl Pharmacol** [S.I.], v. 224, n. 3, p. 350-9, 2007.

KELNER, S. [Critical evaluation of schistosomiasis portal hypertension surgery]. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** [S.I.], v. 87, n. Suppl 4, p. 357-68, 1992.

KHAMMO, N.; BARTLETT, A.; CLOTHIER, R. H. e WHITFIELD, P. J. The attachment of *Schistosoma mansoni* cercariae to human skin cells. **Parasitology** [S.I.], v. 124, n. Pt 1, p. 25-30, 2002.

KOBAYASHI, S.; SEKI, S.; KAWADA, N.; MORIKAWA, H.; NAKATANI, K.; UYAMA, N.; IKEDA, K.; NAKAJIMA, Y.; ARAKAWA, T. e KANEDA, K. Apoptosis of T cells in the hepatic fibrotic tissue of the rat: a possible inducing role of hepatic myofibroblast-like cells. **Cell Tissue Res** [S.I.], v. 311, n. 3, p. 353-64, 2003.

KOHNO, H.; TANAKA, T.; KAWABATA, K.; HIROSE, Y.; SUGIE, S.; TSUDA, H. e MORI, H. Silymarin, a naturally occurring polyphenolic antioxidant flavonoid, inhibits azoxymethane-induced colon carcinogenesis in male F344 rats. **Int J Cancer** [S.I.], v. 101, n. 5, p. 461-8, 2002.

KONDOU, H.; MUSHIAKE, S.; ETANI, Y.; MIYOSHI, Y.; MICHIGAMI, T. e OZONO, K. A blocking peptide for transforming growth factor-beta1 activation prevents hepatic fibrosis in vivo. **J Hepatol** [S.I.], v. 39, n. 5, p. 742-8, 2003.

KREN, V. e WALTEROVA, D. Silybin and silymarin--new effects and applications. **Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub** [S.I.], v. 149, n. 1, p. 29-41, 2005.

KUO, F. H. e JAN, T. R. Silibinin attenuates antigen-specific IgE production through the

modulation of Th1/Th2 balance in ovalbumin-sensitized BALB/c mice. **Phytomedicine** [S.I.], v. 16, n. 2-3, p. 271-6, 2009.

KVASNICKA, F.; BIBA, B.; SEVCIK, R.; VOLDRICH, M. e KRATKA, J. Analysis of the active components of silymarin. **J Chromatogr A** [S.I.], v. 990, n. 1-2, p. 239-45, 2003.

LAMBERTUCCI, J. R.; COTA, G. F.; PINTO-SILVA, R. A.; SERUFO, J. C.; GERSPACHER-LARA, R.; COSTA DRUMMOND, S.; ANTUNES, C. M.; NOBRE, V. e RAYES, A. Hepatosplenic schistosomiasis in field-based studies: a combined clinical and sonographic definition. **Mem Inst Oswaldo Cruz** [S.I.], v. 96 Suppl, p. 147-50, 2001.

LAMBERTUCCI, J. R.; MODHA, J.; CURTIS, R. e DOENHOFF, M. The association of steroids and schistosomicides in the treatment of experimental schistosomiasis. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** [S.I.], v. 83, n. 3, p. 354-7, 1989.

LANG, I.; DEAK, G.; NEKAM, K.; MUZES, G.; GONZALEZ-CABELLO, R.; GERGELY, P. e FEHER, J. Hepatoprotective and immunomodulatory effects of antioxidant therapy. **Acta Med Hung** [S.I.], v. 45, n. 3-4, p. 287-95, 1988.

LAWLEY, T. J.; OTTESEN, E. A.; HIATT, R. A. e GAZZE, L. A. Circulating immune complexes in acute schistosomiasis. **Clin Exp Immunol** [S.I.], v. 37, n. 2, p. 221-7, 1979.

LEÃO, R. N. Q.; BICHARA, C. N. C.; SOARES, I. S. e RODRIGUES, I. R. C. Doenças Infecciosas e Parasitárias Enfoque Amazônico *Doenças Infecciosas e Parasitárias*. Belém: Cejup: UEPA Instituto Evandro Chagas, 1997.

