

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Sérgio dos Santos Mendanha Júnior

Análises morfológicas de granulomas hepáticos gerados por infecção de *Schistosoma mansoni*
em modelo animal e efeito de diferentes terapias

Juiz de Fora
2022

Sérgio dos Santos Mendanha Júnior

Análises morfológicas de granulomas hepáticos gerados por infecção de *Schistosoma mansoni*
em modelo animal e efeito de diferentes terapias

Dissertação mestrado do curso de Pós Graduação
em Ciências Biológicas: Imunologia e doenças
infecciosas e parasitárias apresentada para o
corpo docente, para a obtenção do grau de Mestre
em Ciências Biológicas: Imunologia e doenças
infecciosas e parasitárias.

Orientadora: Dra. Priscila de Faria Pinto

Coorientador: Dr. Manoel Couto de Araújo

Juiz de Fora

2022

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Júnior, Sérgio dos Santos Mendanha.

Análises morfológicas de granulomas hepáticos gerados por infecção de *Schistosoma mansoni* em modelo animal e efeito de diferentes terapias / Sérgio dos Santos Mendanha Júnior. -- 2022. 68 p. : il.

Orientador: Priscila de Faria Pinto

Coorientador: Manoel Carlos Couto de Araújo

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Imunologia e Genética, 2022.

1. Schistosoma. 2. Esquistossomose. 3. Aunomas. 4. Praziquantel. I. Pinto, Priscila de Faria, orient. II. Araújo, Manoel Carlos Couto de, coorient. III. Título.

Sérgio dos Santos Mendanha Júnior

Análises morfológicas de granulomas hepáticos gerados por infecção de *Schistosoma mansoni*
em modelo animal e efeito de diferentes terapias

Dissertação apresentada ao programa de Pós
Graduação em Ciências Biológicas – Imunologia
e DIP/ Genética e Biotecnologia, da Universidade
Federal de Juiz de Fora como requisito parcial à
obtenção do título de Mestre em Ciências
Biológicas. Área de Concentração: Imunologia e
Doenças Infecto- Parasitárias.

Aprovada em 30 de maio de 2022

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a Dr.^a Priscila de Faria Pinto – Orientadora
Universidade Federal de Juiz de Fora

Prof. Dr. Manoel Carlos Couto Araújo
Universidade Federal de Juiz de Fora

Dr. Marcio Roberto Silva
Embrapa Gado de Leite

Dr.^a Juliane Siqueira Francisco
Instituto Oswaldo Cruz - Fiocruz

Juiz de Fora, 12/05/2022.

Documento assinado eletronicamente por **Priscila de Faria Pinto, Professor(a)**, em 31/05/2022, às 14:55, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).

Documento assinado eletronicamente por **Juliane Siqueira Francisco, Usuário Externo**, em 01/06/2022, às 22:42, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).

Documento assinado eletronicamente por **Marcio Roberto Silva, Usuário Externo**, em 06/06/2022, às 10:46, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).

Documento assinado eletronicamente por **Manoel Carlos Couto de Araujo, Chefe de Departamento**, em 15/09/2022, às 11:57, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).

A autenticidade deste documento pode ser conferida no Portal do SEI-Ufjf (www2.ufjf.br/SEI) através do ícone Conferência de Documentos, informando o código verificador **0781153** e o código CRC **5B5A13E2**.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por nunca me abandonar, por me dar toda força para suportar de pé todas as tempestades, por me dar coragem para continuar mesmo quando o mundo parecia desabar.

Agradeço ao meu pai Sérgio e à minha mãe Evanice por todo apoio incondicional, por acreditarem em mim, por me darem todo alicerce nos momentos mais difíceis.

Agradeço aos colegas de Laboratório de Estrutura e Função de Proteínas pela cordialidade, por me receberem com carinho e amizade, por proporcionarem momentos de leveza e principalmente pelo companheirismo durante minha jornada.

Agradeço aos colaboradores do Laboratório de Estrutura e Função de Proteínas por todo apoio técnico e principalmente por todo incentivo e companheirismo.

Agradeço a todos os colaboradores do Laboratório de Morfologia do ICB por toda a paciência, por todo auxílio, por terem me acompanhado desde o primeiro dia dentro do laboratório, por terem sido muito mais que técnicos e sim apoiadores desse projeto.

Agradeço aos colegas de curso por dividirem comigo suas angústias, seus medos e seus projetos e pelos bons momentos vividos durante nossa caminhada.

Agradeço ao orientador Manoel Carlos Couto de Araújo pela enorme paciência e compreensão, por toda atenção e por todo tempo empregado nesse projeto, por fornecer toda condição técnica e teórica para elaboração e conclusão desse trabalho.

Agradeço à orientadora Priscila Faria Pinto, por não desistir de mim em nenhum momento, até mesmo quando eu achava que ia desistir, por sempre me resgatar em momentos cruciais de desânimo e me fazer acreditar que era possível concluir esse projeto, agradeço por todo carinho, por toda palavra de apoio e principalmente por não permitir que eu desistisse, agradeço por ter me acolhido e por fazer eu me sentir parte de uma equipe, agradeço por fazer possível a realização desse trabalho.

“Aquele que leva a sua preciosa semente andando e chorando
voltará com alegria trazendo seus molhos”

Salmos 126:2

RESUMO

A esquistossomose é uma doença parasitária que atinge milhares de pessoas pelo mundo. É uma doença grave, negligenciada, que acomete o sistema vascular portal e mesentérico onde os parasitos adultos habitam e realizam a postura dos ovos. No Brasil a doença é causada pela espécie *Schistosoma mansoni*. A presença dos ovos nos tecidos do hospedeiro definitivo causa distúrbios vasculares e hemorrágicos, em resposta a inflamação provocada pelos antígenos eliminados pelos ovos, gerando granulomas. A quimioterapia é realizada através da administração por via oral de comprimidos de praziquantel. Por ser o único medicamento disponível para o tratamento da esquistossomose, a terapia permanece como um desafio para a área da saúde. Sendo assim a busca de novos compostos esquistossomicidas vem ganhando força e nesse sentido compostos naturais como os flavonoides, especialmente as auronas, vêm despertando grande interesse na comunidade científica. O objetivo do estudo foi analisar a dinâmica do granuloma de animais infectados e tratados com praziquantel e auronas sintéticas e analisar a influências dos principais corantes hematológicos na análise dos granulomas esquistossomóticos. Para o presente trabalho, foi realizado um estudo laboratorial experimental, de caráter quali-quantitativo, utilizando camundongos albinos da linhagem Swiss, esses que foram submetidos à infecção bissexual, por via subcutânea, com aproximadamente 100 cercárias/animal. Os animais foram divididos em grupo controle, grupos tratados com PZQ (praziquantel 400 mg.kg⁻¹, Via oral) e auronas sintéticas (LS26 e LS29), nas dosagens de 50 e 100 mg e em esquemas de tratamento de dose única e duas doses. Ao final de 55 a 60 dias pós-infecção, os animais foram eutanasiados. Fragmentos dos fígados foram fixados (lobos direitos), embebidos em parafina e cortados (5 µm). As lâminas confeccionadas foram coradas por hematoxilina/eosina, tricrômico de Gomory e Picrossirius. Foram medidas as áreas dos granulomas (objetiva de 10x) e realizada contagem de células gigantes multinucleadas (CGM - objetiva 40x) através do programa ZEIN Lite 2012. A comparação de médias das áreas e o número de granulomas observados nas 3 colorações não mostraram diferenças significativas ($p > 0,05$ com CV maior que 30%).

Nas avaliações das áreas dos granulomas foi observado que as auronas LS26 e LS29 (100 mg.kg⁻¹, em duas doses) apresentaram médias de áreas menores e significativamente diferentes de PZQ. A avaliação da contagem das CGM revelou a

presença em maior quantidade destas células nas lâminas dos animais tratados com a airona LS26 (100 mg.kg⁻¹, em duas doses).

Palavras-Chave: *Schistosoma*; esquistossomose, aironas, praziquantel.

ABSTRACT

Schistosomiasis is a parasitic disease that affects thousands of people around the world. It is a serious, neglected disease that affects the portal vascular system (mesenteric vein) where adult parasites deposit their eggs and cause comorbidities such as portal hypertension, generating vascular and hemorrhagic disorders, caused by fibrous granulomas that form around the eggs. Schistosomiasis granuloma is the central aspect of the pathogenesis of schistosomiasis where it is formed through inflammatory responses stimulated by antigens present in the egg. However, the treatment of schistosomiasis still depends exclusively on chemotherapy with Praziquantel, but the success with drug treatment through the PZQ has not eradicated schistosomiasis, which still remains a major concern in the health area. Thus, the search for new schistocidal compounds has been gaining strength and in this sense natural compounds such as flavonoids, especially aurones, has been arousing great interest in the scientific community. The aim of the study was to analyze the dynamics of granuloma in animals infected and treated with praziquantel and synthetic aurones and to analyze the influence of the main hematological dyes in the analysis of schistosomiasis granulomas. For the present work, an experimental laboratory study was carried out, with a quali-quantitative character, using albino mice of the Swiss lineage, which were submitted to bisexual infection, by subcutaneous route, with approximately 100 cercariae/animal. The animals were divided into a control group, groups treated with PZQ (praziquantel/400mg/Kg/ Oral) and synthetic aurones (LS26 and LS29), in the dosages of 50 and 100mg, and in single-dose and two-dose treatment regimens. At the end of 55-60 days post-infection, the animals were euthanized. Liver fragments were fixed (right lobes), embedded in paraffin and cut (5 μ m). The prepared slides were stained with hematoxylin/eosin, gomory trichrome and Picrosirius. Granuloma areas were measured (10x objective) and multinucleated giant cell count (CGM - 40x objective) was performed using the ZEIN Lite 2012 program. Comparison of area means and number of granulomas observed in the 3 stains did not show significant differences ($p > 0.05$ with CV greater than 30%). In the evaluations of the areas of the granulomas, it was observed that the aurones LS26 and LS29 (100mg/2 doses) presented means of smaller areas and significantly different from PZQ. The evaluation of the GMC count revealed the presence of a greater quantity of these cells in the slides of animals treated with LS26 aurona (100mg/Kg – 2 doses).

Keywords: *Schistosoma*; schistosomiasis; flavonoids; praziquantel.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	Ciclo de vida do parasito <i>Schistosoma mansoni</i>	19
Figura 2 –	Corte histológico de fígados de camundongos da linhagem Swiss após 65 dias de infecção com 50 cercarias de <i>Schistosoma mansoni</i>	23
Figura 3 –	Corte histológico de fígados de camundongos da linhagem Swiss após 135 dias de infecção com 50 cercárias de <i>Schistosoma mansoni</i>	24
Figura 4 –	Cortes histológicos de fígados de camundongos da linhagem Swiss após 65 (A) e 135 (B) dias de infecção com 50 cercárias de <i>Schistosoma mansoni</i>	27
Figura 5 –	Células Gigantes Multinucleadas encontradas em diferentes tipos de patologia.....	28
Figura 6 –	Fases do processo de fusão de Células Gigantes Multinucleadas.....	30
Figura 7 –	Formação de células Gigantes Multinucleadas.....	31
Figura 8 –	Célula Gigante Multinucleada em granuloma esquistossomótico murino.....	32
Figura 9 –	Estrutura do Praziquantel.....	33
Figura 10 –	Estrutura dos Flavonoides.....	33
Figura 11 –	Estrutura química das auronas sintéticas LS23, LS26 e LS29.....	34
Figura 12 –	Aspectos gerais dos granulomas hepáticos de <i>Schistosoma mansoni</i> revelados por distintos corantes.....	40
Figura 13 –	Análise das médias das áreas dos granulomas observados e mensuradas por um avaliador, empregando 3 colorações distintas, HE, Picrosirius e Tricrômico de Gomori.....	41

Figura14–	Análise de correlação dos valores das médias das áreas dos granulomas observados e mensuradas por um avaliador, empregando 3 colorações distintas, HE, Picrosirius e Tricrômico de Gomori.....	42
Figura 15 –	Médias dos números de granulomas hepáticos de camundongos infectados com <i>Schistosoma mansoni</i> , observados para uma mesma área de corte histológico hepático corada com HE, PICRO e GOM.....	43
Figura 16 –	Análise de correlação dos valores dos números de granulomas observados em três colorações distintas, HE, PICR e GOM.....	44
Figura 17 –	Análise da média das áreas dos granulomas hepáticos dos animais infectados com <i>S. mansoni</i> e tratados com as auronas sintéticas LS26 e LS 29.....	47
Figura 18 –	Avaliação das médias globais dos granulomas hepáticos dos animais experimentalmente infectados e tratados.....	49
Figura 19 –	Avaliação do número médio de células gigantes multinucleadas presentes nos granulomas hepáticos dos animais experimentalmente infectados e tratados....	51
Figura 20 –	Avaliação do número médio de células pigmentadas presentes nos granulomas hepáticos do grupo controle e tratados com praziquantel e auronas sintéticas LS26 e LS29 em esquemas terapêuticos distintos.....	53

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 – Composição sequencial dos granulomas hepáticos durante a evolução da infecção por *Schistosoma mansoni* em modelo murino (camundongos da linhagem swiss).....26
- Tabela 2 – Médias das áreas dos granulomas hepáticos de camundongos infectados com *Schistosoma mansoni*, observados para um mesmo corte histológico hepático corada com HE, PICRO e GOM.....40
- Tabela 3 – Médias dos números de granulomas hepáticos de camundongos infectados com *Schistosoma mansoni*, observados para umamesma área de corte histológico hepático corada com HE, PICRO e GOM.....43
- Tabela 4 – Médias das distâncias em micrômetros entre as CGM e o núcleo do granuloma (centro do granuloma, medido pela região central do ovo contendo miracídio)...46
- Tabela 5 – Médias das áreas dos granulomas hepáticos dos animais controle e tratados com praziquantel e auronas sintéticas (LS26 e LS29) em esquemas terapêuticos distintos.....47
- Tabela 6 – Médias do número de granulomas hepáticos dos animais do grupo controle e tratados com praziquantel e auronas sintéticas LS26 e LS29 em esquemas terapêuticos distintos.....48
- Tabela 7 – Médias do número de Células Gigantes Multinucleadas do tecido hepáticos de animais tratados com as auronas sintéticas LS26 e LS29 em esquemas terapêuticos distintos.....50
- Tabela 8 – Análise das médias dos números de células pigmentadas do tecido hepáticos de animais do grupo controle e tratados com praziquantel e auronas sintéticas LS26 e LS29 em esquemas terapêuticos distintos.....52

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CGM	Células gigantes multinucleadas
GOM	Gomory
HE	Hematoxilina/eosina
IL	Interleucinas
INF- γ	Interferon gama
PICRO	Picrosirius
PZQ	Praziquantel
SEA	Antígenos solúveis da casca dos ovos esquistossomóticos
TH1	Linfócitos tipo T auxiliares tipo 1
TH2	Linfócitos tipo T auxiliares tipo 2
T-regs	Linfócitos tipo T reguladores
UFJF	Universidade Federal de Juiz de Fora

SUMÁRIO

1-	INTRODUÇÃO	15
2-	REVISÃO BOBILIOGRÁFICA	16
2.1-	CONSIDERAÇÕES EPIDEMIOLÓGICAS SOBRE ESQUISTOSSOMOSE.....	16
2.1.1 -	BIOLOGIA DA DOENÇA.....	17
2.2-	FISIOPATOLOGIA DA DOENÇA.....	20
2.3-	RESPOSTA IMUNE NA ESQUISTOSSOMOSE.....	21
2.4-	GRANULOMA ESQUISTOSSOMÓTICO FASES EVOLUTIVAS E ARQUITETURA.....	22
2.5-	CÉLULAS GIGANTES MULTINUCLEADAS, CINÉTICA E FUNÇÃO.....	27
2.6-	TRATAMENTO DA ESQUISTOSSOMOSE.....	32
2.7-	CORANTES UTILIZADOS NAS INVESTIGAÇÕES TECIDUAIS DE LESÕES HEPÁTICAS.....	35
3-	OBJETIVOS	35
3.1-	OBJETIVOS GERAIS.....	35
3.2-	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	35
4-	MATERIAIS E MÉTODOS	36
4.1-	DESENHO EXPERIMENTAL E LOCAIS DE PESQUISA.....	36
4.2-	OBTENÇÃO DAS AURONAS.....	36
4.3-	INFECÇÃO E CICLO.....	36
4.4-	FIXAÇÃO E PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS.....	37
4.5-	MONTAGEM DOS BLOCOS E MICROTOMIA.....	37
4.6-	REMOÇÃO DA PARAFINA DO CORTE, REIFRATAÇÃO, COLORAÇÃO E MONTAGEM DOS CORTES NAS LÂMINAS.....	37
4.7-	MEDIDA DAS ÁREAS DOS GRANULOMAS E CONTAGEM DAS CELULAS GIGANTES MULTINUCLEADAS.....	38
4.8-	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	38
4.9-	ASPECTOS ÉTICOS.....	39
5-	RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
5.1-	ÁREA DOS GRANULOMAS MEDIDAS EM DIFERENTES TIPOS DE CORANTES.....	39
5.2-	NÚMERO DE GRANULOMAS MEDIDOS POR CORANTES.....	43

5.3-	DISTÂNCIA ENTRE AS CÉLULAS GIGANTES MULTINUCLEADAS EM RELAÇÃO AO CENTRO DO GRANULOMA.....	45
5.4-	INFLUÊNCIA DO TRATAMENTO COM AURONAS SINTÉTICAS LS29 E LS26.....	46
5.5-	INFLUÊNCIA DO TRATAMENTO NO NÚMERO DE CÉLULAS GIGANTES MULTINUCLEADAS.....	49
5.6-	CONTAGEM DE CÉLULAS PIGMENTADAS.....	51
5.7-	DISCUSSÃO.....	53
6-	CONCLUSÃO.....	57
	REFERÊNCIAS.....	58

1 INTRODUÇÃO

A esquistossomose é uma doença parasitária que atinge milhares de pessoas pelo mundo (Katz, 2018). É uma doença grave, negligenciada, que acomete o sistema vascular onde os parasitos adultos depositam seus ovos os quais são os responsáveis pela principal característica histopatológica da doença, os granulomas (Amaral *et al.*, 2017). O granuloma é definido como uma coleção de células inflamatórias que se organizam ao redor dos antígenos, incorporado em matriz extracelular, rica em colágeno, com a função de isolar os antígenos e proteger o tecido do hospedeiro de toxinas secretadas pelo ovo e promover a translocação dos ovos dos vasos sanguíneos para a luz do intestino (Amaral *et al.*, 2017). Os granulomas causam comorbidades, como hipertensão portal, gerando distúrbios vasculares e hemorrágicos (Souza *et al.*, 2011). No entanto, o tratamento da esquistossomose ainda depende exclusivamente da quimioterapia com Praziquantel (PZQ) (Rocha *et al.*, 2017).

