

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

**DANÚBIA PINHEIRO TEIXEIRA**

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DE FÁRMACO ANTI-HIPERTENSIVO NAS  
ALTERAÇÕES HEPÁTICAS ASSOCIADAS À ESQUISTOSSOMOSE MURINA**

Alfenas/MG  
2019

**DANÚBIA PINHEIRO TEIXEIRA**

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DE FÁRMACO ANTI-HIPERTENSIVO NAS  
ALTERAÇÕES HEPÁTICAS ASSOCIADAS À ESQUISTOSSOMOSE MURINA**

Dissertação/tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre pela Universidade Federal de Alfenas.

Área de Concentração: Interação Patógeno-Hospedeiro

Orientador: Profa. Dra. Raquel Lopes Martins Souza

Coorientadora: Profa. Dra. Aline De Castro Pereira

Alfenas/MG  
2019

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas

Biblioteca Central – Campus Sede

Teixeira, Danúbia Pinheiro.

T266a Avaliação dos efeitos de fármaco anti-hipertensivo nas alterações hepáticas associadas à esquistossomose murina / Danúbia Pinheiro Teixeira. – Alfenas/MG, 2019.

69 f. : il. –

Orientadora: Raquel Lopes Martins Souza.

Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal de Alfenas, 2019.



DANÚBIA PINHEIRO TEIXEIRA

“AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DE FÁRMACO ANTI-HIPERTENSIVO NAS ALTERAÇÕES  
HEPÁTICAS ASSOCIADAS À ESQUISTOSSOMOSE MURINA”

A Banca Examinadora, abaixo assinada, aprova a  
Dissertação apresentada como parte dos requisitos para  
a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas  
pela Universidade Federal de Alfenas.

Área de concentração: Interação Patógeno-Hospedeiro

Aprovado em: 12 de agosto de 2019.

Profª. Dra. Raquel Lopes Martins Sousa  
Instituição: UNIFAL-MG

Assinatura:

Profª. Dra. Thais Viana Fialho Martins  
Instituição: UNIFENAS

Assinatura:

Profª. Dra. Alessandra Esteves  
Instituição: UNIFAL-MG

Assinatura:

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus por tudo, e pelo prazer de conhecer todas as pessoas, que de alguma forma se envolveram no projeto, e que aqui algumas serão citadas.

Aos meus pais, José Campos e Maria Célia, pelo apoio, e principalmente pelo amor e confiança em mim depositada.

Aos meus irmãos e amigos, pela paciência e compreensão, em especial minha irmã Débora, a qual presenciou todos meus choros e risadas.

A uma pessoa que hoje já não se é tão presente em minha vida, mas presente eternamente em meu coração, Leandro Leoni Brescia, o qual me incentivou incondicionalmente nos meus primeiros passos como biomédica, sem seu estímulo e carinho, eu não teria minhas melhores conquistas.

A professora Raquel Martins Lopes Souza, minha orientadora que mesmo em fase de cuidados com sua saúde, foi extremamente dedicada, acreditando sempre no meu potencial para desenvolver essa pesquisa. Grata por me orientar de forma sábia, tranquila e principalmente por compreender minhas restrições.

A minha coorientadora Aline, pela atenção e compreensão durante a ausência da Raquel. E por toda participação e auxílios nos experimentos.

Ao professor Marcos José Marques, obrigada me acompanhar na ausência da professora Raquel, por toda atenção e por me ensinar o que é pesquisa.

Ao professor Romulo Novaes e a professora Alessandra Esteves, que sempre estiveram dispostos a me ajudar, obrigada pela educação, respeito e preocupação.

A minha parceira Iana Crabbis, formamos uma dupla perfeita, obrigada por me salvar diversas vezes! Por me substituir sempre que necessário.

A todos os colaboradores do departamento patologia e parasitologia, pelo acolhimento e pelas orientações.

Meus amigos do Programa de Pós Graduação e Ciências Biológicas, pelas risadas, pelos cafezinhos compartilhados e pelas cervejinhas. Sentirei saudades.

Ao Programa de Pós Graduação e Ciências Biológicas, pela oportunidade de participar e o prazer de fazer parte deste. Grata pelos incentivos e toda atenção.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – BRASIL (CAPES) – Código de Financiamento 001.