LEE, D. G.; KIM, H. K.; PARK, Y.; PARK, S. C.; WOO, E. R.; JEONG, H. G. e HAHM, K. S. Gram-positive bacteria specific properties of silybin derived from *Silybum marianum*. **Arch Pharm Res** [S.I.], v. 26, n. 8, p. 597-600, 2003.

LENZI, H. L.; LENZI, J. A.; KERR, I. B.; ANTUNES, S. L.; MOTA, E. M. e OLIVEIRA, D. N. Extracellular matrix in parasitic and infectious diseases. **Mem Inst Oswaldo Cruz** [S.I.], v. 86 Suppl 3, p. 77-90, 1991.

LENZI, H. L.; LENZI, J. A. e SOBRAL, A. C. Eosinophils favor the passage of eggs to the intestinal lumen in schistosomiasis. **Braz. J. Med. Biol. Res.** [S.I.], v. 20, n. 3-4, p. 433-5, 1987.

LIN, C. C.; TSAI, C. C. e YEN, M. H. The evaluation of hepatoprotective effects of Taiwan folk medicine 'teng-khia-u'. **J Ethnopharmacol** [S.I.], v. 45, n. 2, p. 113-23, 1995.

LIN, Y. L.; HSU, Y. C.; CHIU, Y. T. e HUANG, Y. T. Antifibrotic effects of a herbal combination regimen on hepatic fibrotic rats. **Phytother Res** [S.I.], 2007.

LUPER, S. A review of plants used in the treatment of liver disease: part 1. **Altern Med Rev** [S.I.], v. 3, n. 6, p. 410-21, 1998.

MACHICAO, F. e SONNENBICHLER, J. Mechanism of the stimulation of RNA synthesis in rat liver nuclei by silybin. **Hoppe Seylers Z Physiol Chem** [S.I.], v. 358, n. 2, p. 141-7, 1977.

MCKERROW, J. e SALTER, J. Invasion of skin by *Schistosoma cercariae*. **Trends Parasitol** [S.I.], v. 18, n. 5, p. 193-5, 2002.

MCLAREN, D. J. *Schistosoma mansoni*: The parasite surface in relation to host immunity. New York, 1980.

MEDEIROS, M., JR.; FIGUEIREDO, J. P.; ALMEIDA, M. C.; MATOS, M. A.; ARAUJO, M. I.; CRUZ, A. A.; ATTA, A. M.; REGO, M. A.; DE JESUS, A. R.; TAKETOMI, E. A. e CARVALHO, E. M. *Schistosoma mansoni* infection is associated with a reduced course of asthma. **J Allergy Clin Immunol** [S.I.], v. 111, n. 5, p. 947-51, 2003.

MERONI, P. L.; BARCELLINI, W.; BORGHI, M. O.; VISMARA, A.; FERRARO, G.; CIANI, D. e ZANUSSI, C. Silybin inhibition of human T-lymphocyte activation. **Int J Tissue React** [S.I.], v. 10, n. 3, p. 177-81, 1988.

MONÉ, H. e BOISSIER, J. Sexual biology of schistosomes. **Adv Parasitol** [S.I.], v. 57, p. 89-189, 2004.

MONTENEGRO, S. M.; MIRANDA, P.; MAHANTY, S.; ABATH, F. G.; TEIXEIRA, K. M.; COUTINHO, E. M.; BRINKMAN, J.; GONCALVES, I.; DOMINGUES, L. A.; DOMINGUES, A. L.; SHER, A. e WYNN, T. A. Cytokine production in acute versus chronic human *Schistosomiasis mansoni*: the cross-regulatory role of interferon-gamma and interleukin-10 in the responses of peripheral blood mononuclear cells and splenocytes to parasite antigens. **J Infect Dis** [S.I.], v. 179, n. 6, p. 1502-14, 1999.

MOORE, K. W.; O'GARRA, A.; DE WAAL MALEFYT, R.; VIEIRA, P. e MOSMANN, T. R. Interleukin-10. **Annu Rev Immunol** [S.I.], v. 11, p. 165-90, 1993.