O sucesso com o tratamento medicamentoso através do PZQ não erradicou a esquistossomose que ainda permanece como uma grande preocupação na área da saúde (Zhang *et al.*, 2020). Um fator de destaque é a falta de eficácia do PZQ contra as formas jovens do parasito e o aparecimento de cepas resistentes ao medicamento, revelando a necessidade de busca de novos compostos esquistossomicidas e antígenos que possam ser candidatos ao desenvolvimento de vacinas (Zang *et al.*, 2020; Rocha *et al.*, 2017; Mendonça *et al.*, 2016).

Na tentativa de buscar novos recursos terapêuticos para o combate a esta helmintíase, trabalhos como o de Duguet e colaboradores (2020) e Ataba e colaboradores (2020), apontam para o potencial uso de produtos de origem natural como ponto de partida na busca por novos compostos esquistossomicidas. Em outras abordagens, autores como Gusmão e colaboradores (2017;2021), estimulam o uso de proteínas antigênicas, como a de batata, para o desenvolvimento de vacinas como forma de combate a esquistossomose.

Neste trabalho, inspirado nos produtos naturais com atividades biológicas já comprovadas sobre parasitos, as auronas LS26 e LS29, com atividade esquistossomicida já comprovada (Torres, 2018) foram empregadas para avaliação do papel destes novos compostos sobre a formação e resolução do granuloma hepático promovido pela infecção experimental com *S. mansoni*.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 CONSIDERAÇÕES EPIDEMIOLÓGICAS SOBRE A ESQUISTOSSOMOSE

A esquistossomose é uma doença negligenciada causada pelo helminto da classe trematoda, *Schistosoma sp.*, que tem como hospedeiro intermediário moluscos do gênero *Biomphalaria*, no Brasil a espécie prevalente é o *S. mansoni* (Katz, 2018; Souza *et al.*, 2011). A esquistossomose afeta cerca de 200 milhões de pessoas ao redor do mundo, sendo que em países com clima tropical as condições necessárias para a transmissão e disseminação da doença podem ser mais favoráveis, é considerada a segunda doença parasitária mais importante do mundo em termos de impacto na saúde pública, com 120 milhões de infectados sintomáticos e 20 milhões de infectados apresentando morbidades graves, ocorrendo preferencialmente em países em desenvolvimento, com quase 200 milhões de infectados apenas na África (Duguet *et al.*, 2020; Mendonça *et al.*, 2016; Colley *et al.*, 2014; Kandem *et al.*, 2018). No Brasil, a esquistossomose apresenta ampla distribuição geográfica, com 80% da doença sendo registrada no Nordeste (Brito *et al.*, 2020). Pernambuco é um dos estados do Nordeste onde se encontra uma a maior prevalência de esquistossomose, doença considerada classicamente crônica, rural, intimamente relacionada à pobreza e de ocorrência preferencialmente na Zona da Mata, região onde se encontram rios perenes não sujeitos a seca (Brito *et al.*, 2020). No ano de 2015, o estado de Pernambuco obteve uma positividade média de 3% em áreas consideradas endêmicas, com aproximadamente 180 óbitos por ano, considerando o intervalo entre os anos de 2005 e 2014, obtendo uma taxa de mortalidade cinco vezes maior que a nacional (Brito *et al.*, 2020).

O inquérito epidemiológico realizado por Katz (2018), analisando 197.564 estudantes de 521 municípios endêmicos para esquistossomose, mostra que as macrorregiões Nordeste e Sudeste apresentaram os maiores índices de positividade, sendo de 1,27% e 2,35%, respectivamente. Neste inquérito observa-se a positividade de casos em 0,01% na região Norte, 0,02% na região Centro-oeste e na região Sul, nenhum caso foi diagnosticado (Katz, 2018). Em áreas consideradas endêmicas, foram encontradas 0,27% e 3,28% de positividade (municípios com mais ou menos 500 mil habitantes) e em áreas não endêmicas, a positividade foi de 0,05% e 0,13% (Katz, 2018).

2.1.1 BIOLOGIA DA DOENÇA

O hospedeiro intermediário do *Schistosoma mansoni* é o molusco do gênero *Biomphalaria*, que apresenta três espécies transmissoras (*B. glabrata*, *B. tenagophila* e *B. straminea*). Estes moluscos apresentam suas conchas em forma de disco bicôncavo com orientação sinistrógira e cor castanha (Varjee, 2019; Carvalho *et al.*, 2008).

As espécies do gênero *schistosoma* que apresentam importância na medicina humana são: *S. haematobium*, *S. japonicum*, *S. mekongi*, *S. intercalatum* e *S. mansoni* (Vejee, 2019; Neves, 2010). Sua morfologia deve ser analisada em todas as suas fases de desenvolvimento, apresentam marcado dimorfismo sexual, o macho mede cerca de 6.5mm a 12mm, cor esbranquiçada, corpo apresentando minúsculas projeções, presença de ventosas (oral e ventral) e presença de enrolamentos laterais que formam o canal ginecóforo onde a fêmea se instala e permanece ao longo de toda sua vida (Secretaria de vigilância em saúde/MS, 2014).

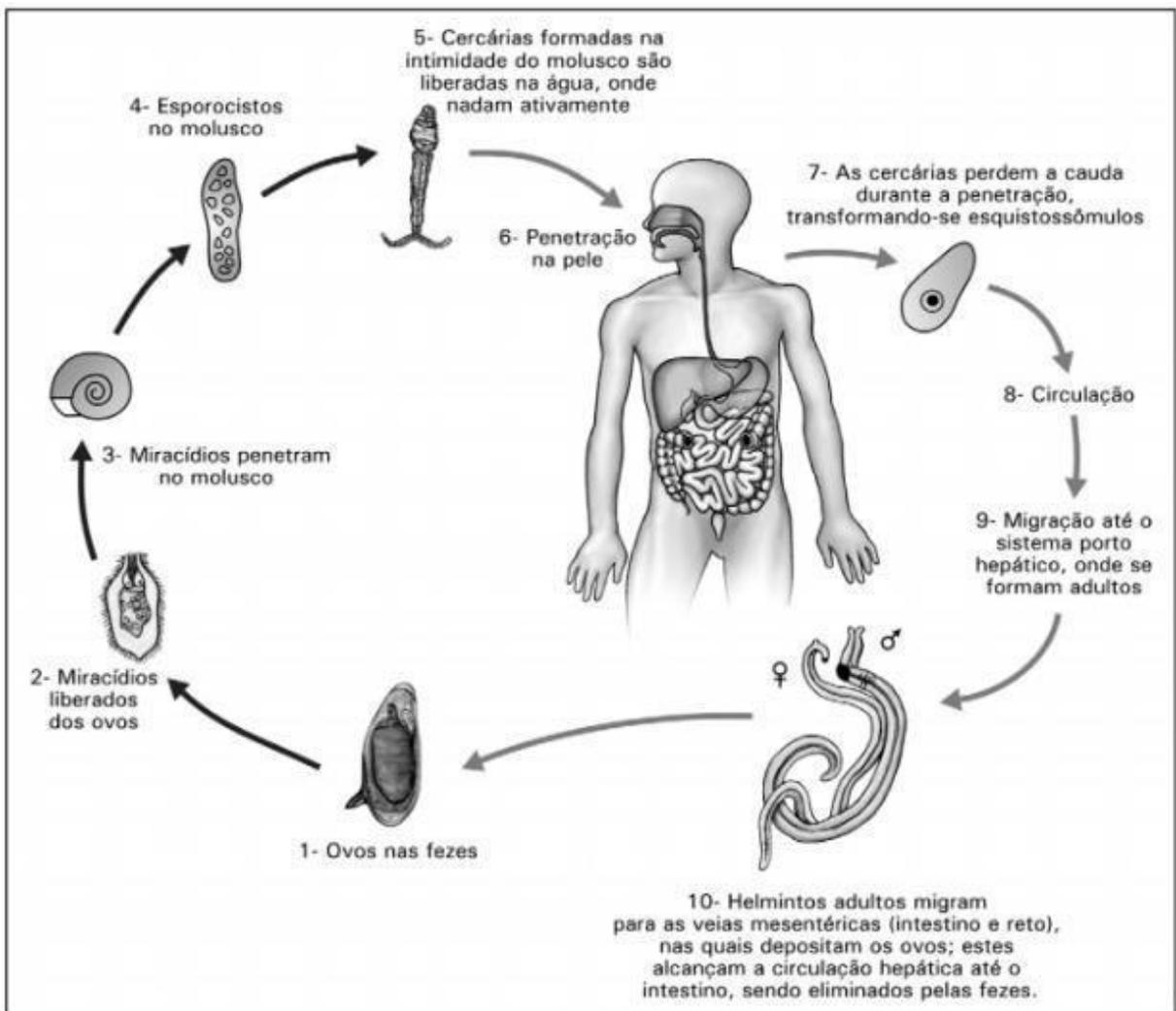
A fêmea mede cerca de 15mm e extremidades afiladas, apresenta cor mais escura com tegumento liso, seus ovos medem cerca de 150µm, apresenta em sua parte mais larga uma espícula, o ovo maduro é encontrado nas fezes e já apresenta o embrião, o miracídio (Secretaria de Vigilância em saúde/MS,2014; Neves 2010). O miracídio, que representa a primeira fase larvária, apresenta forma oval e possui cílios em sua superfície que permitem a sua movimentação em meio aquático (Secretaria de vigilância em saúde/MS,2014). As cercárias apresentam cerca de 500µm de comprimento, cauda bifurcada e presença de duas ventosas responsáveis pela fixação e penetração no hospedeiro definitivo (Secretaria de vigilância em saúde/MS.2014; Neves 2010).

O ciclo biológico do *S. mansoni* é complexo e detém fases adaptativas que envolvem o meio aquático, o hospedeiro intermediário e o hospedeiro definitivo (Augusto *et al.*, 2019). O *S. mansoni* ao atingir a fase adulta se aloja nas veias mesentéricas, principalmente na veia mesentérica inferior, onde as fêmeas fazem a postura dos ovos (de 300 a 400 ovos por dia) e cada casal pode viver por mais ou menos 30 anos eliminando ovos (Carvalho *et al.*, 2008; Colley *et al.*, 2014). Os ovos que ficam retidos nos tecidos intestinais demoram cerca de uma semana para se tornarem maduros, onde a eliminação de substâncias pelos ovos do parasito promove, um ambiente inflamatório, com ativação de moléculas endoteliais, homeostase sanguínea, adesão ao endotélio, secreção de interleucinas e por fim, promovem a passagem dos ovos pelos vasos, aos quais atingem a luz intestinal (Varjee, 2019; Constain *et al.*, 2014; Colley *et al.*, 2014). Essa migração dura cerca de uma semana, podendo os ovos alcançar a luz intestinal ou ficarem presos nos tecidos (quando são arrastados para outros órgãos como o

figado e rins). Ao alcançarem a água, os ovos liberam o miracídeo, essa liberação obedece um ciclo circadiano e possui influência de fatores ambientais, ao serem liberados são estimulados por fatores referentes ao molusco e se movimentam e penetram em seu hospedeiro intermediário, perdendo suas estruturas ciliadas em 48 horas e dando origem a células germinativas que posteriormente originaram as cercárias, a formação completa das cercárias até sua eliminação pode ocorrer em um período de 27 a 30 dias, onde um miracídeo pode gerar 300 mil cercárias, essas formas infectantes ao atingirem o epitélio do hospedeiro definitivo penetram na pele e , atingem a circulação e chegam até as veias mesentéricas (Secretaria de vigilância em saúde/MS, 2014; Neves, 2010).

Em geral, durante a migração dos ovos do vaso para a luz intestinal, aparecem os sintomas de diarreia, micro hemorragias e áreas de inflamação (Secretaria de vigilância em saúde/MS, 2014). A transmissão da doença se dá pela penetração das cercárias na pele (pés e membros em contato com a água), principalmente em áreas endêmicas (Varjee, 2018; Schwartz *et al.*, 2018; Carvalho *et al.*, 2008).

Figura 1 - Ciclo de vida do parasito *Schistosoma mansoni*. Ovos presentes nas fezes em contato com a água liberam o miracídio, que infectam moluscos onde irão completar um de seus ciclos de vida, gerando as formas infectantes, as cercárias. Uma vez liberadas na água, as cercárias penetram ativamente na pele de seus hospedeiros definitivos. Após a penetração, estas formas infectantes perdem suas caudas e passam a ser denominadas esquistossômulos, que seguem pelo corpo do hospedeiro definitivo até atingirem a circulação sanguínea, migrando até o sistema porta hepático onde se tornam vermes adultos. Os vermes adultos são dioicos e, machos e fêmeas adultos, permanecem juntos por toda a vida e migram para as porções terminais das veias mesentéricas onde as fêmeas fazem a postura de seus ovos, os quais por fatores hemodinâmicos e inflamatórios alcança, a luz do intestino e são eliminados.



Fonte: SOUZA *et al.*, 2011.

2.2 FISIOPATOLOGIA DA ESQUISTOSSOMOSE

A esquistossomose possui duas formas anatomo-clínicas, a esquistossomose aguda e a esquistossomose crônica, em sua maioria das vezes é assintomática e atinge indivíduos principalmente em áreas endêmicas, as formas mais graves são raras sendo marcadas por hepatoesplenomegalia e hipertensão portal (Varjee,2019; Carvalho *et al.*, 2008).

A esquistossomose aguda pode ser dividida em pré- postural (antes da postura dos ovos) e pós-postural, sendo que a esquistossomose pré-postural é rara, causada por subprodutos da degradação do próprio parasito, normalmente ocorrendo em casos de hiperinfecção, já a esquistossomose pós-postural é causada pelos ovos (Varjee, 2019; Neves *et al.*, 2010). A esquistossomose aguda é caracterizada por granulomas grandes com componentes exsudativos e intensa eosinofilia, estando presente em diversos órgãos, seus principais sintomas são prostração, febre (Febre de Katayama, caracterizada por tosse seca fadiga e febre), hepatites e esplenites causados pela presença dos ovos (Schwhartz *et al.*, 2018; Carvalho *et al.*, 2008). A esquistossomose crônica normalmente se apresenta de forma leve (90% dos casos), sendo o paciente assintomático e eventualmente evoluindo para a forma grave ou avançada da doença (Carvalho *et al.*, 2008; Neves *et al.*, 2010). Por atingirem diversos órgãos a esquistossomose crônica apresenta uma grande variação clínica, podendo ocorrer alterações hepáticas, intestinais e esplênicas(Carvalho *et al.*, 2008). No intestino a presença dos ovos pode gerar diarreia sanguinolenta e constipação devida à fibrose da alça sigmóide do intestino, normalmente ocorre de forma benigna(Arnaud *et al.*, 2008). No fígado as alterações hepáticas surgem após a formação dos granulomas ao redor dos ovos, o quadro evolutivo da doença depende da quantidade de ovos que chega ao fígado e da quantidade de granulomas periovular acumulados no tecido (Carvalho *et al.*, 2008; Neves *et al.*, 2010). Os granulomas hepáticos podem causar endoflebite aguda, fibrose periportal que podem obstruir os ramos intra-hepáticos e da veia porta, podendo gerar o quadro mais grave da doença, a hipertensão portal, podendo resultar em sangramento gastrointestinal, encefalopatia hepática e insuficiência hepática (Schwartz *et al.*,2018; Arnaud *et al.*, 2008).

2.3 RESPOSTA IMUNE NA ESQUISTOSSOMOSE

Nos mecanismos de atenuação dos efeitos da doença estão envolvidas respostas imunes contra as formas infectantes da doença e contra os antígenos solúveis dos ovos aos quais induzem células TCD4 e acarretam a formação do granuloma, sendo esse mecanismo a marca da patologia (Liu *et al.*, 2020; Carvalho *et al.*, 2008). Em indivíduos menos susceptíveis, ao agravamento da doença, encontra-se um perfil de ativação de células tipo TH1/TH2 (Colley *et al.*, 2014). As respostas iniciais contra a invasão parasitária são do tipo TH1, com produção INF- γ , TNF α e IL-12, persistindo por 5 semanas (Liu *et al.*, 2020; Schwartz *et al.*, 2018). O parasito adulto consegue perfeitamente escapar das respostas imunes do hospedeiro por vários mecanismos: mimetismo antigênico, mudanças de antígenos (Ag) de superfície, resistência aos mecanismos efetores do sistema imunológico, camuflagem em células do hospedeiro, parasito adulto expõe seus Ag como forma de defesa e regulação da sinalização purinérgica ao sistema imunológico (Colley *et al.*, 2014). Nesse contexto antígenos de superfície encontrados no *S. mansoni* vêm despertando grande interesse, antígenos como SmATPDase (ATP difosfohidrolase) tem a capacidade de diminuir a sinalização purinérgica gerada por lesões causadas pelo parasito, essa proteína é capaz de hidrolisar o ATP e o ADP (Gusmão *et al.*, 2017;2021; Da'Dara *et al.*, 2014). Esses antígenos despertam grande interesse e são alvos para possível tratamento ou produção de vacinas (Emídio *et al.*, 2017; Faria-Pinto *et al.*, 2010).

Com a interação de células dendríticas com antígenos solúveis dos ovos (SEA), as respostas passam a ter um perfil TH2, com intensa ação de interleucinas como IL-4, IL-5 e IL-13 as quais são responsáveis por atrair eosinófilos, produção de anticorpos do tipo IgE e ativação alternativa de macrófagos (fibroblastos) (Schwartz *et al.*, 2018; Colley *et al.*, 2014; Arnaud *et al.*, 2008). O principal agravamento pelas intensas respostas imunológicas do hospedeiro aos antígenos contidos na preparação SEA (“*Schistosoma* eggs antigens”) são as reações granulomatosas. Estas reações se caracterizam por ações constantes de células de defesa do tipo TH2 que são responsáveis pelo aumento de estruturas granulomatosas (Schwartz *et al.*, 2018; Arnaud *et al.*, 2010).