## RESUMO

A esquistossomose é uma enfermidade sistêmica, causada pelo trematódeo *Schistosoma* sp. e sua forma avançada é morfológicamente representada por presença de fibrose hepática periportal. O tratamento da esquistossomose é limitado cujo fármaco de escolha é o Praziquantel (PZQ). O objetivo do trabalho foi avaliar, no contexto *in vivo*, o efeito do anti-hipertensivo, hidralazina (HDZ), isolado ou associado ao PZQ, no desenvolvimento da infecção murina por *Schistosoma mansoni*. A partir desta avaliação, buscou-se identificar os efeitos no tecido hepático, na formação, evolução e desenvolvimento microestrutural dos granulomas e na formação de fibrose, além de alterações vasculares. Paralelamente também foi avaliada a formação de granulomas em outros órgãos, tais como baço e pulmão. O número total de granulomas mostrou que o grupo controle de infecção SM e o grupo infectado e tratado com HDZ, apresentou significativamente um número maior quando comparados aos grupos que receberam o tratamento com praziquantel ( $p < 0,001$ ). Houve também uma predominância de granulomas exsudativos produtivos em todos os animais infectados independentemente do tratamento. Todavia, houve um maior número de granulomas organizados nos animais infectados que receberam a HDZ quando comparado aos demais grupos ( $p < 0,05$ ). Os resultados referentes à densidade das fibras de colágeno, à área, volume e diâmetro médio dos granulomas, evidenciaram um processo de imunomodulação na evolução dos granulomas, dos animais infectados que receberam a HDZ, pois apresentaram um maior percentual de colágeno ( $p < 0,001$ ) comparado aos demais grupos. Adicionalmente, foi observado um maior valor do número total de vasos no tecido hepático dos animais infectados tratados com HDZ em relação a outros grupos. De um modo que a HDZ não interferiu na ação esquistossomicida do PZQ e nem na imigração de ovos para outros órgãos como baço e pulmão. A HDZ parece desempenhar um papel significativo no processo de cicatrização por induzir uma maior formação de colágeno nos granulomas esquistossomótico em fase aguda. Faz-se necessário a realização de mais estudos sobre a indução da HDZ na formação de colágeno, não somente na fase aguda, mas também na crônica.

Palavras-chave: *Schistosoma mansoni*. Hidralazina. Granuloma

## ABSTRACT

Schistosomiasis is a systemic disease, caused by the *Schistosoma* sp. *Trematode* and its advanced form is morphologically represented by the presence of periportal liver fibrosis. Treatment of schistosomiasis is limited and Praziquantel (PZQ) is the drug used in this process. The objective of the study was to evaluate, *in vivo*, the effect of an antihypertensive, hydrazine (HDZ), isolated or associated with PZQ, on the development of murine infection by *Schistosoma mansoni*, evaluating the effects on hepatic tissue in the formation, evolution and development microstructure of granulomas; Formation of fibrosis in addition to vascular alterations. In parallel, the formation of granulomas in other organs, such as spleen and lung, was also evaluated. The total number of granulomas showed that the SM infection control group and the HDZ treated and infected group had a significantly higher number when compared to those receiving praziquantel treatment ( $p < 0.001$ ). There was also a predominance of productive exudative granulomas in all infected animals regardless of treatment. However, there was a greater number of organized granulomas in the infected animals that received HDZ when compared to the other groups ( $p < 0.05$ ). The results related to the density of collagen fibers, the area, volume and mean diameter of the granulomas showed an immunomodulation process in the evolution of the granulomas of the infected animals that received the HDZ, since they presented a higher percentage of collagen ( $p < 0.001$ ) compared to the other groups. In addition, a greater value of the total number of vessels in the hepatic tissue of the infected animals treated with HDZ was observed in relation to other groups. In a way that HDZ did not interfere in the schistosomicidal action of PZQ nor in the migration of eggs to other organs such as spleen and lung. HDZ appears to play a significant role in the healing process by inducing increased collagen formation in acute schistosomal granulomas. It is necessary to develop further studies about the induction of HDZ in the formation of collagen, not only in the acute phase, but also in the chronic one.