MOREIRA, R. K. Hepatic stellate cells and liver fibrosis. **Arch Pathol Lab Med** [S.I.], v. 131, n. 11, p. 1728-34, 2007.

MORGAN, J. A.; DEJONG, R. J.; SNYDER, S. D.; MKOJI, G. M. e LOKER, E. S. *Schistosoma mansoni* and *Biomphalaria*: past history and future trends. **Parasitology** [S.I.], v. 123 Suppl, p. S211-28, 2001.

MOSMANN, T. R. e COFFMAN, R. L. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. **Annu. Rev. Immunol.** [S.I.], v. 7, p. 145-73, 1989.

NAJAFZADEH, H.; RAZI JALALI, M.; MOROVVATI, H. e TARAVATI, F. Comparison of the Prophylactic Effect of Silymarin and Deferoxamine on Iron Overload-Induced Hepatotoxicity in Rat. **J Med Toxicol** [S.I.], p. x:x, 2010.

NETO, A. A. F. **Alteracoes de isoenzimas citocromo P450 hepaticas na esquistossomose mansonica murina / Alterations of isoenzimas citocromo P450 liverworts in esquistossomose mansonica murina.** (2001). 135 f. Mestrado - FIOCRUZ, Escola Nacional de Saude Publica Rio de Janeiro, 2001.

NEVES, J.; DA LUZ, L.-M. e TONELLI, E. [Toxic form of schistosomiasis mansoni. Diagnostic considerations on 50 identified cases in Belo Horizonte]. **Hospital (Rio J)** [S.I.],

v. 70, n. 6, p. 1583-603, 1966.

OLDS, G. R. e MAHMOUD, A. A. Role of host granulomatous response in murine schistosomiasis mansoni. eosinophil-mediated destruction of eggs. **J Clin Invest** [S.I.], v. 66, n. 6, p. 1191-9, 1980.

ORSINI, M.; ROCHA, R. S.; DISCH, J.; KATZ, N. e RABELLO, A. The role of nutritional status and insulin-like growth factor in reduced physical growth in hepatosplenic *Schistosoma mansoni* infection. **Trans R Soc Trop Med Hyg** [S.I.], v. 95, n. 4, p. 453-6, 2001.

OTHMAN, A. A.; SHOHEIB, Z. S.; SAIED, E. M. e SOLIMAN, R. H. Congenital exposure to *Schistosoma mansoni* infection: impact on the future immune response and the disease outcome. **Immunobiology** [S.I.], v. 215, n. 2, p. 101-12, 2010.

PARAENSE, W. L. The schistosome vectors in the Americas. **Mem Inst Oswaldo Cruz** [S.I.], v. 96 Suppl, p. 7-16, 2001.

PEARCE, E. J.; CASPAR, P.; GRZYCH, J. M.; LEWIS, F. A. e SHER, A. Downregulation of Th1 cytokine production accompanies induction of Th2 responses by a parasitic helminth, *Schistosoma mansoni*. **J. Exp. Med.** [S.I.], v. 173, n. 1, p. 159-66, 1991.

PEARCE, E. J. e MACDONALD, A. S. The immunobiology of schistosomiasis. **Nat Rev Immunol** [S.I.], v. 2, n. 7, p. 499-511, 2002.

POLYAK, S. J.; MORISHIMA, C.; SHUHART, M. C.; WANG, C. C.; LIU, Y. e LEE, D. Y. Inhibition of T-cell inflammatory cytokines, hepatocyte NF-kappaB signaling, and HCV infection by standardized Silymarin. **Gastroenterology** [S.I.], v. 132, n. 5, p. 1925-36, 2007.

PYRRHO, A. S. **Ações da dexametasona na infecção experimental pelo *Schistosoma mansoni*, Sambon, 1907.** (2001). 139 f. Ph.D. - IBCCF, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2001.

PYRRHO, A. S.; LENZI, H. L.; RAMOS, J. A.; MOURA-NETO, R.; CACHEM, F. C.; SANTOS DA SILVA, C.; TAKIYA, C. M. e GATTASS, C. R. Dexamethasone treatment improves morphological and hematological parameters in chronic experimental schistosomiasis. **Parasitol Res** [S.I.], v. 92, n. 6, p. 478-83, 2004.