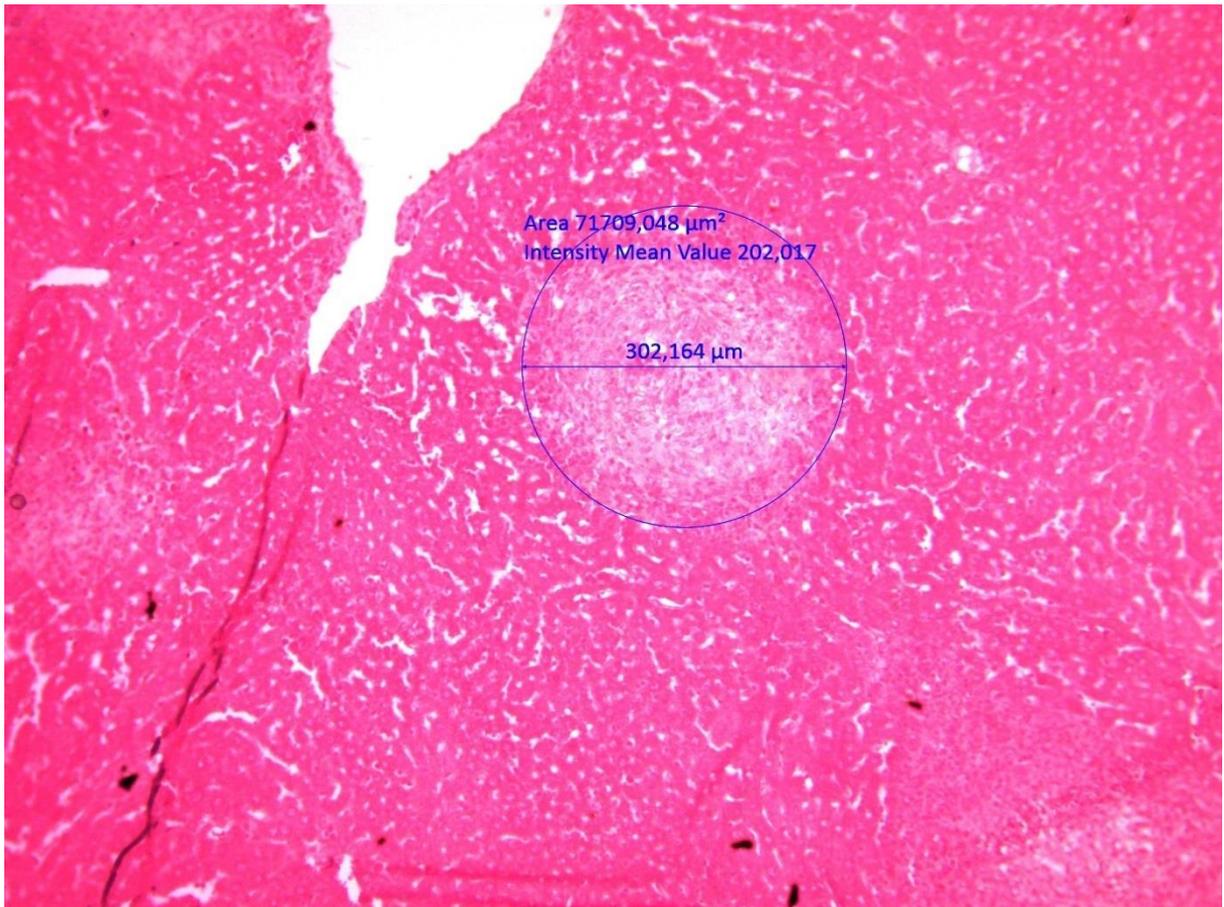
Os antígenos secretados pelos ovos do parasito estimulam a produção de um infiltrado inflamatório rico em células de defesa, esse infiltrado gera necrose no tecido do hospedeiro. Durante a fase crônica da infecção (>3 meses), a magnitude da resposta Th2 diminui, coincidentemente com uma redução da inflamação granulomatosa em torno dos ovos, e as células T e B regulatórias emergem, células T-reg e citocinas anti-inflamatórias promovem a

ativação alternativa dos macrófagos aumentando a proliferação dos fibroblastos, reduzindo o tamanho do granuloma e substituindo o tecido lesionado por tecido fibrótico, isolando os ovos do tecido do hospedeiro (Schwartz *et al.*, 2018; Colley *et al.*, 2014). Apesar do granuloma servir como um envoltório aos antígenos dos ovos e isolá-los do hospedeiro, o somatório das formações granulomatosas causam distúrbios vasculares e colapso na circulação portal, o granuloma pode acarretar hipertensão portal, circulação colateral com varizes calibrosas e distúrbios hemorrágicos (Schwartz *et al.*, 2018; Neves *et al.*, 2010; Carvalho *et al.*, 2008).

2.4 GRANULOMA ESQUISTOSSOMÓTICO, FASES EVOLUTIVA E ARQUITETURA

De acordo com Lenzi e colaboradores (1998), o granuloma se arranja de forma redonda, através de moléculas de adesão, com a finalidade de formar uma estrutura estável e equilibrada energeticamente. Grimaud 1986 declara que o granuloma esquistossomótico funciona como um pequeno organismo, apresentando uma fase de maturação (aguda), com forte presença de infiltrado inflamatório e produção intensa de colágeno, e uma fase de involução (crônica), com fibras colágenas organizadas no intuito de isolar os antígenos do ovo, desaparecendo no final. Segundo Junqueira *et al.*, 1986), a fase aguda da infecção o granuloma hepático se encontra rodeado por grande número de células inflamatórias e apresenta grande produção de fibras colágenas (Figura 2). No decorrer da infecção, no período de 32 semanas o granuloma tende a evoluir e se estabilizar, mantendo a arquitetura do tecido hepático (Figura 3).

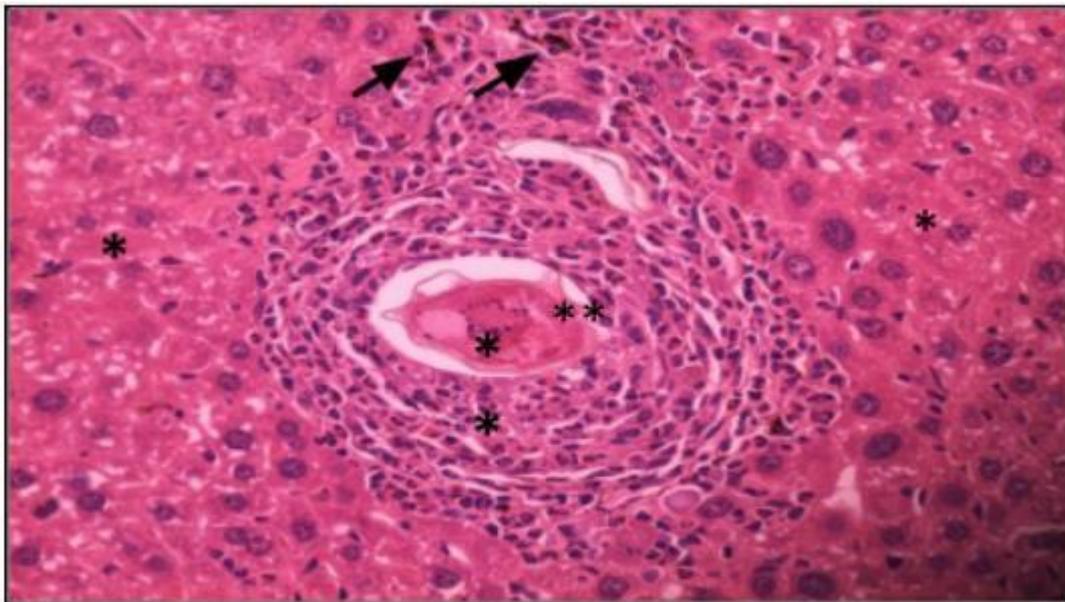
Figura 2 - Corte histológico de fígados de camundongos da linhagem Swiss após 65 dias de infecção com 50 cercárias de *Schistosoma mansoni*. Na imagem, as setas marcam a área do granuloma, composto pela região periovular, onde as células inflamatórias se arranjam. Nesta fase aguda da doença, não percebemos o arranjo específico das fibras colágenas produzidas, mas a presença de eosinófilos é marcante. (**) destaque para as células do miracídio (envolvido pela casca do ovo) que é o embrião. Coloração por hematoxilina-eosina. Aumento: 10 x.



Fonte: Próprio Autor.

Figura 3 - Corte histológico de fígados de camundongos da linhagem Swiss após 135 dias de infecção com 50 cercárias de *Schistosoma mansoni*. Na imagem, as setas marcam a presença de pigmentos esquistossomóticos. Nesta fase crônica da doença podemos observar a disposição concêntrica das fibras colágenas na região periovular (**), que é bem distinta da área sadia do fígado (*). Merece destaque o aumento da presença de eosinófilos nesta fase.

Note que ainda existe material do miracídio para ser decomposto. Coloração por hematoxilina-eosina. Aumento: 40 x. Fonte: Arquivo laboratório de Estudo de Estrutura e Função de Proteínas UFJF.



Fonte: Próprio Autor.

Lenzi *et al.* 1998 propôs as seguintes fases para o desenvolvimento do granuloma esquistossomótico: Estágio Pré-granulomatoso, sendo subdivido em estágio reativo inicial e estágio exsudativo; Estágio Granulomatoso, sendo subdivido em estágio exsudativo produtivo, estágio produtivo (com fibrose precoce ou avançada) e Estágio Involutivo, que é subdividido em: involutivo com dissociação do colágeno, com grossa camada de colágeno, com fina camada de colágeno e com macrófagos pigmentados. O estágio pré-granulomatoso exsudativo é de suma importância na patogênese da esquistossomose, gerando histólise e microtrombos especialmente no fígado. No estágio pré-granulomatoso exsudativo existe destruição focal envolvendo as paredes dos vasos e o parênquima adjacente. O esqueleto anatômico da matriz extracelular dos tecidos é completamente destruído, permanecendo algumas fibras residuais. Conforme a infecção prossegue, pouco a pouco começam a aparecer fibras reticulares entre as células, que mais tarde se intensificam e se apresentam de forma

entrelaçada ou em arranjo radial (Figura 3), definindo zonas dentro do granuloma exsudativo e produtivo. A zona interna ou Peri fibrilar consiste em macrófagos (epitelioides ou não) e ocasionalmente células gigantes; a região para central, composta por fibroblastos com ou sem a presença de mastócitos e zona externa que dependendo da fase da infecção pode estar rica em linfócitos T e B e células plasmáticas (Lenzi *et al.*, 1998). A sequencial composição das células do granuloma no decorrer da infecção pode ser mostrada de acordo com a tabela (Tabela 1).

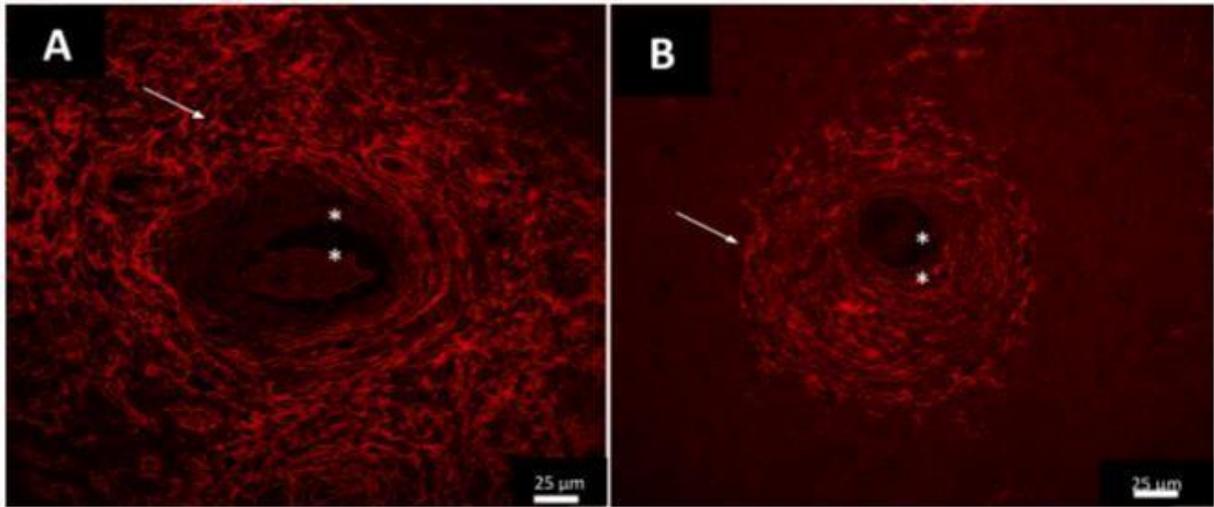
Tabela 1 - Composição sequencial dos granulomas hepáticos durante a evolução da infecção por *Schistosoma mansoni* em modelo murino (camundongos da linhagem swiss).

Tempo de infecção	25	30	35	40	45	50	55	60	70	80	90	100	110	120	160
Tipo de reação		RI	E	E/ EP	EP	EP	EP	EP	EP/P	EP/P	EP/ PF/I	EP/ PF	EP/ PF	EP/ PF/I	EP/ PF/I
periovular															
Macrófagos	-	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	++	++
Células epitelioides	-	-	-	-	+/-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Células gigantes	-	-	-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+	+	+	+	++
Neutrófilos	-	-	-	+/-	+/-	+	++	+	+	+	+	+	+/-	+	++
Eosinófilos	-	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	++	++
Mastócitos	-	-	-	+	+	++	+	+/-	+/-	++	+	+	+	+	+
Fibroblastos	-	-	-	+	+	+	+	+	+	++	++	+++	++	++	++
Linfócitos	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Plasmócitos	-	-	-	+	+	+	++	+	++	++	++	++	++	++	++
Fibras reticulares	-	-	-	+M	+MCo	+CoM	+CoM	+Com	+Co	+Co	+Co	+Co	+Co	+Co	+Co
PAS	-	-	-	+	+	+/-	+/-	+/-	+/-	++	-	+	+/-	+	+
Alcian blue pH 1,0	-	-	-	++	+	+	+	+	+	++	++	++	+	+	++
Alcian blue pH 2,5	-	-	-	+	+/-	+	+	++	++	+++	+++	++	++	++	+/-
<u>Pigmento</u>	=	=	=	<u>+D</u>	<u>+D</u>	<u>+Pe</u>	<u>+Pe</u>	<u>+Pe</u>	<u>++Pe</u>	<u>+Pe</u>	<u>++Pe</u>	<u>++Pe</u>	<u>++Pe</u>	<u>++Pe</u>	<u>+Pe</u>

Legenda: RI: reação inicial; E: exsudativo; EP: exsudativo-produto; P: produtivo; PF: produtivo-fibrótico; I: involutivo; T: transicional ; M: disposição em rede; Co: disposição concêntrica; D: difuso; Pe: periférico; (-): negativo; (+/- até +++): aumento do grau de intensidade.

Fonte: Lenzi *et al.* 1998 (adaptado pelo autor).

Figura 4 - Cortes histológicos de fígados de camundongos da linhagem Swiss após 65 (A) e 135 (B) dias de infecção com 50 cercárias de *Schistosoma mansoni*. Nas imagens, as setas marcam a distribuição das fibras colágenas de forma desordenada (fase aguda – A) e ordenada (fase crônica – B). Os asteriscos mostram a região periovular onde podemos encontrar os ovos com miracídios. Coloração por Picrosirius e imagem obtida por microscopia de imunofluorescência (CONFOCAL/Leica SP5).



Fonte: Arquivo laboratório de Estudo de Estrutura e Função de Proteínas UFJF.

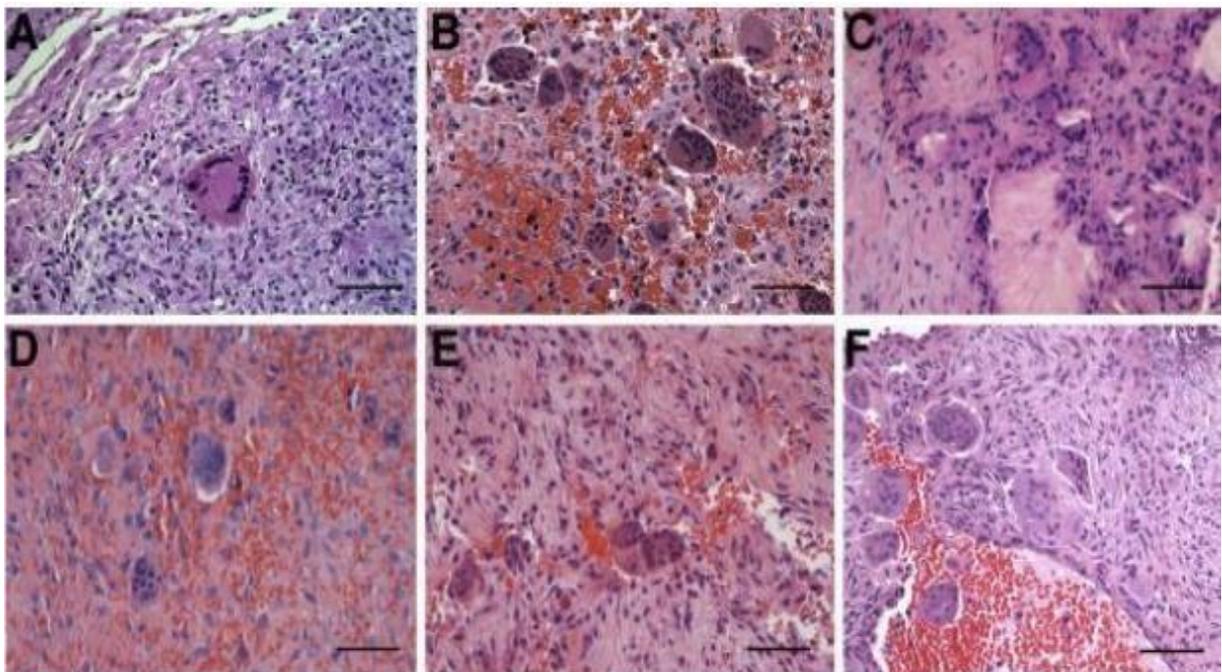
Em experimentos realizados em modelos animais a proporção de eosinófilos no granuloma em fase aguda é de 40% a 60% (camundongos e babuínos respectivamente), neutrófilos compõem 21% e o restante composto por linhagens mononucleares (Linfócitos, macrófagos e células plasmáticas) (Farah *et al.*, 2000).