Key words: *Schistosoma mansoni*. Hydralazine. Granuloma.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Mapa da distribuição da esquistossomose no Brasil.....	16
Figura 2 - Ciclo biológico do parasito <i>S. mansoni</i> .....	18
Figura 3 - Esquema do sistema porta.....	19
Figura 4 - Estrutura química da HDZ.....	29
Figura 5 - Segmentação de cores computacional e quantificação de colágeno.....	38
Figura 6 - Quantidade de granulomas.....	39
Figura 7 - Granuloma exsudativo produtivo.....	40
Figura 8 - Granuloma organizado.....	41
Figura 9 - Contagem geral de granulomas.....	42
Figura 10- Coloração das fibras de colágeno .....	43
Figura 11- Distribuição das fibras de colágeno .....	45
Figura 12- Porcentagem (%) da área ocupada pelo colágeno nos grupos SM e SM+PZQ.....	46
Figura 13- Porcentagem (%) da área ocupada pelo colágeno nos grupos SM+HDZ e SM+HDZ+PZQ.....	47
Figura 14- Área de distribuição em % de fibras de colágeno .....	48
Figura 15- Medida da área dos granulomas.....	49
Figura 16- Valor do volume dos granulomas.....	50
Figura 17- Medida do diâmetro médio dos granulomas.....	51
Figura 18- Estruturas de sistema circulatório: artéria (A), veias (V) e vênulas (Ve) .....	52
Figura 19- Quantidade de vasos arteriais e venosos no tecido hepático....	53
Figura 20- Granuloma organizado periovular no baço.....	54
Figura 21- Granulomas exsudativo produtivo periovular no pulmão.....	55

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Número de animais com presença de granulomas periovular em baço e pulmão.....	56
---	----

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	–	Análise de Variância
Ca <sup>2+</sup>	–	Cálcio
CEUA	–	Comissão de Ética no Uso de Animais
EP	–	xsudativa-produtiva
FIOCRUZ	–	Fundação Oswaldo Cruz
HDZ	–	Hidralazina
HE	–	Hematoxilina e Eosina
HI	–	Hepato-intestinal
HS	–	Hepato-esplênica
HSCs	–	Células estreladas hepáticas
LE	–	Cepa de <i>Schistosoma mansoni</i> linhagem susceptível ao PZQ, isolada do paciente Luis Evangelista, mantida no Centro de Pesquisa René Rachou/ FIOCRUZ
NE	–	Necrótico-exsudativo
NI	–	Grupo de animais controle não infectados
NI+HDZ	–	Grupo de animais não infectados e tratados com hidralazina
OMS	–	Organização Mundial de Saúde
P	–	Produtivo
PE	–	Exsudativa pré-granulomatosa
PZQ	–	Praziquantel
OPN	–	Otesoponte
SM	–	Grupo de animais infectados e não tratados
SM+HDZ	–	Grupo de animais infectados e tratados com hidralazina
SM+ PZQ	–	Grupo de animais Infectados e tratados com praziquantel
SM+HDZ+PZQ	–	Grupo de animais infectados e tratados com hidralazina mais praziquantel

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>12</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRAFICA .....</b>	<b>15</b>
2.1	EQUISTOSSOMOSE MANSÔNICA .....	15
2.1.1	Ciclo de vida do parasito e transmissão.....	17
2.1.2	Patogênese e Características Histológicas .....	18
2.1.3	O Granuloma Esquistossomótico.....	21
2.1.4	Hipertensão portal e angiogênese.....	23
2.1.5	Controle e tratamento da esquistossomose .....	25
2.2	ASSOCIAÇÃO DE FÁRMACOS.....	28
2.3	REPOSICIONAMENTO DE FÁRMACOS .....	28
2.4	UTILIZAÇÃO DA HIDRALAZINA NO DESENVOLVIMENTO DA ESQUISTOSSOMOSE MURINA.....	26
2.4.1	Contraindicação da hidralazina.....	30
2.4.2	Reações adversas .....	31
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>32</b>
3.1	OBJETIVO GERAL.....	32
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	32
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>33</b>
4.1	DELIAMENTO EXPERIMENTAL .....	33
4.2	ANIMAIS .....	33
4.3	O PARASITO E INFECÇÃO.....	34
4.4	ADMINISTRAÇÃO DE HIDRALAZINA E PRAZIQUANTEL.....	34
4.5	EUTANÁSIA E COLETA DE MATERIAL .....	34
4.6	ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA.....	35
4.6.1	Processamento das amostras .....	35
4.6.2	Obtenção de Imagens para análises microscópicas .....	35
4.6.3	Análise histopatológica.....	36
4.6.4	Análises morfométricas.....	36
4.6.4.1	Quantificação de granulomas; vasos arteriais e venosos no fígado.....	36
4.6.4.2	Determinação da área total, volume e diâmetro médio dos granulomas hepáticos.....	36
4.6.4.3	Análise de colágeno com microscopia de luz polarizada e quantificação computacional de colágeno .....	37