PYRRHO, A. S.; RAMOS, J. A.; NETO, R. M.; SILVA, C. S.; LENZI, H. L.; TAKIYA, C. M. e GATTASS, C. R. Dexamethasone, a drug for attenuation of *Schistosoma mansoni* infection morbidity. **Antimicrob Agents Chemother** [S.I.], v. 46, n. 11, p. 3490-8, 2002.

RAGHUNATHAN, L. e BRUCKNER, D. Identification of sex in *Schistosoma mansoni* cercariae. **J Parasitol** [S.I.], v. 61, n. 1, p. 66-8, 1975.

RAINONE, F. Milk thistle. **Am Fam Physician** [S.I.], v. 72, n. 7, p. 1285-8, 2005.

RALPH, P.; NAKOINZ, I.; SAMPSON-JOHANNES, A.; FONG, S.; LOWE, D.; MIN, H. Y. e LIN, L. IL-10, T lymphocyte inhibitor of human blood cell production of IL-1 and tumor necrosis factor. **J Immunol** [S.I.], v. 148, n. 3, p. 808-14, 1992.

RAMASAMY, K. e AGARWAL, R. Multitargeted therapy of cancer by silymarin. **Cancer Lett** [S.I.], v. 269, n. 2, p. 352-62, 2008.

RATHORE, A.; SACRISTAN, C.; RICKLAN, D. E.; FLORES VILLANUEVA, P. O. e STADECKER, M. J. In situ analysis of B7-2 costimulatory, major histocompatibility complex class II, and adhesion molecule expression in schistosomal egg granulomas. **Am J Pathol** [S.I.], v. 149, n. 1, p. 187-94., 1996.

RAUEN, H. M. e SCHRIEWER, H. [The antihepatotoxic effect of silymarin on liver damage in rats induced by carbon tetrachloride, d-galactosamine and allyl alcohol]. **Arzneimittelforschung** [S.I.], v. 21, n. 8, p. 1194-201, 1971.

RAUEN, H. M.; SCHRIEWER, H.; TEGTBAUER, U. e LASANA, J. E. [Silymarin prevents peroxidation of lipids in carbon tetrachloride-induced liver damage]. **Experientia** [S.I.], v. 29, n. 11, p. 1372, 1973.

REIMAN, R. M.; THOMPSON, R. W.; FENG, C. G.; HARI, D.; KNIGHT, R.; CHEEVER, A. W.; ROSENBERG, H. F. e WYNN, T. A. Interleukin-5 (IL-5) augments the progression of liver fibrosis by regulating IL-13 activity. **Infect Immun** [S.I.], v. 74, n. 3, p. 1471-9, 2006.

REY, L. **Parasitologia**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.

REY, L. **Parasitologia**. 4a. ed. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara-Koogan, 2008. (Parasitologia).

RICHTER, J. The impact of chemotherapy on morbidity due to schistosomiasis. **Acta Trop** [S.I.], v. 86, n. 2-3, p. 161-83, 2003.

RIHET, P.; DEMEURE, C. E.; BOURGOIS, A.; PRATA, A. e DESSEIN, A. J. Evidence for an association between human resistance to *Schistosoma mansoni* and high anti-larval IgE levels. **Eur J Immunol** [S.I.], v. 21, n. 11, p. 2679-86, 1991.

RODRIGUES, L. E. A. Bioquímica da esquistossomose mansônica. VII — alterações lipídicas das membranas lisossômicas durante a fase inicial da agressão hepática. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro** [S.I.], v. 83, n. 1, p. 47-52, 1988.

ROGERS, S. H. e BUEDING, E. Hycanthone resistance: development in *Schistosoma mansoni*. **Science** [S.I.], v. 172, n. 987, p. 1057-8, 1971.

ROMANHA, W. S. **Mapeamento de moléculas de adesão e componentes de matriz extracelular no transcurso do desenvolvimento de granulomas esquistossomóticos murinos: Visão morfogênética**. (1999). (Mestrado) - Biologia Celular e Molecular, Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 1999.