2.5 CÉLULAS GIGANTES MULTINUCLEADAS, CINÉTICA E FUNÇÃO

As células da linhagem monocítica têm um importante papel na saúde e na doença. A diferenciação dessa linhagem em macrófagos é crucial para uma ampla gama de processos imunológicos que regulam a inflamação, sendo importantes no combate a infecções e neoplasias. Em certas condições patológicas, como reações de corpo estranho e lesões inflamatórias periféricas, os monócitos amadurecem para formar células gigantes multinucleadas (CGM). Atualmente, o conhecimento sobre os mecanismos de fusão de monócitos e a regulação da formação e função de CGM em patologias discretas é limitado (Brooks *et al.*, 2019).

Em alguns tecidos saudáveis, como músculo esquelético, placenta e osso, encontramos populações de células multinucleadas, porém, a presença de células multinucleadas em outros tecidos é considerada patológica. As células CGM, de origem monocítica, costumam estar espacialmente associadas a antígenos estranhos ou constituem parte de uma resposta tecidual à infecção (Brooks *et al.*, 2019) Células gigantes mononucleares (CGM), são características de várias doenças crônicas como a tuberculose, sarcoidoses e esquistossomose, também encontradas em tumores ósseos. (Brooks *et al.*, 2019; Pereira *et al.*, 2018). São formadas através da fusão de macrófagos e envolvem eventos consecutivos como polarização, aderência, agregação e por fim fusão monócitos, estimulado por antígenos principalmente em infecções crônicas (Figura 5) (Brooks *et al.*, 2019; Pereira *et al.*, 2018; Farah *et al.*, 2002). Em vários tecidos o aparecimento de CGM envolvem a participação de células T, com intensa participação de citocinas como IL-2, IL-17, IL21, $INF\gamma$ (Watanabe *et al.*, 2017). Na esquistossomose antígenos dos ovos e citocinas, principalmente $INF\gamma$, são os principais responsáveis pela formação das CGM (Farah *et al.*, 2000; Lenzi *et al.*, 1998).

Figura 5 - Células Gigantes Multinucleadas encontradas em diferentes tipos de patologia. (A) Tuberculose crônica, mucosa bucal. (B) Granuloma central de células gigantes, posterior da mandíbula. (C) Reação de células gigantes de corpo estranho, tecido gengival. (D) Tumor de mandíbula. (E) Querubismo de mandíbula. (F) Cisto ósseo de mandíbula.

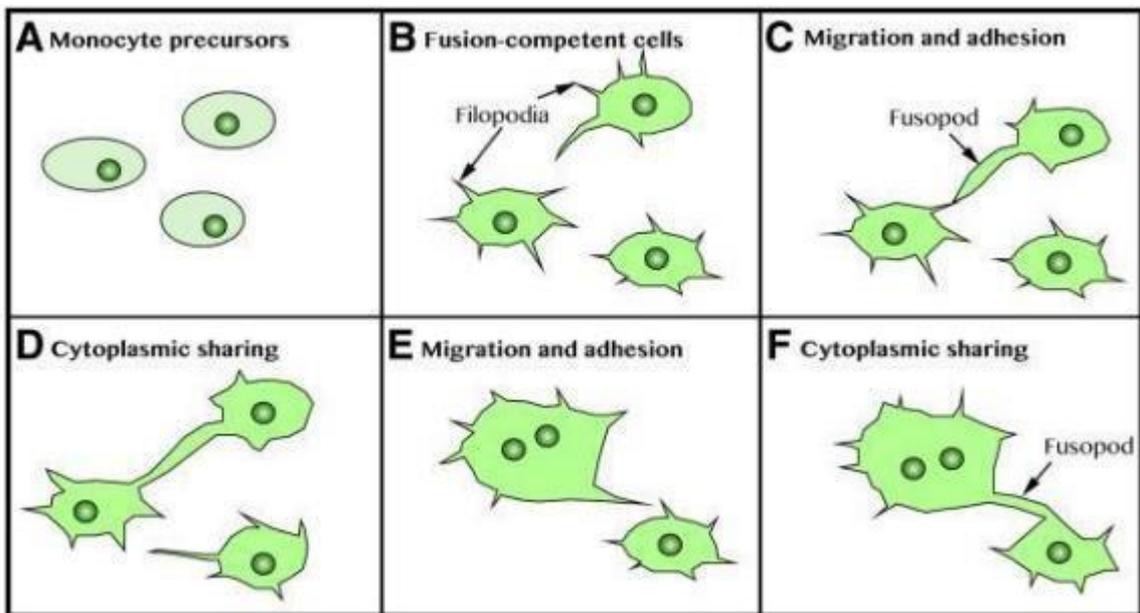


Fonte: Brooks *et al.*, 2019.

Existem vários subtipos de CGM, os subtipos mais estudados e que tem seu mecanismo de fusão bem esclarecido são os osteoclastos, que são um tipo de CGM especializadas em remoção de matriz óssea (Brooks *et al.*, 2019). Essas células exibem núcleos localizados apicalmente e fusão lisossomal com a membrana celular basal. Durante o processo de fusão o receptor de vitronectina (CD51 ou integrina $\alpha v\beta 3$), que também é um marcador para osteoclastos, permite a fixação da célula nas proteínas da matriz óssea (Brooks *et al.*, 2019).

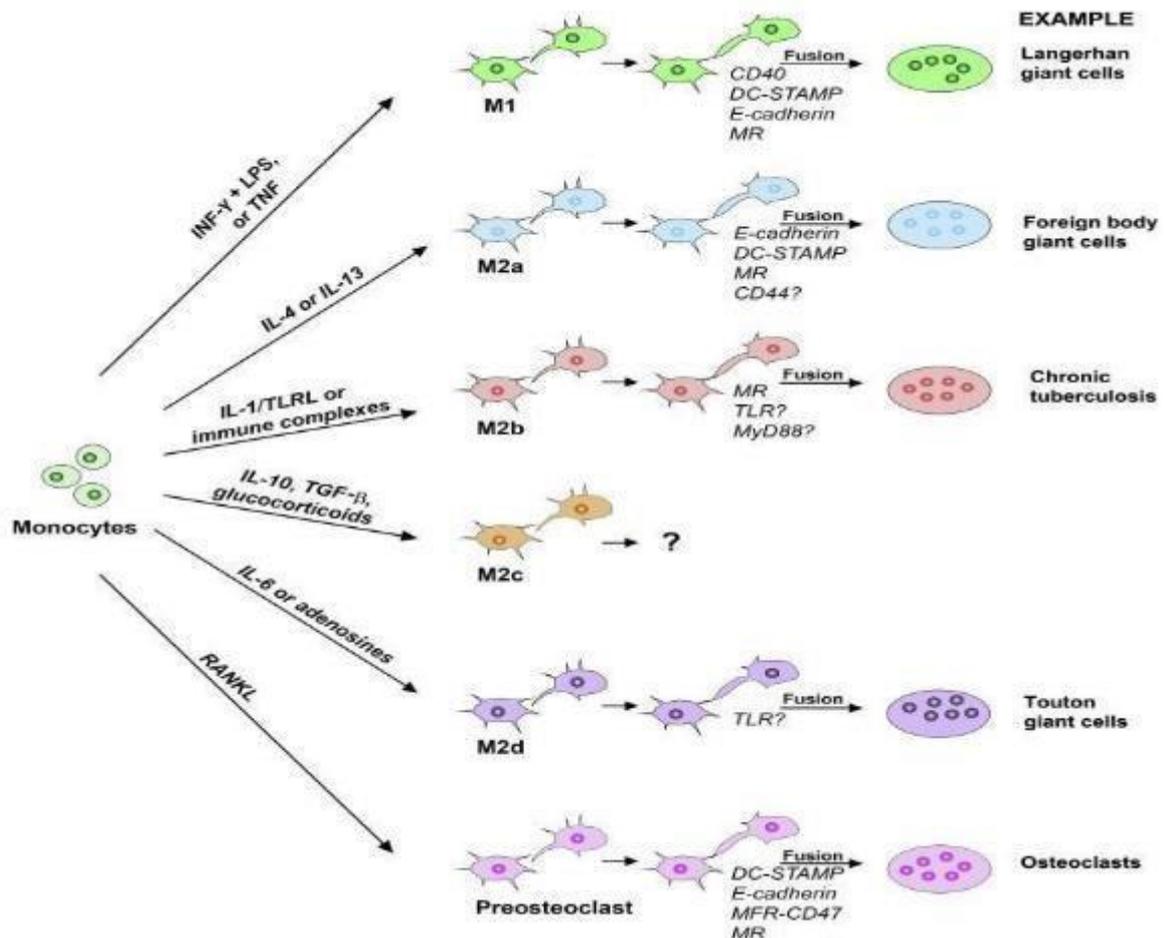
Outros tipos de CGM também tem seus mecanismos de fusão demonstrados: As células gigantes de corpo estranho, tendo seu mecanismo de fusão diretamente influenciado por IL-4 e IL-13 e a arginase1, a qual tem a função principal de fundir macrófagos comprometidos com a resolução de inflamações; As células gigantes de Langhans que apresentam núcleos localizados periféricamente (até 20 núcleos por célula), este tipo de célula é geralmente associada a granulomas gerados em resposta a infecções microbianas e acredita-se que sejam formadas a partir de macrófagos pró-inflamatórios como resultado da estimulação pelo fator estimulador de colônias de granulócitos-macrófagos, IFN- γ , IL-3 e fator de necrose tumoral (TNF) - α ; As células gigantes de Touton que contem múltiplos núcleos agrupados que são circundados por um citoplasma espumoso rico em lipídios acumulados, quando estimulados pelo fator estimulador de colônias de macrófagos, IFN- γ ou IL-6, os monócitos se fundem e formam CGM (Brooks *et al.*, 2019). O processo pelo qual as células se fundem para formar as CGM, assim como as moléculas envolvidas nesse processo ainda estão sendo esclarecidos, no geral o processo de fusão das células envolvem três etapas: O desenvolvimento das competências de fusão, onde a célula desenvolvem as moléculas necessárias para se fundirem (caderinas, DC-STAMP e receptores de manose); a aproximação das células, onde as células maiores procuram células menores para se fundirem, processo pelo qual envolve a regulação do citoesqueleto por proteínas específicas (RAC1) e ações de fosfolipídios presentes na membrana citoplasmática que através de ações quimiotáticas orientam a movimentação da célula e adesão aos substratos; a adesão celular e compartilhamento, uma vez aderidas com a participação de moléculas fusogênicas, proteínas específicas (PX1) ,controlam a permeabilidade através da camada fosfolipídica , aumentando a permeabilidade de íons entre as células (Brooks *et al.*, 2019). A Figura 6 mostra resumidamente os processos envolvidos na formação de CGM, a figura 7 mostra o processo de fusão de tipos diferentes de CGM e as principais moléculas fusogênicas envolvidas.

Figura 6 - Fases do processo de fusão das Células Gigantes Multinucleadas. A: monócitos precursores que adquirem competências através de citocinas fusogênicas; B: células competentes modulam moléculas de actina do citoesqueleto. C: células competentes migram através de componentes quimiotáticos e se aderem a outras células. D: remoção de membranas e compartilhamento de conteúdo citoplasmático. E: células maiores migram para se aderir a células menores. F: fusão e compartilhamento de células maiores com células menores.



Fonte: Brooks *et al.*, 2019.

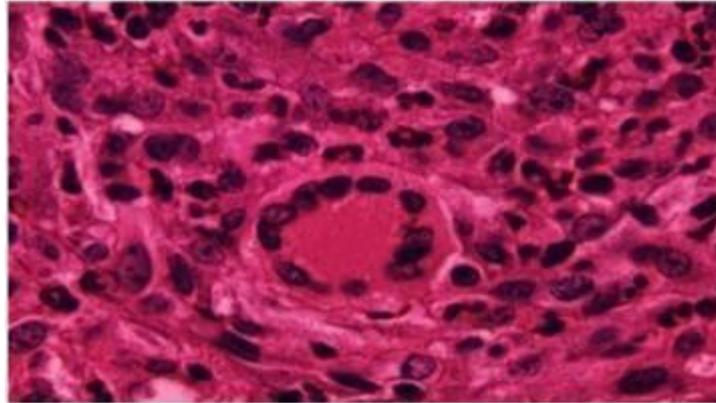
Figura 7 - Formação de Células Gigantes Multinucleadas. Monócitos precusores adquirem competências através de citocinas fusogênicas (IL-1, IL-6, IL10, TGF β , IL-4, IL13, INF γ). Após isto, células diferenciadas modulam seu citoesqueleto e migram até outras células e através de moléculas fusogênicas (DC-STASMP, Caderinas) e se fundem a outras células.



Fonte: Brooks *et al.*, 2019.

Em modelos murinos de granulomas esquistossomóticos existem 2 tipos de MGCs, um tipo aparece ao redor dos ovos, apresentando citoplasma rico em pigmento esquistossomal (células gigantes pigmentadas), o segundo tipo está presente na casca dos ovos, essas células aparecem mais em períodos produtivos e involutivos do granuloma (Lenzi *et al.*, 1998). Normalmente essas células gigantes aparecem em torno de 45 a 55 dias após a infecção, sendo mais comuns entre os 80 a 100 dias (Lenzi *et al.*, 1998). Análises funcionais das MGCs mostram que essas células possuem função fagocítica e de destruição de microrganismos, estando relacionadas com a resolubilidade do granuloma (Farah *et al.*, 2000).

Figura 8 - Célula Gigante Multinucleada em granuloma esquistossomótico murino. Coloração por HE e aumento de 100x.

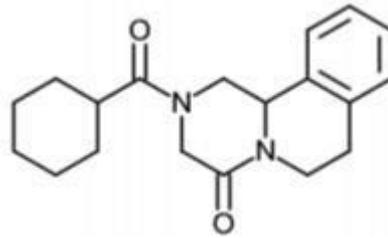


Fonte: Gusmão *et al.*, 2021.

2.6 TRATAMENTO DA ESQUISTOSSOMOSE

Descoberto na década de 70 e tendo seus compostos inicialmente pesquisados como tranquilizantes (pirazino-isoquinolina) o Praziquantel (PZQ) é o tratamento medicamentoso utilizado contra a esquistossomose, possui rápida absorção tendo sua concentração máxima no soro encontrada quatro horas após a hora, com poucos efeitos colaterais e com a terapêutica simples sendo necessária uma única dose (Mendonça *et al.*, 2016). As formulações atuais de PZQ são racematos, misturas que consistem em enantiômeros (R) e (S). O R-PZQ mostrou propriedades superiores ao seu S-enantiômero em atividades biológicas e citotoxicidade, com atividade antiesquistossomótica e taxas de redução de vermes muito mais altas, conforme indicado por valores muito mais baixos em IC50 (aproximadamente 500 vezes menor) e ED50 (5 vezes inferior) contra vermes do que seu enantiômero S, bem como menor citotoxicidade em várias linhagens celulares. In vivo, o PZQ é bem absorvido, mais de 80% da dose oral (levando em consideração o fármaco e os metabólitos inalterados) são eliminados por via renal, indicando uma alta fração de absorção (Kapungu *et al.*, 2020). PZQ possui metabolismo de primeira passagem rápido variando de acordo com cada indivíduo. A droga, depende do metabolismo para ser excretada com <0,02% do PZQ não metabolizado sendo detectado na urina (Kapung *et al.*, 2020). O PZQ age comprometendo a homeostase do Ca²⁺ no parasito, se ligando aos canais de Ca²⁺ dependentes de voltagem do parasito, promovendo contrações prolongadas da musculatura, causando paralisia e morte (Chienwuchai *et al.*, 2020; Mendonça *et al.*, 2016; Rang *et al.*, 2016).

Figura 9 - Estrutura química do Praziquantel.

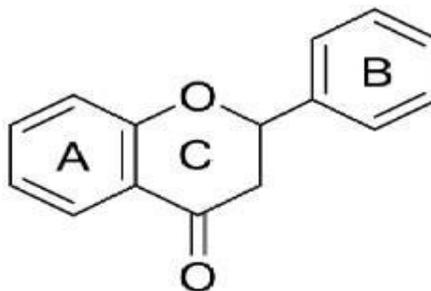


Fonte: Próprio autor.

Compostos naturais também desempenham grande interesse científico para o tratamento da esquistossomose. Dentre os compostos naturais os flavonoides representam um dos grupos de compostos fenólicos mais importantes e diversificados, estão amplamente distribuídos por todo o reino vegetal (Santos *et al.*, 2017, Machado *et al.*, 2008).

Os flavonoides têm sua estrutura química baseada no núcleo flavilium, o qual consiste em três anéis fenólicos. O benzeno do primeiro anel é condensado com o sexto carbono do terceiro anel, que na posição 2 carrega um grupo fenila como substituinte. O terceiro anel pode ser um pirano heterocíclico, gerando as estruturas básicas das leucoantocianinas e das antocianidinas, denominado de núcleo flavana. Devido ao fato do terceiro anel apresentar-se como uma pirona, ocorre a formação das flavonas, flavonóis, flavanonas, isoflavonas, chalconas e auronas, recebendo a denominação de núcleo 4-oxo-flavonóide (Santos *et al.*, 2017; Machado *et al.*, 2008).

Figura 10 - Estrutura química dos Flavonoides.