4.7	ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	38
<b>5</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>39</b>
5.1	EFEITO DA HIDRALAZINA SOBRE O NÚMERO TOTAL DE GRANULOMAS HEPÁTICOS.....	39
5.2	EFEITO DA HIDRALAZINA NA EVOLUÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DOS TIPOS DE GRANULOMAS HEPÁTICOS .....	40
5.3	DETERMINAÇÃO DA ÁREA DO GRANULOMA HEPÁTICO OCUPADA POR FIBRAS DE COLÁGENO .....	42
5.3.1	Quantificação da área ocupada pelo colágeno em porcentagem por meio do software Image-Pro Plus 4.5®.....	46
5.4	ANÁLISE MICROESTRUTURAL: ÁREA TOTAL DOS GRANULOMAS HEPÁTICOS.....	49
5.4.1	Análise microestrutural: Volume dos granulomas.....	50
5.4.2	Análise microestrutural: Diâmetro médio dos granulomas.....	51
5.5	DENSIDADE VASCULAR: vasos arteriais e venosos.....	52
5.6	GRANULOMAS EXTRA-HEPÁTICOS .....	54
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>58</b>
<b>7</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>65</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>66</b>

## 1 INTRODUÇÃO

As doenças parasitárias representam um grave problema de saúde pública em muitas partes do mundo, particularmente em muitos países em desenvolvimento, refletindo a situação econômica e social desses países. Neste contexto, as infecções por helmintos são consideradas prioridade na saúde pública em diversas partes do mundo. Entre as helmintoses, a esquistossomose continua sendo a de principal significância médica em grande parte do planeta e uma das infecções parasitárias mais prevalentes no mundo (BUGSSA, 2015).

Doença endêmica de importância mundial, a esquistossomose é considerada a segunda parasitose de maior impacto em termos sócio - econômicos e de saúde pública, perdendo somente para a malária. Afeta amplas áreas geográficas, com aproximadamente 230 milhões de pessoas infectadas e cerca de 200 mil apresentam risco de óbito pela doença a cada ano (COLLEY et al., 2014; RICHTER et al., 2015). Prevalente em áreas tropicais e subtropicais, especialmente em comunidades pobres, sem acesso a água potável e saneamento adequado (KING; DICKMAN; TISCH, 2005; WHO, 2014). No Brasil, a esquistossomose é causada pelo agente etiológico *Schistosoma mansoni*, um helminto trematódeo cujos hospedeiros intermediários são espécies de moluscos do gênero *Biomphalaria* (GUIMARÃES et al., 2012).

Do ponto de vista clínico, pode-se identificar na esquistossomose uma fase aguda e outra crônica. A fase aguda inicia-se pela penetração das cercarias na pele e abrange eventos como passagem dos esquistossômulos pelos pulmões, a localização dos vermes adultos em veias do sistema porta hepático e o início da postura dos ovos. A fase crônica representa as manifestações patológicas e clínicas decorrentes da localização dos ovos nos tecidos, da reação inflamatória específica em torno dos mesmos e da ação de antígenos, seja dos vermes adultos ou dos ovos nos tecidos, mais agravante quando complexados com os anticorpos do hospedeiro. (GRYSEELS, 2012).

Para tratamento da esquistossomose, a Organização Mundial da Saúde (OMS) recomenda o uso do medicamento praziquantel (PZQ), pois é um anti-helmíntico eficaz em dose única oral, apresentando reações adversas leves, como dor abdominal, diarreia, tonturas, sonolência e cefaleia e tem um custo relativamente baixo. O exato mecanismo de ação do PZQ ainda não foi estabelecido, embora

tenha sido sugerido que o PZQ atua como um antagonista dos canais iônicos de cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) que induzem o influxo de  $\text{Ca}^{2+}$ . Embora este fármaco seja eficaz, o aparecimento de cepas resistentes ao PZQ, bem como sua baixa efetividade contra vermes imaturos, tornam a pesquisa e o desenvolvimento de novos medicamentos extremamente necessários. O PZQ atua na eliminação de todos ou quase todos os vermes maduros, interrompendo a permanência da infecção, mas os ovos já postos por eles não são afetados pelo tratamento (CALIXTO et al., 2018).