ROSS, A. G.; BARTLEY, P. B.; SLEIGH, A. C.; OLDS, G. R.; LI, Y.; WILLIAMS, G. M. e SCHMCMANUS, D. P. Schistosomiasis. **N Engl J Med** [S.I.], v. 346, n. 16, p. 1212-20, 2002.

SADEK, M. G.; BORGES, D. R. e MISZPUTEN, S. J. [Intestinal activity of disaccharidases in schistosomiasis mansoni. Study of the course in mice with various degrees of infestation]. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo** [S.I.], v. 28, n. 2, p. 67-73, 1986.

SADUN, E. H. e WILLIAMS, J. S. Biochemical aspects of Schistosomiasis mansoni in mice in relation to worm burdens and duration of infection **Experimental Parasitology** [S.I.], v. 18, n. 2, p. 266-273, 1966.

SAMUELSON, J. e VON LICHTENBERG, F. Infectious Diseases. In: COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. (Ed.). *Robbins - Pathologic basis of disease*. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1999. p. 305-377.

SANTOS, A. B.; DE SOUZA, M. M. e ANDRADE, Z. A. [Reinfections and the development of schistosomal periportal fibrosis in the murine model]. **Rev Soc Bras Med Trop** [S.I.], v. 33, n. 2, p. 197-200, 2000.

SARAIVA, M. e O'GARRA, A. The regulation of IL-10 production by immune cells. **Nat Rev Immunol** [S.I.], v. 10, n. 3, p. 170-81, 2010.

SAVIOLI, L.; RENGANATHAN, E.; MONTRESOR, A.; DAVIS, A. e BEHBEHANI, K. Control of schistosomiasis--a global picture. **Parasitol Today** [S.I.], v. 13, n. 11, p. 444-8, 1997.

SCHRAMM, G.; MOHRS, K.; WODRICH, M.; DOENHOFF, M. J.; PEARCE, E. J.; HAAS, H. e MOHRS, M. Cutting Edge: IPSE/alpha-1, a Glycoprotein from *Schistosoma mansoni* Eggs, Induces IgE-Dependent, Antigen-Independent IL-4 Production by Murine Basophils In Vivo. **J Immunol** [S.I.], v. 178, n. 10, p. 6023-7, 2007.

SCHUMANN, J.; PROCKL, J.; KIEMER, A. K.; VOLLMAR, A. M.; BANG, R. e TIEGS, G. Silibinin protects mice from T cell-dependent liver injury. **J Hepatol** [S.I.], v. 39, n. 3, p. 333-40, 2003.

SHER, A.; COFFMAN, R. L.; HIENY, S. e CHEEVER, A. W. Ablation of eosinophil and IgE responses with anti-IL-5 or anti-IL-4 antibodies fails to affect immunity against *Schistosoma mansoni* in the mouse. **J. Immunol.** [S.I.], v. 145, n. 11, p. 3911-6, 1990.

SINGH, R. P. e AGARWAL, R. Prostate cancer prevention by silibinin. **Curr Cancer Drug Targets** [S.I.], v. 4, n. 1, p. 1-11, 2004.

SON, G.; IIMURO, Y.; SEKI, E.; HIRANO, T.; KANEDA, Y. e FUJIMOTO, J. Selective inactivation of NF-kappaB in the liver using NF-kappaB decoy suppresses CCl4-induced liver injury and fibrosis. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol** [S.I.], v. 293, n. 3, p. G631-9, 2007.

SONG, Z.; DEACIUC, I.; SONG, M.; LEE, D. Y.; LIU, Y.; JI, X. e MCCLAIN, C. Silymarin protects against acute ethanol-induced hepatotoxicity in mice. **Alcohol Clin Exp Res** [S.I.], v. 30, n. 3, p. 407-13, 2006.

SONNENBICHLER, J.; SCALERA, F.; SONNENBICHLER, I. e WEYHENMEYER, R. Stimulatory effects of silibinin and silicristin from the milk thistle *Silybum marianum* on kidney cells. **J Pharmacol Exp Ther** [S.I.], v. 290, n. 3, p. 1375-83, 1999.