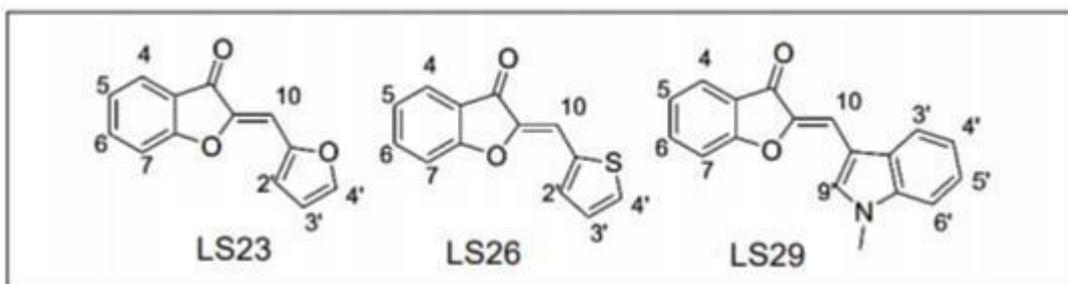


Fonte: Souza *et al.*, 2017.

Os flavonóides exercem funções importantes para os vegetais como: proteção contra radiação, regulação do crescimento e desenvolvimento, defesa contra infecções, quelação de metais tóxicos e efeitos antioxidantes (Torres, 2018; Santos *et al.*, 2017). Diversas funções farmacológicas foram atribuídas aos flavonoides: antioxidante, antiinflamatória, antifúngica, antiviral, antitumoral e bactericida (Torres, 2018; Sousa *et al.*, 2017; Machado *et al.*, 2008). Dentre as atividades antiparasitárias descritas, as atividades contra os protozoários *Plasmodium falciparum* e *Leishmania* merecem destaque (Uesawa *et al.*, 2017; Torres, 2018).

O foco deste trabalho se concentra na ação dos derivados dos flavonoides que denominamos de auronas. Esta classe de compostos de ocorrência natural pode ser obtida sinteticamente por meio de reações ciclização oxidativa de chalcona, ciclização de chalconas em meio DMSO e acetato de mercúrio e a partir de reações de condensação de benzofuronas e derivados de benzo aldeídos (Torres, 2018). Ensaios anteriores revelaram que três exemplares sintéticos de auronas (LS23 LS26 e LS29) apresentaram atividades *in vitro* contra vermes adultos de *S. mansoni*, promovendo danos no tegumento, redução da atividade motora e morte em 100% dos vermes, nas doses de 100 μ M e 50 μ M.

Figura 11 - Estrutura química das auronas sintéticas LS23, LS26 e LS29.



Fonte: Torres, 2018.

Em experimentos realizados *in vivo*, os compostos sintéticos LS26 e LS29 mostraramse efetivas na redução da carga parasitária (Torres, 2018). Os estudos *in vivo* utilizaram seis grupos experimentais incluindo grupo controle não tratado e um grupo controle tratado com PZQ (400mg/Kg), os demais grupos foram tratados em esquemas de dose única (DU) e duas doses (2D) recebendo doses de 50mg/Kg e 100mg/Kg. O composto LS26 na concentração de 50mg/Kg em esquema terapêutico de 2D apresentou uma redução de 56,16% da carga parasitária em comparação com os grupos controles (Torres *et al.*, 2021). Em relação ao composto LS29 houve a redução de 57,61% no grupo tratados com dose de 50mg/Kg em 2D.

(Torres *et al.*, 2021). Sendo assim o presente estudo tem o intuito de analisar a dinâmica dos granulomas esquistossomóticos de animais infectados, tratados com PZQ e animais infectados e tratados com auronas sintéticas, avaliando os parâmetros morfométricos e histológicos da desta dinâmica sob várias colorações.

2.7 CORANTES UTILIZADOS NAS INVESTIGAÇÕES TECIDUAIS DE LESÕES HEPÁTICAS

Diversos corantes apresentam princípios histoquímicos capazes de evidenciar elementos constituintes nos tecidos, incluindo o tecido hepático. Inúmeros estudos utilizam metodologias histológicas para avaliar nos tecidos consequências de distúrbios funcionais, alterações decorrentes de falhas metabólicas e investigação de eficácia no tratamento de princípios farmacológicos, entre outros (Raso, *et. al.*, 1983; 2017; Freitas, 2021). Apesar de autores ressaltam a contribuição das técnicas histológicas convencionais na investigação morfológica (Peres *et al.*, 2018; Nataraj *et al.*, 2015; McGregor *et al.*, 2019), o aprofundamento nos questionamentos levantados pelas recentes investigações científica, alavanca também o aprimoramento das técnicas investigativas de alterações morfológicas teciduais. Pesquisas atualmente avaliam alterações histológicas através imagens em 3D obtidas por escâner de lâminas histológicas. (Amaral, *et. al.*, 2017). Alguns dos princípios histoquímicos envolvem a distinção do colágeno no corte histológico, sendo este um elemento tecidual alterado no processo inflamatório, que demarcar as formações granulomatosas, representando um importante elemento para a observação de lesões histológicas (Leite, *et. al.* 2020; Chapadeiro & Pitanga, 1997).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVOS GERAIS

Analisar a dinâmica do granuloma de animais infectados e tratados com praziquantel e as auronas sintéticas LS26 e LS29.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar como diferentes colorações podem melhorar as métricas de avaliação dos

granulomas esquistossomóticos;

- Analisar como o tratamento com o praziquantel afeta a dinâmica dos granulomas; - analisar como o tratamento com as auronas sintéticas LS 26 e LS29 podem afetar a dinâmica dos granulomas; e
- Avaliar quali e quantitativamente a prevalência e cinética das células gigantes multinucleadas nos granulomas esquistossomos dos animais envolvidos na experimentação.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 DESENHO EXPERIMENTAL E LOCAIS DE PESQUISA

Foi realizado um estudo laboratorial experimental, de caráter quali-quantitativo, no Laboratório de Esquistossomose do Centro de Pesquisas René Rachou, Fiocruz/MG, em parceria com o Laboratório de Estrutura e Função de Proteínas, do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal de Juiz de Fora e com o Laboratório de Morfologia vinculado Departamento de Morfologia da Universidade federal de Juiz de Fora.

4.2 OBTENÇÃO DAS AURONAS

As moléculas foram sintetizadas e cedidas pelo Núcleo de Identificação e Pesquisa de Princípios Ativos Naturais - NIPPAN, da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Juiz de Fora, coordenado pelo professor Doutor Ademar Alves da Silva Filho.

4.3 INFEÇÃO E CICLO

Foram utilizados 150 camundongos albinos da linhagem Swiss obtidos e mantidos nas dependências do Biotério do Centro de Pesquisas René Rachou, foram submetidos à infecção bissexual, por via subcutânea, com aproximadamente 100 cercárias/animal de *shistosoma mansoni*. As condições de acesso à ração e à água foram mantidas ad libitum.

Ao final de 55-60 dias pós-infecção, os animais foram sacrificados sob anestesia profunda com Ketamina e Xilazina nas doses de 90 mg/kg e 10 mg/kg de peso corporal, respectivamente. Após a eutanásia, amostras sangue e tecidos (fígado) foram retirados para análises bioquímicas e montagem de lâmina histológicas para análises microscópicas.

4.4 FIXAÇÃO E PROCESSAMENTO DA AMOSTRA

Amostras de fígado após removidas foram fixadas em formaldeído 10%, em seguida as amostras são clivadas e acondicionadas em cassetes histológicos e postas em cestos para o processamento automatizado em processador automático (modelo PT 05 LUPETEC® 277.828, série 0268), onde as amostras passaram pelos seguintes estágios: Desidratação (passo 1- álcool 70% durante 1 hora; novamente em álcool 70% por 1 hora; passo 2- álcool 80% durante 1 hora, novamente em álcool 80% por 1 hora; passo 3 álcool 90% durante 1 hora, novamente em álcool 90% por 1 hora; passo 4- álcool 100% durante 1 hora, e novamente em álcool 100% por 1 hora), diafanização com xilol, sendo submerso duas vezes durante 1 hora cada. Por fim, continuando a sequência no processador, o material foi impregnado com parafina histológica (duas baterias em parafina com duração de 1 hora e meia cada).

4.5 MONTAGEM DOS BLOCOS E MICROTOMIA

As amostras devidamente processadas foram incluídas em blocos de parafina utilizando a Central de inclusão (LUPETEC®, modelo CI 2013, série 0018). Os blocos foram cortados em micrótomo (MRP09 LUPETEC®-277.828, série 0175) na espessura de 5µm, levados a banho maria em água a 24°C (Banho histológico LUPETEC®, modelo BH 2015) para abrir o corte histológico e iniciar a etapa de desparafinização, possibilitando a montagem do tecido em lâminas de vidro.

4.6 REMOÇÃO DA PARAFINA DO CORTE, REIDRATAÇÃO, COLORAÇÃO E MONTAGEM DAS LÂMINAS

Após o tecido ser depositado sobre a superfície de uma lâmina de vidro, esta é colocada em uma estufa de secagem a 65°C por 40' para a remoção da parafina do corte. Em seguida as lâminas são submersas sequencialmente em três recipientes com xilol 100%, ficando submersas 5 minutos em cada recipiente. Na sequência será realizado a reidratação dos espécimes (5 min. álcool 100%, 5 min álcool, 90%, 5min álcool, 80% e água corrente por 3 minutos). Os cortes histológicos de cada grupo de tratamento serão corados com Hematoxilina/ Eosina (HE) (1 minuto na hematoxilina e 1 minuto na eosina), Tricromico de gomori (GOM) (hematoxilina de Herris por 1min, passagem rápida pelo álcool clorídrico ((350ml de álcool , 150ml H₂O e 5ml de HCL) e por água corrente e corada com a solução

reagente (Cromotrope 2R 0,6g, Fast green 0,3g, ácido acético 1ml, ácido fosfotúngstineo 0,8g e água destilada 100ml)) e Picrosírius (PICRO) ((coloração com hematoxilina de Herris por 5 minutos, logo após foram coradas com o reagente Sirius Red(0,2g de sírius red, 100ml de ácido pícrico saturado), lavadas em solução de HCl (55 gotas de HCl 1N e 100 ml de água destilada)). Em sequência, as lâminas coradas pelos respectivos corantes passaram rapidamente por uma bateria de álcool para serem desidratadas (80%, 90% e 100%) e pelo xilol 100%, preparando para a montagem da lâmina histológica com resina e lamínula.

4.7 MEDIDAS DAS ÁREAS DOS GRANULOMAS E CONTAGEM DAS CÉLULAS MULTINUCLEADAS

Cada corte histológico teve sua total área inspecionada para identificação e mensuração dos granulomas hepáticos decorrentes da infecção do parasita. A medição transcorreu estabelecendo como critérios padrão que os granulomas fossem individualizados, sem sobreposição de áreas, apresentando toda a coleção de células do infiltrado inflamatório organizada ao seu redor, e com a presente o ovo do parasita. As medidas das áreas, contagem de granulomas e contagem de células gigantes multinucleadas foram efetuadas utilizando o microscópio trinocular (ZEISS®, modelo Pimo Star, série 31200005754) e o sistema de captura de imagem composta pela câmera (ZEISS®, AxioCam ERS 5s MKG-2732) e o software (Imaging Software, ZEISS® ZEN 2012 -01.20Q5). Foi utilizada a objetiva 10X para medir as áreas e a objetiva de 40X para visualização e contagem de células gigantes multinucleadas.

4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Comparação da coerência de resultados entre observadores. Cada dois dos três corantes (PICRO, HE e GOM) foram analisados de forma pareada, para as leituras de dois observadores, realizadas em uma mesma lâmina para avaliar se as correlações das leituras de ambos foram significativas (correlações de Pearson), e possíveis diferenças médias para as respostas áreas e contagens de granulomas foram avaliadas pelo teste t de Student para amostras pareadas. Gráficos de dispersão foram apresentados. Comparação pareada dos corantes (único observador). Cada dois dos três corantes (PICRO, HE e GOM) foram comparados de forma pareada por leituras de um único observador realizadas em lâminas oriundas de uma mesma amostra, para avaliar se houve tanto correlações significativas dos

corantes entre si (correlação de Pearson), como possíveis diferenças médias entre os corantes para as respostas áreas e contagens de granulomas, pelo teste t de Student para amostras pareadas. Gráficos de dispersão foram apresentados e também equações de ajuste, quando pertinentes.

Efeito dos tratamentos. O efeito dos tratamentos sobre diversas respostas numéricas como contagens e áreas de granuloma, entre outras, foi avaliado por análise de variância, usando o teste t de Student como teste complementar de comparação das médias, sendo o nível de significância de 5%.

4.9 ASPECTOS ÉTICOS

Sob a observância dos Princípios Éticos da Experimentação Animal, a presente pesquisa foi submetida à apreciação do Comitê de ética para o uso de animais da FIOCRUZ (CEUA), obtendo autorização segundo ofício nº LW21/16.

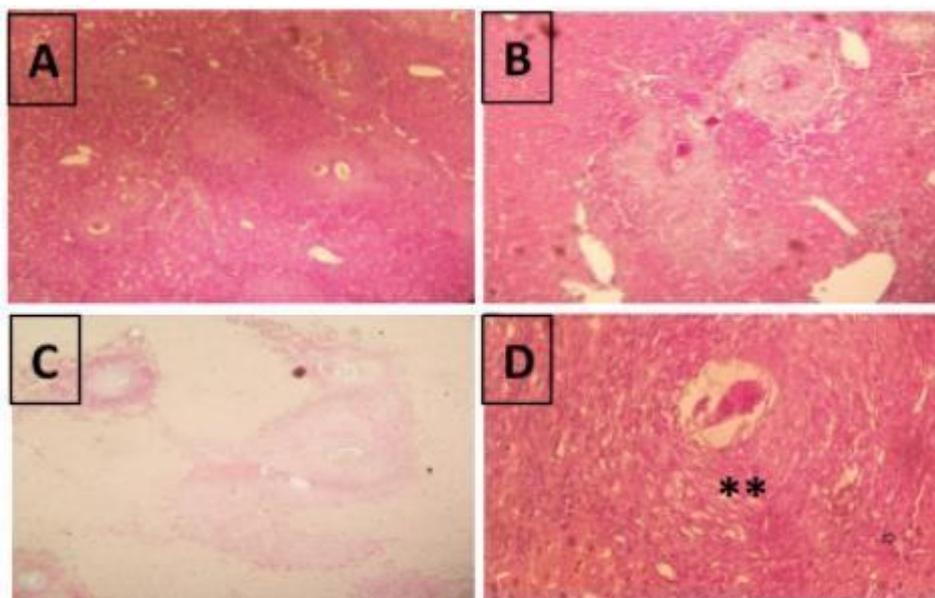
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ÁREAS DOS GRANULOMAS MEDIDAS EM DIFERENTES TIPOS DE CORANTES

Existem princípios histoquímicos capazes de evidenciar elementos constituintes nos tecidos, incluindo o tecido hepático. Alguns destes princípios envolvem a distinção do colágeno, que é um dos componentes alterados no processo inflamatório, demarcando as formações granulomatosas. Nesta dissertação, lâminas com cortes histológicos de fígado de camundongos albinos da linhagem Swiss, infectados com cercárias de *shistosoma mansoni*, foram coradas com três corantes diferentes, Hematoxilina e Eosina (HE), Tricrômico de Gomori (GOM) e Picrosirius (PICRO) (Figura 12), sendo que os corantes GOM e PICRO apresentam propriedades histoquímicas que evidenciam o colágeno. Estes corantes foram empregados para avaliar o seu efeito sobre a eficiência métrica na mensuração da área dos granulomas hepáticos resultantes da infecção, e na quantificação dos mesmos, assim como também na identificação e contagem das células gigantes multinucleadas. A análise das médias das áreas dos granulomas em cada coloração (HE, GOM e PICRO) pelo teste T de Student, não identificou diferença significativa entre elas ($p > 0,05$) (Figura 13A). O coeficiente de variação (CV) foi alto (113,38%), apesar de as amostras dos indivíduos terem sido analisadas em blocos por animal. Ou seja, apesar de reduzir as diferenças individuais

com a blocagem, o CV para a avaliação das áreas pelos três corantes ainda foi extremamente alto.

Figura 12 - Aspectos gerais dos granulomas hepáticos de *Schistosoma mansoni* revelados por distintos corantes. Cortes histológicos de fígado de camundongos experimentalmente infectados por *S. mansoni*. As lâminas foram coradas por HE (A), GOM (B) e PICRO (C) onde podemos evidenciar as fibras colágenas e obter uma imagem do granuloma com ovo ao centro. A imagem da letra D, foi corada por HE fotografada na objetiva 40x, mostrando o arranjo concêntrico das células e fibras ao redor do ovo.



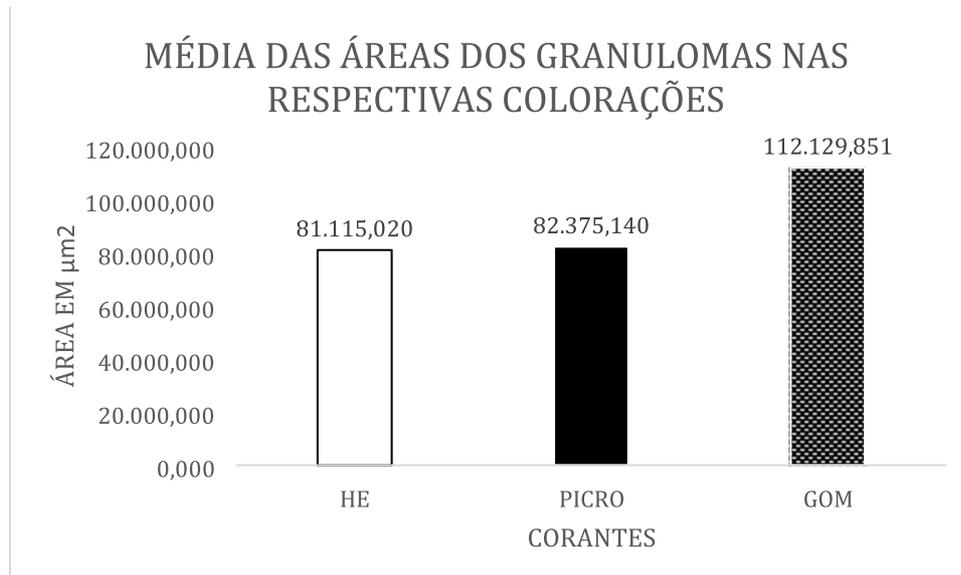
Fonte: Próprio autor.

Tabela 2 - Médias das áreas dos granulomas hepáticos de camundongos infectados com *Schistosoma mansoni*, observados para um mesmo corte histológico hepático corada com HE, PICRO e GOM.