As estratégias convencionais de pesquisa e desenvolvimento de novos medicamentos são consideradas de alto custo (estimadas em milhões de dólares), demoradas (entre 10 e 17 anos) e arriscadas. Os efeitos colaterais graves e a diminuição da eficácia em humanos que podem ocorrer durante os ensaios clínicos são fatores comuns que leva um composto não ser aprovado para comercialização. Além disso, as indústrias farmacêuticas têm pouco interesse em investir no desenvolvimento e produção de novos fármacos para o tratamento de Doenças Tropicais Negligenciadas (DTNs), pois oferecem um baixo retorno lucrativo (CALIXTO et al., 2018).

Para superar essas dificuldades, propõe-se o reposicionamento de medicamentos já aprovados, o que oferece uma excelente relação custo-benefício, diminuindo o tempo e os investimentos gasto no desenvolvimento de novos compostos. Essa estratégia consiste em identificar novas indicações terapêuticas para medicamentos já aprovados para o tratamento de outras doenças e / ou com alvos já estabelecidos (CALIXTO et al., 2018).

O aparecimento do fármaco curativo (PZQ), associado ao fato, de que os casos de esquistossomose ocorrem, em sua maioria em países subdesenvolvidos, e em uma população de baixo valor aquisitivo, justifica o desinteresse das indústrias farmacêuticas em não gerar novos investimentos para o desenvolvimento de outros novos fármacos com finalidade de combater essa parasitose e a patologia decorrente desta.

Então a estratégia do projeto é utilizar fármaco já existente, a hidralazina, para analisar seu efeito em lesões hepáticas na esquistossomose mansônica, associando-o com o tratamento específico da esquistossomose (PZQ).

A hidralazina é um fármaco vasodilatador utilizado na hipertensão arterial, pulmonar e insuficiência cardíaca congestiva. Sendo assim, justifica-se então o estudo do efeito da hidralazina no desenvolvimento da patologia da

esquistossomose e de sua associação com o PZQ, na tentativa de avaliar à interferência deste fármaco em uma possível diminuição das alterações hepáticas e vasculares ou em contra partida no aumento do fluxo de ovos do parasito nos vasos, sendo estes acumulados em outros tecidos. Considerando que a hidralazina, é um fármaco que até o momento não há relatos na literatura da sua utilização em pesquisas com *S. mansoni*, fizeram deste o medicamento de escolha para o desenvolvimento desse projeto.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRAFICA

Abaixo serão descritos os parâmetros sobre a esquistossomose e aspectos sobre a doença a serem abordados no presente estudo.