SONNENBICHLER, J. e ZETL, I. [Mechanism of action of silibinin. V. Effect of silibinin on

the synthesis of ribosomal RNA, mRNA and tRNA in rat liver in vivo]. **Hoppe Seylers Z Physiol Chem** [S.I.], v. 365, n. 5, p. 555-66, 1984.

STEGEMANN, H. e STALDER, K. Determination of hydroxyproline. **Clin Chim Acta** [S.I.], v. 18, n. 2, p. 267-73, 1967.

STIREWALT, M. A. *Schistosoma mansoni*: cercaria to schistosomule. **Adv Parasitol** [S.I.], v. 12, p. 115-82, 1974.

SVEGLIATI BARONI, G.; D'AMBROSIO, L.; FERRETTI, G.; CASINI, A.; DI SARIO, A.; SALZANO, R.; RIDOLFI, F.; SACCOMANNO, S.; JEZEQUEL, A. M. e BENEDETTI, A. Fibrogenic effect of oxidative stress on rat hepatic stellate cells. **Hepatology** [S.I.], v. 27, n. 3, p. 720-6, 1998.

TALAAT, M.; EL-AYYAT, A.; SAYED, H. A. e MILLER, F. D. Emergence of *Schistosoma mansoni* infection in upper Egypt: the Giza governorate. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** [S.I.], v. 60, n. 5, p. 822-6, 1999.

TAN, S. Y. e AHANA, A. Theodor Bilharz (1825-1862): discoverer of schistosomiasis. **Singapore Med J** [S.I.], v. 48, n. 3, p. 184-5, 2007.

TANAKA, H. e TSUJI, M. From discovery to eradication of schistosomiasis in Japan: 1847-1996. **Int J Parasitol** [S.I.], v. 27, n. 12, p. 1465-80, 1997.

TOKLU, H. Z.; TUNALI-AKBAY, T.; ERKANLI, G.; YUKSEL, M.; ERCAN, F. e SENNER, G. Silymarin, the antioxidant component of *Silybum marianum*, protects against burn-induced oxidative skin injury. **Burns** [S.I.], v. 33, n. 7, p. 908-16, 2007.

TOKLU, H. Z.; TUNALI AKBAY, T.; VELIOGLU-OGUNC, A.; ERCAN, F.; GEDIK, N.; KEYSER-UYSAL, M. e SENNER, G. Silymarin, the Antioxidant Component of *Silybum marianum*, Prevents Sepsis-Induced Acute Lung and Brain Injury. **J Surg Res** [S.I.], 2007.

TYAGI, A.; SINGH, R. P.; AGARWAL, C. e AGARWAL, R. Silibinin activates p53-caspase 2 pathway and causes caspase-mediated cleavage of Cip1/p21 in apoptosis induction in bladder transitional-cell papilloma RT4 cells: evidence for a regulatory loop between p53 and caspase 2. **Carcinogenesis** [S.I.], v. 27, n. 11, p. 2269-80, 2006.

TYAGI, A.; SINGH, R. P.; RAMASAMY, K.; RAINA, K.; REDENTE, E. F.; DWYER-NIELD, L. D.; RADCLIFFE, R. A.; MALKINSON, A. M. e AGARWAL, R. Growth inhibition and regression of lung tumors by silibinin: modulation of angiogenesis by macrophage-associated cytokines and nuclear factor-kappaB and signal transducers and activators of transcription 3. **Cancer Prev Res (Phila Pa)** [S.I.], v. 2, n. 1, p. 74-83, 2009.

UTROSKA, J. A.; CHEN, M. G.; DIXON, H.; YOON, S.; HELLING-BORDA, M.; HOGERZEIL, H. V. e MOTT, K. E. An estimate of global needs for praziquantel within schistosomiasis control programmes., 1989.

VAN VELTHUYSEN, M. L. Glomerulopathy associated with parasitic infections. **Parasitol Today** [S.I.], v. 12, n. 3, p. 102-7, 1996.