Tratamento	Média área (μm^2)	Resultado teste "T"
HE	81.115.020,259	A
PICRO	82.375.139,862	A
GOM	112.129.850,690	A
CV = 113,38%		

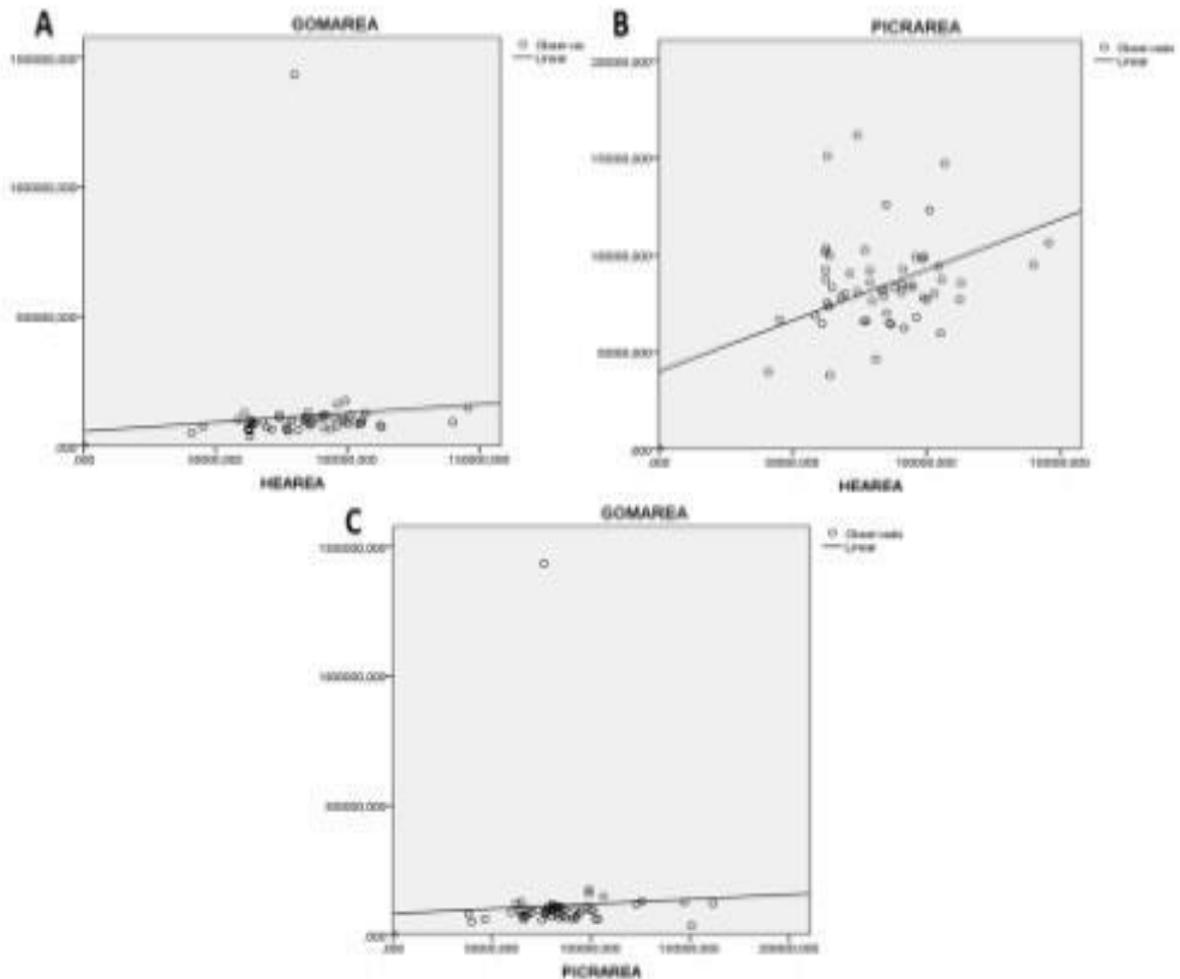
Fonte: Próprio autor.

Figura 13 - Análise das médias das áreas dos granulomas, empregando três colorações distintas, HE, PICRO e GOM. A tabela (A) e o gráfico B resumizam os valores observados para as médias das áreas dos granulomas mensurados.



Fonte: Próprio autor.

Figura 14 - Análise de correlação dos valores das médias das áreas dos granulomas observados e mensurados por um avaliador, empregando três colorações distintas, HE, PICRO e GOM. Em (A) estão os dados da correlação entre os valores das áreas mensuradas para os corantes HE e GOM, em (B) a correlação para os corantes HE e PICRO. O gráfico em (C) apresenta a correlação entre os valores das áreas mensuradas para os corantes GOM e PICRO.



Fonte: Próprio autor.

Os resultados das análises das correlações dos valores das áreas dos granulomas mensurados nos três corantes estão apresentados na Figura 14. Observou-se que a correlação das áreas com PICRO e HE foi de 0,473 e significativa ($p < 0,001$; Figura 14B). Entretanto a correlação entre os corantes GOM e HE foi baixa (0,098) e não significativa ($p = 0,46$), assim como também não foi significativa a correlação entre os valores das áreas com PICRO e GOM (0,057) ($p=0,67$) (Figura 14).

5.2 NÚMERO DE GRANULOMAS MEDIDOS POR CORANTES

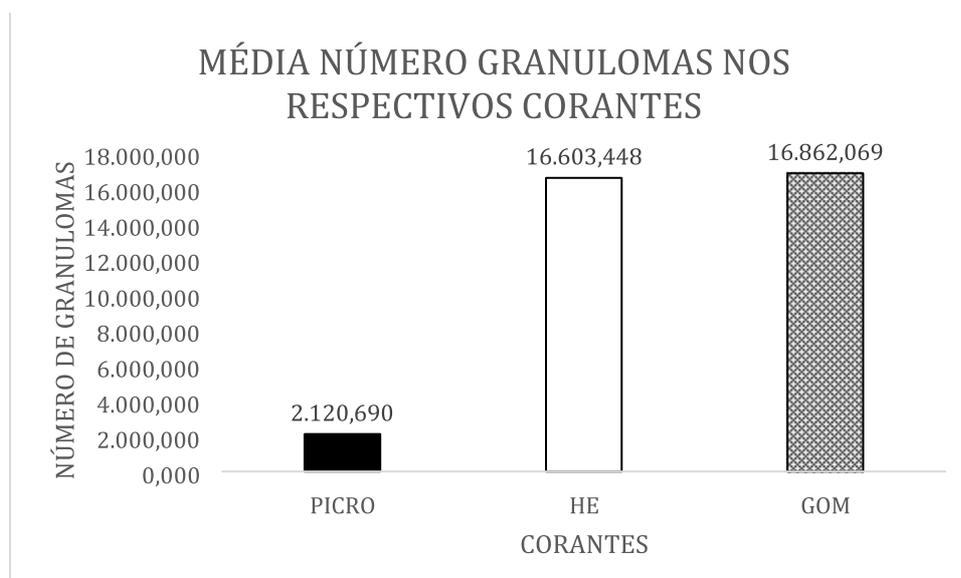
As médias do número de granulomas observados em cada coloração não diferiram significativamente entre HE e GOM, mas foram maiores ($p < 0,05$) que a média do número encontrado quando corado por PICRO, com CV de 31,98% (Tabela 3) (Figura 15)

Tabela 3 - Médias dos números de granulomas hepáticos de camundongos infectados com *Schistosoma mansoni*, observados para uma mesma área de corte histológico hepático corada com HE, PICRO e GOM.

Tratamentos	Médias (μm^2)	Resultados do teste "T"
PICRO	2.120,690	a
HE	16.603,448	b
GOM	16.862,069	b

Fonte: Próprio autor.

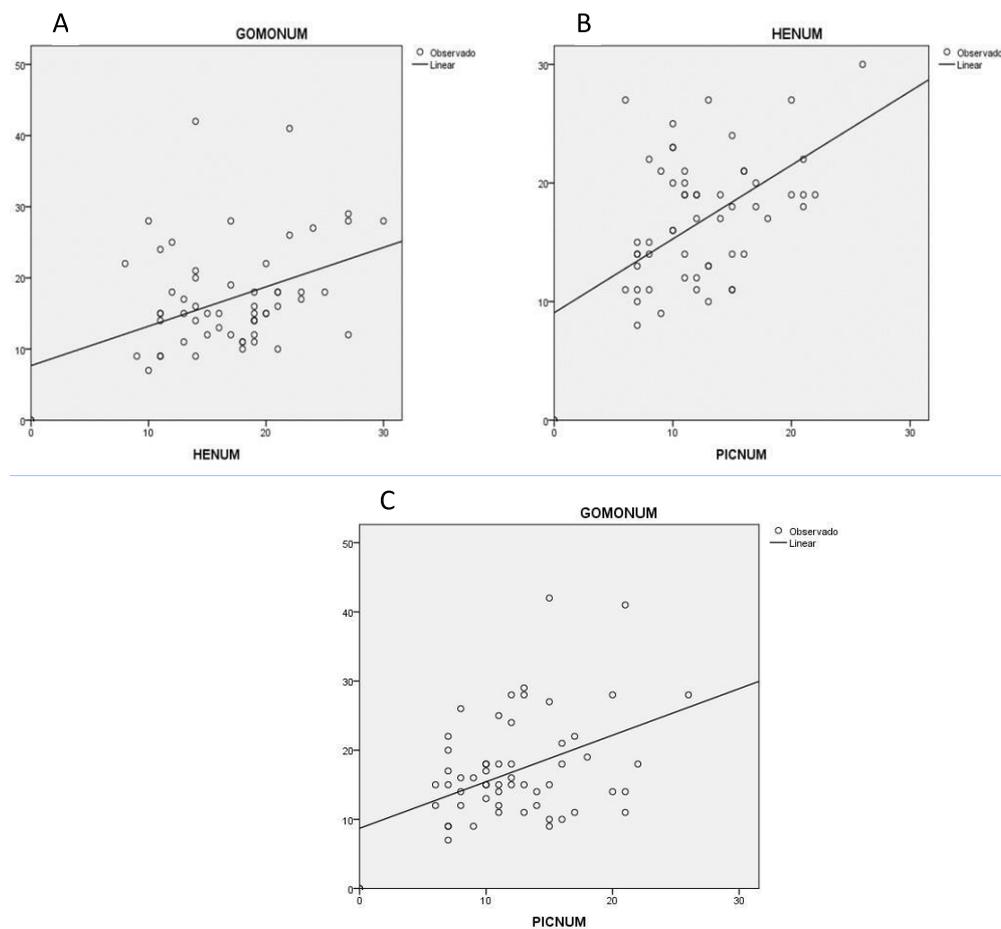
Figura 15 - Médias dos números de granulomas hepáticos de camundongos infectados com *Schistosoma mansoni*, observados para uma mesma área de corte histológico hepático corada com HE, PICRO e GOM.



Fonte: Próprio autor.

Os gráficos com as análises das correlações entre os números de granulomas observados nos cortes podem ser visualizados na Figura 16.

Figura 16 - Análise de correlação dos valores dos números de granulomas observados em três colorações distintas, HE, PICR e GOM. Em (A) a correlação apresentada se refere aos números de granulomas observados nas lâminas coradas com GOM e HE. Em (B) a correlação entre ao número de granulomas das lâminas coradas com HE e PICRO. O gráfico (C) apresenta a correlação do número de granulomas em cortes histológicos corados com GOM e PICRO



Fonte: Próprio autor.

A correlação do número de granulomas visualizados através da coloração pelo GOM e pelo PICRO foi de 0,43 e significativa ($p = 0,001$) (Figura 15C). Uma relação semelhante foi observada entre o número de granulomas pelo GOM e HE, cujo valor foi de 0,41 e significativa ($p = 0,001$) (Figura 15A). Desta forma, também poderia ser pensada uma equação de ajuste de um em função do outro, que no caso seria: $GOMONUM = 7,67 + 0,55$ (HENUM), que é uma equação de primeiro grau do tipo $\hat{y} = a + bx$. Neste caso, esta equação seria prescindível, já que não houve evidências de diferenças significativas ($p = 0,79$) das

leituras pareadas do número de granulomas de um e outro corante. Ou seja, as leituras de um e outro corante, além de correlacionadas significativamente, não apresentaram diferenças significativas nos valores médios dos números. Ou seja, uma situação que abona um ou outro corante para a referida intenção: medida de números de granulomas. A correlação do número de granulomas entre os corantes HE e PICRO foi de 0,53 e significativa ($p < 0,001$) (Figura 15B). Portanto, poderia ser pensada também uma equação de ajuste de um em função do outro, que no caso seria: $HENUM = 9,06 + 0,62 (PICNUM)$, que é uma equação de primeiro grau do tipo $\hat{y} = a + bx$. Esta equação seria importante para ajustar os valores de um em função do outro, já que as diferenças médias pareadas dos números HE - PIC foram de 4,48 (IC95% 3.06-5.89) e, portanto, significativas ($p < 0,001$).

5.3 DISTÂNCIA ENTRE AS CELULAS GIGANTES MULTINUCLEADAS EM RELAÇÃO AO NÚCLEO DO GRANULOMA

Foram medidas as distâncias das CGM até o centro do granuloma, ou seja, até o ovo, as médias das distâncias entre as CGM e o centro do granuloma são apresentadas na Tabela 4. A análise de variância não encontrou um efeito significativo dos tratamentos sobre a distância da CGM até o núcleo do granuloma ($p=0,72$). Entretanto, o N foi muito pequeno ($n=38$) e o CV é relativamente alto (59%). Média geral das distâncias observadas: 101.29 μm .

Tabela 4 - Médias das distâncias em micrômetros entre as CGM e o núcleo do granuloma (centro do granuloma, medido pela região central do ovo contendo miracídio)

Compostos	Esquema terapêutico	Distância (µm)
Controle	-----	120.49
PZQ	Dose única	136.59
LS2650DU	Dose única	78.19
LS26100DU	Dose única	128.27
LS26502D	Duas doses	77.11
LS261002D	Duas doses	116.26
LS2950DU	Dose única	94.935
LS29100DU	Dose única	102.60
LS29502D	Duas doses	102.34
LS291002D	Duas doses	62.03

Fonte: Próprio autor.

5.4 INFLUÊNCIA DO TRATAMENTO COM AURONAS SINTÉTICAS LS29 E LS26 NAS ÁREAS DOS GRANULOMAS

As médias das áreas dos granulomas medidas com a influência de seus respectivos tratamentos estão representados na Tabela 5. Para as áreas dos granulomas, LS261002DA e LS291002DA apresentaram médias de áreas menores e significativamente diferentes de PZQ, pelo teste T de Student e a análise de variância ($p = 0,0404$) reforça que os tratamentos foram uma fonte de variação significativa, sendo o CV de 27,46% (Figura 17).

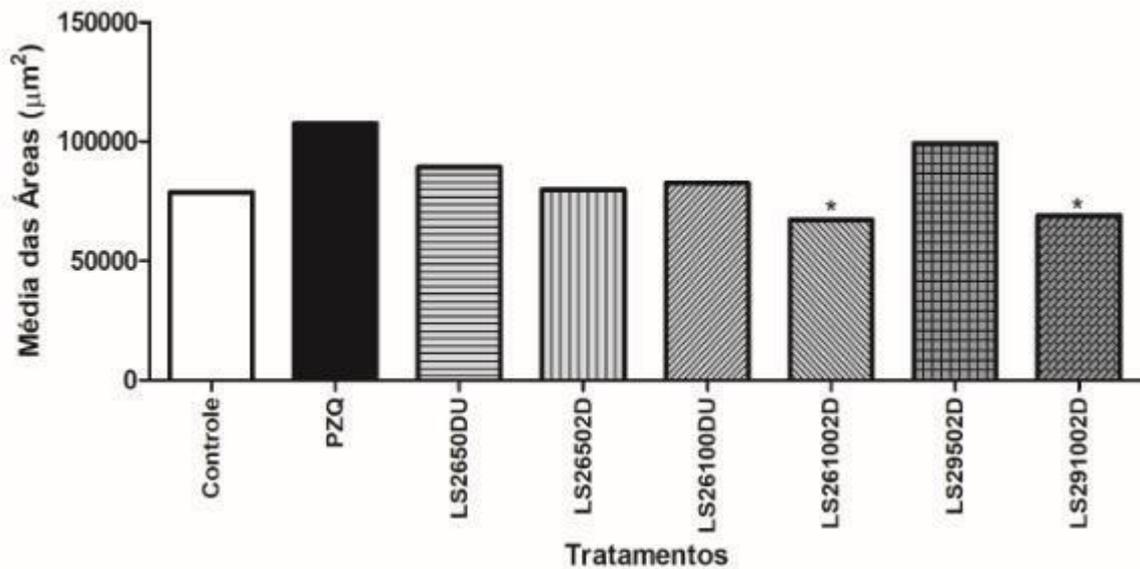
Tabela 5 - Médias das áreas dos granulomas hepáticos dos animais controle e tratados com praziquantel e auronas sintéticas (LS26 e LS29) em esquemas terapêuticos distintos.

Tratamento	Média	Resultado. Teste "T"
LS261002DA	67.325.668,364	a
LS291002DA	69.005.352,625	a
CONT	78.813.010,429	ab
LS26502DA	79.938.279,333	ab
LS26100DUA	82.673.156,375	ab
LS2650DUA	89.269.668,929	ab
LS29502DA	99.196.496,625	ab
PZQ	107667.170,167	b

CV = 27,46%

Fonte: Próprio autor.

Figura 17 - Análise da média das áreas dos granulomas hepáticos dos animais infectados com *S.mansoni* e tratados com as auronas sintéticas LS26 e LS 29.



Fonte: Próprio autor.