VARILEK, G. W.; WEINSTOCK, J. V.; WILLIAMS, T. H. e JEW, J. Alterations of the intestinal innervation in mice infected with *Schistosoma mansoni*. **J Parasitol** [S.I.], v. 77, n. 3, p. 472-8, 1991.

VOGEL, G.; TUCHWEBER, B.; TROST, W. e MENGES, U. Protection by silibinin against *Amanita phalloides* intoxication in beagles. **Toxicol Appl Pharmacol** [S.I.], v. 73, n. 3, p. 355-62, 1984.

WAKE, K. "Sternzellen" in the liver: perisinusoidal cells with special reference to storage of vitamin A. **Am J Anat** [S.I.], v. 132, n. 4, p. 429-62, 1971.

WARREN, K. S. The pathology, pathobiology and pathogenesis of schistosomiasis. **Nature** [S.I.], v. 273, n. 5664, p. 609-12, 1978.

WASMUTH, H. E. e WEISKIRCHEN, R. [Pathogenesis of liver fibrosis: modulation of stellate cells by chemokines]. **Z Gastroenterol** [S.I.], v. 48, n. 1, p. 38-45, 2010.

WEBSTER, M.; FULFORD, A. J.; BRAUN, G.; OUMA, J. H.; KARIUKI, H. C.; HAVERCROFT, J. C.; GACHUHI, K.; STURROCK, R. F.; BUTTERWORTH, A. E. e DUNNE, D. W. Human immunoglobulin E responses to a recombinant 22.6- kilodalton antigen from *Schistosoma mansoni* adult worms are associated with low intensities of reinfection after treatment. **Infect. Immun.** [S.I.], v. 64, n. 10, p. 4042-6, 1996.

WEINSTOCK, J. V. e BOROS, D. L. Organ-dependent differences in composition and function observed in hepatic and intestinal granulomas isolated from mice with Schistosomiasis mansoni. **J. Immunol.** [S.I.], v. 130, n. 1, p. 418-22, 1983.

WHO. *Schistosomiasis Tropical Disease Research: Progress 1995-96 - Thirteenth Programme Report of the UNDP/World Bank/WHO Special Programme for Research & Training in Tropical Diseases*. Geneva, 1997. p. 62-73.

WHO, W. H. O. Prevention and Control of Schistosomiasis and Soil-transmitted Helminthiasis. **Tech. Rep. Ser.** [S.I.], v. 912, p. 1-57, 2002.

WHO, W. H. O. Schistosomiasis. v. 2009. n. 12 Novembro. Geneva: <http://www.who.int/schistosomiasis/en/index.html>, 2009a.

WHO, W. H. O. Schistosomiasis Countries x indicators. v. 2009. n. 12 Novembro. Geneva: http://www.who.int/neglected_diseases/preventive_chemotherapy/sch/db/index.html?units=minimal®ion=all&country=all&countries=all&year=2008, 2009b.

WILSON, M. S.; MENTINK-KANE, M. M.; PESCE, J. T.; RAMALINGAM, T. R.; THOMPSON, R. e WYNN, T. A. Immunopathology of schistosomiasis. **Immunol Cell Biol** [S.I.], v. 85, n. 2, p. 148-54, 2007.

WYLER, D. J.; WAHL, S. M. e WAHL, L. M. Hepatic fibrosis in schistosomiasis: egg granulomas secrete fibroblast stimulating factor in vitro. **Science** [S.I.], v. 202, n. 4366, p. 438-40, 1978.

WYNN, T. A.; CHEEVER, A. W.; WILLIAMS, M. E.; HIENY, S.; CASPAR, P.; KUHN,

R.; MULLER, W. e SHER, A. IL-10 regulates liver pathology in acute murine Schistosomiasis mansoni but is not required for immune down-modulation of chronic disease. **J. Immunol.** [S.I.], v. 160, n. 9, p. 4473-80, 1998.

YONG, W. K. e DAS, P. K. Acquisition of host proteins by the tegument of *Schistosoma mansoni* recovered from rats. **Z Parasitenkd** [S.I.], v. 69, n. 1, p. 53-60, 1983.