Para número de granulomas, LS261002DA mostrou significativo menor número de granulomas que LS2650DUA, pelo teste T de Student ($p=0,0404$, CV = 34,65%). A análise

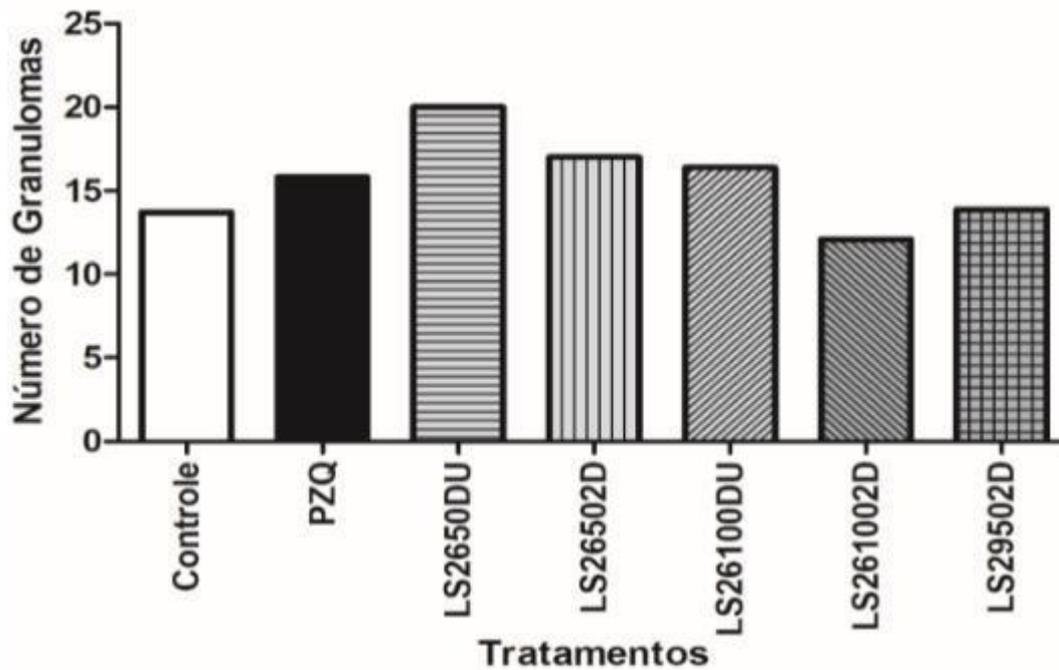
de variância reforça que tratamentos foi uma fonte de variação importante para a resposta número de granulomas ($p = 0,06$).

Tabela 6 - Médias do número de granulomas hepáticos dos animais do grupo controle e tratados com praziquantel e auronas sintéticas LS26 e LS29 em esquemas terapêuticos distintos.

Tratamento	Média Número Granulomas	Resultado teste "T"
LS261002DA	12.090,909	a
CONT	13.714,286	ab
LS29502DA	13.875,000	ab
PZQ	15.833,333	ab
LS26100DUA	16.375,000	ab
LS26502DA	17.000,000	ab
LS291002DA	17.250,000	ab
LS2650DUA	20.000,000	b
CV =19.26%		

Fonte: Próprio autor.

Figura 18 - Avaliação das médias globais dos granulomas hepáticos dos animais experimentalmente infectados e tratados.



Fonte: Próprio autor.

5.5 INFLUÊNCIA DO TRATAMENTO NO NÚMERO DE CÉLULAS GIGANTES MULTINUCLEADAS

A tabela 7 mostra que o tratamento influencia na relação CGM/GRAN. A análise de variância demonstrou que tratamentos influenciaram significativamente na relação CGM/GRAN ($p = 0,0003$), sendo que o grupo LS261002D apresentou a média da relação significativamente diferente de LS29100DU.

Tabela 7 - Médias da relação do número de Células Gigantes Multinucleadas por Granuloma do tecido hepático de animais tratados com as auronas sintéticas LS26 e LS29 em esquemas terapêuticos distintos.

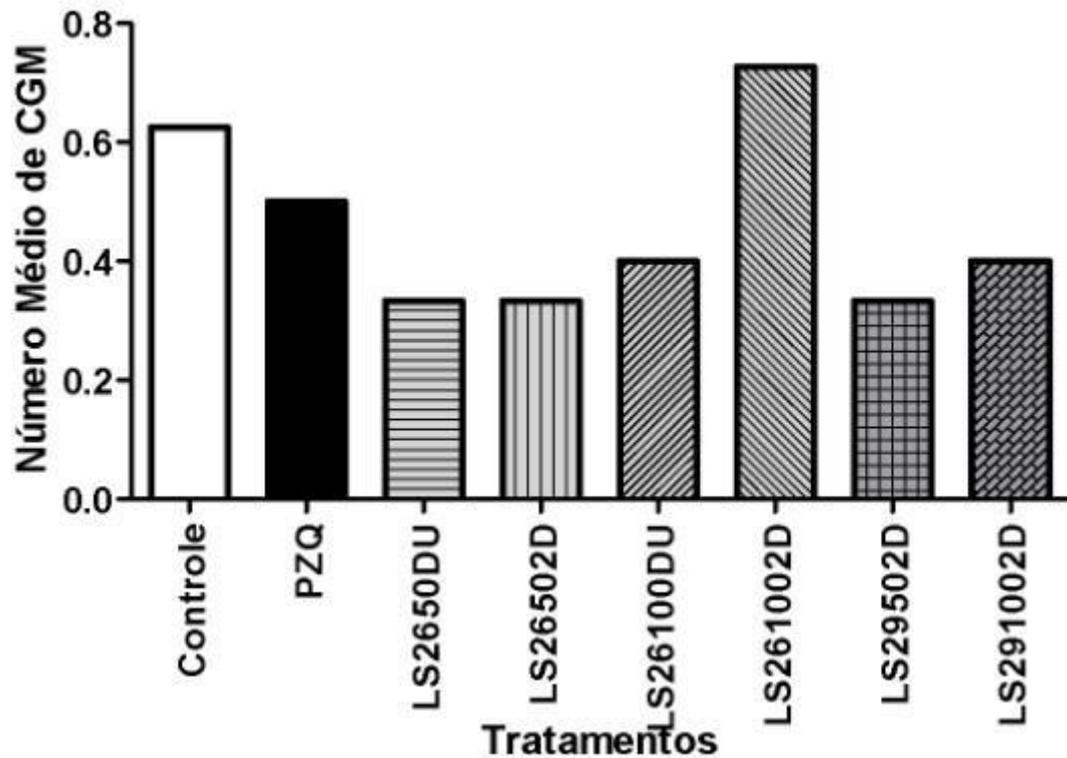
Tratamento	Média CGM / GRAN	Resultado teste "T"
LS29100 DU	0.142857	a
LS291002D	0.200000	ab
LS2650DU	0.333333	ab
LS26502D	0.333333	ab
LS29502D	0.375000	ab
LS291002D	0.400000	ab
LS26100DU	0.400000	ab
PZQ	0.500000	ab
Controle	0.625000	ab
LS261002D	0.727273	b

CV = 163,25%

Fonte: Próprio autor.

A figura 19 mostra as médias do número de CGM nos granulomas hepáticos dos animais tratados com as auronas sintéticas LS26 e LS29. Pelo teste T de Student foi observado que não existem diferenças significativas entre os grupos.

Figura 19 - Avaliação do número médio de células gigantes multinucleadas presentes nos granulomas hepáticos dos animais experimentalmente infectados e tratados.



Fonte: Próprio autor.

5.6 CONTAGEM DE CÉLULAS PIGMENTADAS

A tabela 8 mostra que o tratamento teve influência na contagem de células pigmentadas. A análise de variância demonstrou que tratamentos influenciaram significativamente na contagem de pigmentados ($p = 0,0158$), sendo que o grupo LS26100DU e controle apresentaram a maior contagem e significativamente diferente dos grupos LS26502D, LS2650DU, LS291002D, LS29502D e LS261002D, pelo teste T de Student.

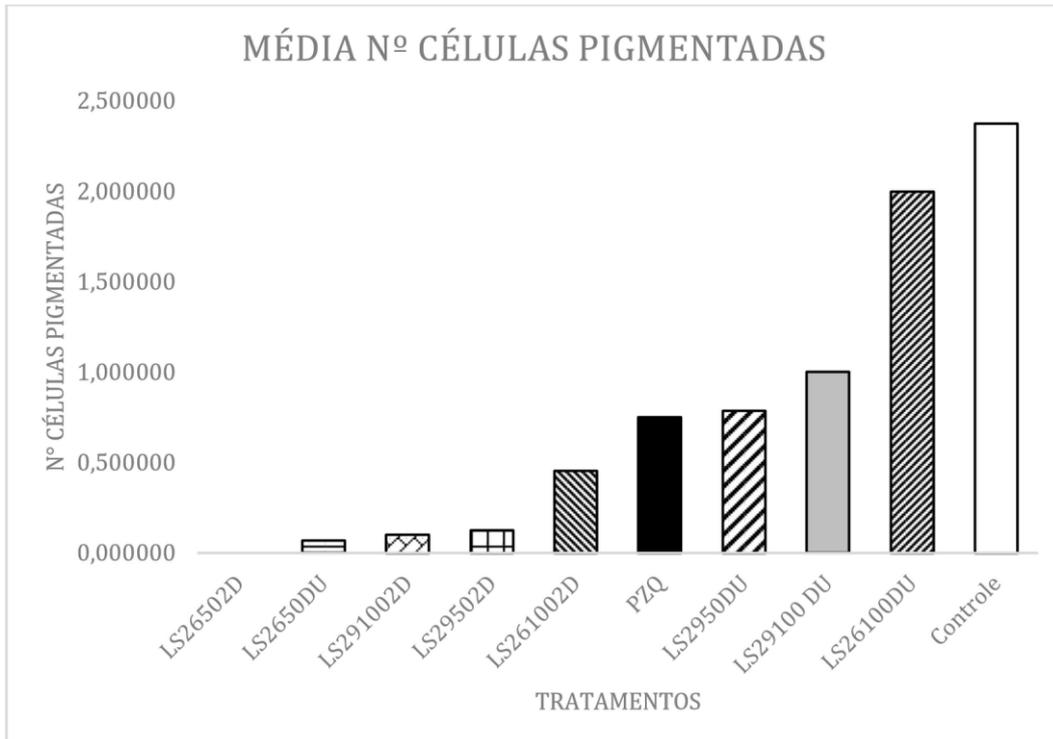
Tabela 8 - Análise das médias dos números de células pigmentadas do tecido hepáticos de animais do grupo controle e tratados com praziquantel e auronas sintéticas LS26 e LS29 em esquemas terapêuticos distintos.

Tratamento	Média Número Células Pigmentadas	Resultado teste "T"
LS26502D	0,000000	a
LS2650DU	0,066667	a
LS291002D	0,100000	a
LS29502D	0,125000	a
LS261002D	0,454545	a
PZQ	0,750000	ab
LS2950DU	0,785714	ab
LS29100 DU	1,000000	abc
LS26100DU	2,000000	bc
Controle	2,375000	c

Cv = 225,99%

Fonte: Próprio autor.

Figura 20 - Avaliação do número médio de células pigmentadas presentes nos granulomas hepáticos do grupo controle e tratados com praziquantel e auronas sintéticas LS26 e LS29 em esquemas terapêuticos distintos.



Fonte: Próprio autor.

5.7 DISCUSSÃO

De acordo com a descrição de Lenzi e colaboradores (1998) o granuloma esquistossomótico é uma estrutura organoide, dinâmica e híbrida, formada por componentes pertencentes tanto ao ovo quanto ao hospedeiro, em que o principal objetivo é isolar os produtos antigênicos liberados pelo miracídio e proteger os tecidos do hospedeiro, apresentando fases de maturação e involução em seu desenvolvimento, até seu completo desaparecimento. A fase exsudativa produtiva corresponde à linha divisória entre essas fases, sendo que o fator determinante para essa virada funcional é a morte do miracídio (LENZI *et al.*, 1998, 2006)

Os procedimentos histológicos são ferramentas importantes na composição de metodologias que avaliam alterações orgânicas e metabólicas em organismos vivos. Corroborando, Amaral *et al.*, 2017 realizou um estudo usando o software Whole Slide Imaging (WSI) de alta resolução, que permite a varredura rápida de lâminas histológicas inteiras e várias avaliações morfométricas, avaliando resposta granulomatosa elicitada em

órgãos-alvo (fígado, intestino delgado e grosso) de dois modelos de esquistossomose mansônica. Uma das vantagens do WSI, também denominado microscopia virtual, é que ele gera imagens que oferecem simultaneamente alta resolução e amplo campo de observação. Portanto, é fundamental que os procedimentos de avaliação morfológica tecidual estejam rotineiramente sendo aprimorados, para acompanhar os crescentes desafios da pesquisa científica. Contudo, alguns pesquisadores também consideram que técnicas histológicas convencionais, são preferencialmente usadas para o diagnóstico de diversas doenças, como câncer de ovário, câncer no tecido pulmonar e carcinomas renais e também na área odontológica (Peres *et al.*, 2018; Nataraj *et al.*, 2015; McGregor *et al.*, 2019). Peres e colaboradores (2018) mostraram em seu estudo que apesar da avaliação clínica, a avaliação histológica é pertinente na avaliação de anormalidades radiográficas de tórax de etiologia desconhecida, e que técnicas de coloração imuno-histoquímica são necessárias para melhor classificar e gerenciar doenças malignas pulmonares,

Considerando entre as estruturas do granuloma o colágeno, que confere morfologia marcante, destacando a área afetada pela presença do parasita, preconizou-se que a ação de princípios histoquímicos que evidenciam o colágeno poderia contribuir para a visualização da área do granuloma, favorecendo o delineamento e conseqüente mensuração da mesma. Sendo assim, a coloração dos cortes histológicos com o Tricrômico de Gomori, onde o colágeno assume uma tonalidade verde claro (TOLOSA, *et al.*, 2003), contribui para eficiência na identificação dos granulomas e mensuração de suas áreas. Este corante também foi utilizado por Amaral *et al.* (2017) em cortes histológicos de fígado e intestino de ratos Swiss infectados com cercarias de *S. mansoni*. Para analisar os granulomas decorrentes do processo inflamatório. Igualmente, Sales *et al.* (2017) utilizaram o Tricrômico de Gomori para evidenciar alterações teciduais em fígado e baço de peixes da subclasse dos Teleósteos. Assim como também fizeram Leite, *et al.* (2020) na avaliação de lesões cutâneas. Ampliando a busca por recursos histológicos para destacar os elementos do granuloma hepático, também os cortes histológicos neste experimento foram corados com Picrosirius, pois este corante destaca as fibras colágeno. Conforme estudo de Chapadeiro & Pitanga (1997) a coloração com Picrosirius red contribuiu para as avaliações histológicas de material hepático com fibrose esquistossomótica, também Araújo, *et al.* (2021), utilizaram este corante para destacar as alterações histológicas em fígados lesados. A coloração de cortes histológicos com a Hematoxilina/ Eosina é utilizado rotineiramente nas investigações teciduais para fins diagnósticos, como também na pesquisa, com o objetivo de avaliar a ação de inúmeros fatores no organismo. Serafini, (2017) enfatizam que muitas técnicas de imunohistoquímica e

histoquímica podem ser dispendiosas e não terem os insumos disponíveis corriqueiramente, possibilitando que estas técnicas não estejam acessíveis para muitos centros de diagnóstico. Entretanto estes autores consideram a utilização de HE ser viabilizada em várias situações, por ser amplamente empregada e apresentar relativa facilidade na obtenção dos insumos para o seu preparo.

Neste estudo buscou avaliar a ação dos três corantes mencionados sobre os procedimentos de identificar granulomas hepáticos de animais infectados com *Shistosoma mansoni*, bem como na acuidade métrica durante a mensuração das áreas dos mesmos. Foi verificado que as médias das áreas dos granulomas em cada coloração (HE, GOM e PICRO) não foram significativas entre elas pelo teste T de Student (Tabela 2) (Figura 13). Contudo constatou-se que houve significativa correlação das áreas entre os cortes corados com PICRO e HE (Figura 14B), podendo inclusive ser formulada uma equação de ajuste na utilização de um corante em função do outro, que é uma equação de primeiro grau do tipo $\hat{y} = a + bx$. Entretanto não foi observado correlação significativa entre as áreas determinadas tanto por GOM e HE como por PICRO e GOM. Com base nos resultados da análise dos granulomas em função do corante, consideramos que o alto coeficiente de variação nas análises das áreas não possibilitou que fosse identificado diferença na mensuração destas, sendo necessário aumentar o número de amostras na tentativa de permitir investigar melhor o efeito dos corantes. Mas este estudo revelou que a mensuração das áreas dos granulomas em cortes corados com GOM teve comportamento diferenciado dos demais corantes, pois não houve correlação significativa entre os valores das áreas verificados na análise entre GOM e HE e nem entre GOM e PICRO (Figura 14A e 14C). Interpretando os resultados na análise dos valores das áreas e na correlação destes valores entre si, em função do corante, postulamos que o aumento na quantidade de amostras poderia permitir uma análise mais profunda no efeito do corante GOM sobre a avaliação de granulomas hepáticos.

Este entendimento também encontra respaldo no fato que a análise do efeito dos corantes sobre a contagem do número de granulomas (Tabela 3, Figura 15), revelou que a média das contagens não teve diferenças significativas entre os corantes HE e GOM, podendo tanto um como outro ser usado na coloração histológica com o objetivo de quantificar granulomas hepáticos. Porém, o número de granulomas contados nestes corantes foi significativamente maior que os encontrados na coloração com PICRO. Este achado também foi verificado em outros estudos (CHAPADEIRO & PITANGA, 1997; ARAÚJO, et.al, 2021), reforçando que a coloração com PICRO apresenta menor capacidade de evidenciar alterações histológicas hepáticas quando comparado com HE e GOM. Entretanto, ele poderia ser empregado,

mediante a correção dos valores através de uma equação de ajuste, uma vez que foi constatado uma correlação significativa dos valores entre GOM e PICRO (Figura 15C) e também entre HE e PICRO (Figura 15B). Assim, os valores encontrados por PICRO poderiam ser corrigidos por equações de ajuste de primeiro grau para os valores que seriam esperados para GOM e HE.

O estudo de novos compostos para o tratamento da esquistossomose apresenta uma grande importância na área de pesquisa, visto que a esquistossomose é uma doença grave, gera comorbidades importantes e o praziquantel é única forma de tratamento (Vale *et al.*, 2017, Olliaro *et al.*, 2020). Nos dias de hoje o aparecimento de cepas resistentes ao PZQ e a incapacidade de a terapia existente agir em formas mais jovens do parasito fazem com que a doença ainda seja uma importante ameaça a população, principalmente em regiões endêmicas e com condições socioeconômica da população mais precárias (Chienwichai *et al.*, 2020; Mendonça *et al.*, 2016). Nesse ponto, produtos naturais podem se apresentar como uma alternativa para o estudo de novas moléculas esquistossomicidas (Duguet *et al.*, 2017).

Entre os compostos naturais, os flavonoides vem obtendo grande relevância na pesquisa de novas moléculas esquistomicidas, em um estudo anteriores, Torres *et al.*, 2021, obteve resultados promissores utilizando auronas sintéticas, seus ensaios revelaram que as auronas LS26 e LS29 apresentaram atividades *in vitro* e *in vivo* para *S. mansoni*, promovendo danos no tegumento, redução da atividade motora e morte em 100% dos vermes, nas doses de 100 μ M e 50 μ M, em outro estudo utilizando uma proteína vegetal retirada da batata, a apyrase, Gusmão e colaboradores conseguiram uma redução de 35% nas áreas dos granulomas esquistossomóticos. Esses indicadores fazem com que os dados presentes no estudo se tornem relevante. Nossos resultados mostram que para as áreas dos granulomas, LS261002DA e LS291002DA apresentaram médias de áreas menores e significativamente diferentes de PZQ, mostramos também que em relação ao número de granulomas, animais tratados com o composto LS261002DA mostraram menor número de granulomas que animais tratados com LS2650DU, ou seja, o tratamento com as auronas sintéticas teve influência na área do granuloma e no número de granulomas, mostrando que esses compostos tem influência na principal característica histopatológica da doença, o granuloma.

Em mais uma de nossas abordagens o estudo analisou a influência das auronas sintéticas na dinâmica das CGM, essas células comumente ocorrem pela fusão de macrófagos maduros e atuam na resolução da patogenia, essas células são encontradas em diferentes tipos de tecido e diferentes tipos de doenças (Brooks *et al.*, 2019). Porém a escassez de estudos desse tipo de célula ainda é grande, sendo necessário pesquisas futuras para sua melhor compreensão. No

presente estudo demonstramos que os compostos não obtiveram diferenças significativas na contagem de células gigantes multinucleadas, porém na relação CGN/GRAN os compostos obtiveram influência, sendo o composto LS26100 no esquema de duas doses o que obteve mais êxito em aumentar essa relação, a qual foi significativamente diferente do tratamento LS29100DU. Em um estudo análogo, usando a proteína apyrase retirada da batata, proteína que também é encontrada na superfície de vermes adultos, a qual tem a função de modular as respostas imunológicas do hospedeiro diminuindo a sinalização purinérgica do sistema imune, demonstrou que a imunização previa com essa proteína aumentou a contagem de células CGM. Portanto os dados encontrados no presente estudo corroboram que compostos naturais podem ser uma ótima alternativa para o tratamento da esquistossomose. Em uma última análise encontramos que o tratamento teve influência na contagem de células pigmentadas, sendo que o grupo LS26100DU e controle apresentaram a maior contagem e significativamente diferente dos grupos LS26502D, LS2650DU, LS291002D, LS29502D e LS261002D. essas células pigmentadas são macrófagos ricos em pigmentos esquistossômicos e estudos relacionados a esse tipo de célula são escassos na literatura. Portanto os dados presentes no estudo corroboram com estado da arte onde se demonstra que novos compostos podem ser estudados e usados como agentes esquistomicidas.

6. CONCLUSÃO

As doenças parasitárias negligenciadas ainda assolam grande parte da população, principalmente em países em desenvolvimento, em lugares de onde se encontram desigualdades sociais e pouco acesso a serviços de saneamento básico. A esquistossomose, principalmente em áreas endêmicas, necessita de muita atenção das entidades de saúde, por ser uma doença grave, que geram comorbidades capazes de colocar em risco a saúde do hospedeiro. São necessários maiores investimentos em saneamento básico para populações mais expostas assim como maiores investimentos em pesquisas para novos tratamentos e otimização das metodologias de análises e diagnósticos da doença. Como demonstrado no presente estudo, os métodos de análises ainda podem ser mais profundamente estudados e melhorados, buscando uma maior normatização dos métodos e melhorando a acurácia das análises. Demonstramos também que novos métodos de tratamentos são viáveis e que as auronas sintéticas podem ser uma das alternativas de novos tratamentos para a esquistossomose.

REFERÊNCIAS

- AMARAL, K.B; SILVA, T.P; DIAS, F.F ; MARTRAL, K.K; ROSAF, M ; COSTANETO, S.F; GENTILE, MELO, R.C.N . Histological assessment of granulomas in natural and experimental *Schistosoma mansoni* infections using whole slide imaging. **PLOS ONE**, v.9, p.12, 2017.
- ARAÚJO, C; NUNES, V.S; SANTOS, G; FREITAS, L.A.R; SHINONI, M.I; PRANA, R. Histopathological, clinical and epidemiological features of hepatoportal sclerosis in a referral center for liver disease in Northeastern Brazil. **Arquivos de gastroenterologia**, v.58, p. a 2803, 2020.
- ARNAUD, V.; LI, J.; WANG, Y. *et al.* Regulatory Role of Interleukin–10 and Interferon - in Severe Hepatic Central and Peripheral Fibrosis in Humans Infected with *Schistosoma japonicum*. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 198, p. 418 –26, 2008.
- ATABA, E.; KATAWA, G.; RITTEM, M. *et al.* Ethnobotanical survey, anthelmintic effects and cytotoxicity of plants used for treatment of helminthiasis in the Central and Kara regions of Togo. **BMC Complementary Medicine and Therapies**, v. 20, p. 313, 2020.
- AUGUSTO, R.C.; DURVAL, D.; GRUNAL, C. Effects of the Environment on Developmental Plasticity and Infection Success of *Schistosoma* Parasites – An Epigenetic Perspective. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, p. 1475, 2020.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Vigilância da esquistossomose mansoni: diretrizes técnicas** – 4ª Edição. Brasília, 2014. Disponível em: <<http://bvsms.gov.br/publicações/vigilância>> Acesso em: 15 de abril de 2020.
- BRITO, M.I.B.S.; SILVA, M.B.A.; QUININO, L.R.M. Situação epidemiológica e controle da esquistossomose em Pernambuco: estudo descritivo, 2010-2016. **Epidemiologia e Serviço de Saúde**, v. 29, p. 2, 2020.
- BROOKS, P.J.; GLOGAUER, M.; MECULLOCH, C.A. An Overview of the Derivation and Function of Multinucleated Giant Cells and Their Role in Pathologic Processes. **The American Journal of Pathology**, v. 189, p. 2-6, 2019.
- CARVALHO, O.S.; COELHO, P.M.L.; LENZI, H.L. **Schistosoma mansoni e Esquistossomose**. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2008.
- CHAPADEIRO, E; PITANGA, L.C.S. Sobre a reversão da fibrose hepática esquistossomótica após terapêutica específica. Estudo histológico. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.30.p. 53-56, 1997.
- CHIENWICHAI, P; AMPAWONG, SADISAKWATTANA, P; THIANGTRONGIIT, T; LIMPANONT, Y; PHOL, P; CHUSONGSANG, Y; REAMTONG, O. Effect of Praziquantel on *Schistosoma mekongi* Proteome and Phosphoproteome. **Pathogens**. V.417, p.9, 2020.

- COLLEY, D.G.; SECOR, W.E. Immunology of human schistosomiasis. **Parasite Immunology**, v. 36, p. 347–57, 2014.
- COSNTAIN, A.H.; MACDONALD, A.S.; SMITS, H. Schistosome Egg Migration: Mechanisms, Pathogenesis and Host Immune Responses. **Frontiers in Immunology**, v. 9, p.3018 ,2018.
- DA DARA, A.; BHARDUAI, R.; YASSER, B.M.A.; SKELLER, P.J. Schistosome tegumental ecto-apyrase (SmATPDase1) degrades exogenous pro-inflammatory and pro-thrombotic nucleotides. **PEERJ**, v. 10, p. 316, 2014.
- DUGUET, T.B.; GLEBOV, A.; HUSSAIN, A. *et al.* Identification of annotated bioactive molecules that motility of the blood flux *Schistosoma mansoni*. **Intrenatinal journal for Parasitology: Drug and resistance**, v. 13, p. 73-88, 2020.
- EMIDIO, N.B.; GUSMÃO, M.A.N.; BORGES, W.C. *et al.* Identification of a linear IgE inducing epitope on the SmATPDase1 surface. **Acta Biochim Biophys Sin**, v. 49, p. 564–6, 2017.
- FARAH, I.O.; NYNDO, M.; KING, C.L.; HAU J. Hepatic Granulomatous Response to *Schistosoma mansoni* eggs in BALB/c Mice and Olive Baboons (*Papio cynocephalus anubis*). **Journal of Comparative Pathology.**, v. 123, p. 7–14, 2000.
- FARIA-PINTO, P.; MONTESANO, M.A.; JACINTO, A.A. *et al.* Antibody reactivity against potato apyrase, a protein that shares epitopes with *Schistosoma mansoni* ATP diphosphohydrolase isoforms, in acute and chronically infected mice, after chemotherapy and reinfection. **Memorias Instituto Oswaldo Cruz**, v. 105, p. 374-9, 2010.
- FREITA, D.A. **Investigação de Normalização de Corantes para Classificação de Imagens da Cavidade Oral**. P.15-18.Trabalho de conclusão de curso. Faculdade de Ciências da Computação da Universidade Federal de Uberlândia Minas Gerais, 2021.
- GUSMÃO, M.A.N. **Caracterização imunológica da apirase de batata e indução de anticorpos IgE por epítomos compartilhados entre as SmATPDases de *Schistosoma mansoni* e a apirase de *Solanum tuberosum***. p .39-41. Dissertação (Imunologia e Doenças Infeciosas e Parasitárias) – Programa de pos graduação em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Juiz de Fora, 2017.
- GUSMAO, M.A.N; JUNIOR, S.M; MARCONATO, D.G; EMIDIO, N.B; FARNI, P.S.G; GOLLNER, A.M; ARAUJO, N; COELHO, P.M.Z; MACEDO, G.C; DA SILVA FILHO, A.A; VASCONCELOS, E.G; DE FARIA PINTO, P. Potato apyrase reduces granulomatous area increases presence of multinucleates giant cells in murine shitossomiasis. **Parasitology International**, v . 83, p. a 102317, 2021.
- GRIMAUD, J.A. Myofibroblastes et cellules collaboratrices: les cellules clés des interactions cellule-matrice conjonctive dans l'évolution du granulome hépatique de la bilharziose à *Schistosoma mansoni*. **Arch Anat Cytol Path**, v. 34,p . 30-31.

LEITE, A.G.B.; ESTEVAO, L.R.M ; SILVA, C.J.F.L; LIMA, J.L.S; BULHÕES A.A.V.C; SOARES, E.B.A; EVEVNCIO NETO, J. Avaliação morfo-histológica e morfo-histométrica de feridas cutâneas tratadas com *Sphagneticola trilobata* (L.) Pruski em ratos . **Arquivo Brasileiro de medicina veterinária e zootecnia**, v.72, p.2211-2222, 2020.

LENZI, H.L.; KIMMEL, E.; SCHECHTMAN, H. *et al.* Histoarchitecture of *Schistosoma* Granuloma Development and Involution: Morphogenetic and Biomechanical Approaches. **Memorias Instituto Oswaldo Cruz**, v. 93, p. 141-51, 1998.

LENZI, H.L, W DE ROMANHA, R.M; ZORZENON, R.M; ROSAS, A; MOTA, E.M; MANSO P.P.A; CAPUTO, L.F.G; PALAJO-MACHADO, M. Four whole-istic aspects of schistosome granuloma biology: fractal arrangement, internal regulation, autopoietic component and closure. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro**, V. 101,p. 219-231, 2006.

LIU, C.; ZHANG, Y.; CHEN, F. *et al.* Immunopathology in schistosomiasis is regulated by TLR2,4- and IFN- γ -activated MSC through modulating Th1/Th2 responses. **Stem Cell Research & Therapy**, v. 11, p. 217, 2020.

MACGREGOR, B.A.; MACKAY, R.R.; BRAUN, D.A. *et al.* Results of a Multicenter Phase II Study of Atezolizumab and Bevacizumab for Patients with Metastatic Renal Cell Carcinoma with Variant Histology and/or Sarcomatoid Features. **Journal of Clinical oncology**, v. 38, p.63-70 ,2019.

MACHADO, H.; NEGAM, T.J.; PETERS, V.M. *et al.* Flavonóides e seu potencial terapêutico. **Boletim do Centro de Biologia da Reprodução**, v. 27, p. 33-9, 2008.

MENDONÇA, A.M.B.; FEITOSA, A.P.S.; VERAS, D.L. *et al.* The susceptibility of recent isolates of *Schistosoma mansoni* to praziquantel. **Revista Instituto de Medicina Tropical**, v. 58, p. 7, 2016.

NATARJ, R. TY; FALDELAND, D.A; COCKCROFT, D.W. The Necessity of Histology. **Respiratory Care**, V. 60, 2015

NEVES, D.P.; MELO, A.L.; VITOR, R.W.A. **Parasitologia humana**. -EDIÇÃO. São Paulo, SP: Editora Atheneu, 2011.

PEREIRA, M; PETRETO, E; GORDOM, S; BASSETT J.H. D; WILLIAMS, G.R; BEHMOARAS, J.Common signalling pathways in macrophage and osteoclast multinucleation. **Journal of Cell Science**, v.10, p.131, 2018.

PERES, L.C.; CUSHING-HAUGEN, K.L.; ANGLÉSIO, M. *et al.* Histotype classification of ovarian carcinoma: A comparison of approaches. **Journal Gynecology Oncology**, v. 151, p. 53-60, 2018.

PIERROL.OLLIARIO, JEANT.COULIBARY, AMADOU GARBA, CHRISTINE HALLEUX, JANIFER KAISER, CHARLES K. KING, FRANCISCA MUTAPI. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, 2020.

RANG, H.P, RITTER J.M, FLOWER R.J, HANDERSSON G, Farmacologia. Rio de Janeiro: Elsevier, 2016.

RASO,P; TOPPS, N.H; OLIVEIRA, D.M; LEMOS,P. Tipos de Colágeno na Fibrose de Symmers. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.16,p.202-205, 1983

ROCHA, T.J.M; LIMA, M.A.C.A; SILVA, A.L; OLIVEIRA, J.F; GOUVEIA, A.L.A; SILVA, B.R; JUNIOR, A.S.A.A.Synthesis and biological evaluation of novel imidazolidine derivatives as candidates to schistosomicidal agents. **Revista Instituto de Medicina Tropical São Paulo**, v.8, p.59, 2017.

SALES, C. F; SILVA R. F; AMARAL, M. G. C; DOMINGOS, F. F. T; RIBEIRO, R. I. M. A; THOME, R. G; SANTOS, H. B. Comparative histology in the liver and spleen of three species of freshwater teleost. **Neotropical Ichthyology**, v.15,p. e160041, 2017

SANTOS D.S; RODRIGUES M.M.F. Atividades farmacológicas dos flavonoides: um estudo de revisão. **Estação Científica (UNIFAP)**, v.7, p.29-35, 2017.

SERAFINI,S.**Utilização da Biopsia de Mucosa e Submucosa retal para diagnostico da Moléstia de Hieschsoprun**. 2017. (MestradoPediatria)-Universidade de São Paulo.

SCWAARTZ C, FALLON P.G. *Schistosoma* “Eggs-Iting” the Host: Granuloma Formation and Egg Excretion. **Frontier in Immunology**,v.9, 2018

TOLOSA,E.M.C; DE RODRIGUES, C,J; BEHMER, O.A, FREITAS NETO, A.G. **Biblioteca Digital de Produção Intelectual da Universidade de São Paulo**, Manual de técnicas para histologia: normal e patológica.p.2012-2022. 2003.

TORRES, D.S. **Avaliação do Potencial de Auronas na terapia de esquistossomose in vitro e em modelo murino.2018**. (Dissertação de Mestrado em Imunologia e doenças Infeciosas e Parasitarias)- Universidade Federal de Juiz de Fora.

TORRES, D.S; OLIVEIRA, B.A; SILVEIRA, S.A.D.S; SILVA,M.P; PEREIRA,V.R.D; MRAEIS, J; COURI,M.R.C; QUEIROZ,R.F.G; *et al*. Synthetic Aurones: New Features for *Schistosoma mansoni* Therapy. **Chemistry & biodiversity**, v. 18, n. 11, p. e2100439, 2021.

VALE, AN.; GUYEIA, M.J.; RINALD, G. *et al*. Praziquantel for Schistosomiasis: Single Drug Metabolism Revisited, Mode of Action, and Resistance. **Agents and Chemotherapy**, v. 61, p-5. 2017.

VARJEE, M.A. Schistosomiasis: Still a Cause of Significant Morbidity and Mortality. **Research and Reports in Tropical Medicine**,v.10, 2020.

KANDEM, S.D; MOYOU -SOMO R; BROMBCHER F; NONO J.K. HOST REGULATORY OF LIVER FRIBROSIS DURING HUMAN SHISTOSSOMAISES. **Frontiers in immunology**, v,9, p.2781, 2018.

KAPUNGO, N.N; LI, X; NHACHI, C; MASIMIREMBUA, C; THELINGWANI, R.S. In vitro and in vivo human metabolism and pharmacokinetics of S- and R-praziquantel. **Pharmacology Research Perspective**, 2020.

KATZ N. Inquérito Nacional da Esquistossomose Mansonica e Geomintoses. Belo Horizonte: **Instituto René Rachou Fundação Oswaldo Cruz**, 2018.

WATANABE, R; HOSGUR, E; ZHANG, H; WEN, Z; BERRRY, G; GORONZI, J; WEYAND, C.M. Pro-inflammatory and Anti-inflammatory T cells in Giant Cell Arteritis. **Joint Bone Spine**, v. 84, p. 421–426, 2017.

ZHANG W, LI L, AHAMED G, MALEHIN AJ, SIDDIQUI AJ, TORBEM W, KARMAKAR S. Fifteen years of Sm-p80-based vacina trials in nonhuman primates: Antibodies from vaccinated baboons confer protection in vivi and in vitro from shistossoma mansoni and identification of pautative correlltion markes of protection. **Forntiers in Immunology**, v.11, p.1246, 2020.