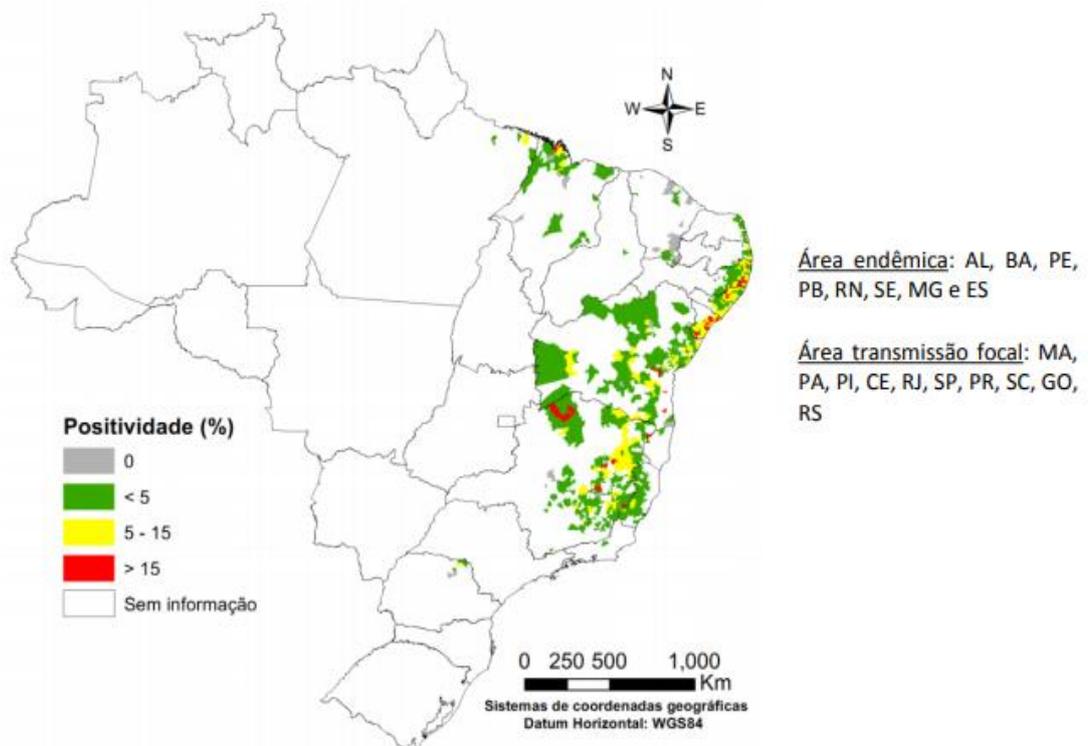
### 2.1 EQUISTOSSOMOSE MANSÔNICA

A esquistossomose é uma doença social, encontrada principalmente em regiões pobres, rurais e da periferia das cidades com desenvolvimento socioeconômico precário, onde os habitantes têm contato frequente com águas contaminadas, como também rede de esgoto adequada não disponível. A esquistossomose é causada por parasitos trematódeos pertencentes ao gênero *Schistosoma*. As principais espécies de *Schistosoma* que infectam o homem são (i) *S. mansoni*, transmitido por moluscos do gênero *Biomphalaria* e causador da esquistossomose intestinal e hepatoesplênica na África, península Arábica, Caribe e América do Sul; (ii) *S. haematobium*, transmitido por moluscos do gênero *Bulinus* que causa a esquistossomose urinária na África e na península Arábica; (iii) *S. japonicum*, transmitido por moluscos do gênero *Oncomelania* que causa esquistossomose intestinal e hepatoesplênica na China, Filipinas e Indonésia e (iv) *S. mekongi*, transmitido por moluscos do gênero *Neotricula* e causador da esquistossomose intestinal e hepatoesplênica no Camboja (GALINIER et al., 2017).

No Brasil, a esquistossomose é causada pelo *S. mansoni* e consiste em um grave problema de saúde pública, abrangendo 19 estados. Nas regiões sudeste e nordeste, existem áreas de alta prevalência, desde o Maranhão até o Espírito Santo e Minas Gerais, enquanto nas regiões norte e sul, existem apenas áreas de média transmissão e focos isolados (Figura 1). Estima-se que 4 a 6 milhões de pessoas são infectadas por *S. mansoni* no Brasil e que os estados de Minas Gerais e da Bahia concentram 70,0 % dos casos com base em dois inquéritos nacionais de esquistossomose realizados no Brasil (GRYSEELS, 2006).

Figura 1 - Mapa da distribuição da esquistossomose no Brasil.

Distribuição da esquistossomose na área endêmica, por faixa de positividade, por município. Brasil, 2009 – 2017.



Fonte: SISPCE/SVS/MS; Disponível em <http://portalmms.saude.gov.br/saude-de-a-z/esquistossomose>; acesso em março de 2019.

A patologia desta doença resulta do acúmulo dos ovos do parasito que ficam presos nos tecidos do hospedeiro, particularmente no fígado, baço e nos intestinos. Os vários aspectos patogênicos e patológicos encontrados na esquistossomose mansoni dependem da interação entre o parasito e o hospedeiro, durante as três fases evolutivas e migratórias do parasito no hospedeiro definitivo: esquistossômulos, verme adulto e ovos. Os ovos e a reação granulomatosa do hospedeiro constituem os principais fatores causadores de morbidade na esquistossomose. (GRYSEELS, 2012).

A infecção pode se desenvolver em forma aguda e evoluir para fase crônica, se não for interrompida por quimioterapia específica, praziquantel (PZQ). Na forma aguda, o indivíduo infectado apresenta sintomas inespecíficos como febre, tosse, diarreia, anorexia e artralgias (COLLEY et al., 2014). A forma aguda pode ser caracterizada patologicamente por presença de numerosos granulomas exsudativos, especialmente no fígado e por reações de hipersensibilidade do hospedeiro aos antígenos solúveis secretados pelos ovos (LAMBERTUCCI, 2010). Essa

hipersensibilidade tende a diminuir progressivamente com a evolução para a fase crônica da doença, ocasionando uma redução do tamanho dos granulomas em decorrência da modulação da resposta imune (DE MELO; COELHO, 2005).

A maioria dos indivíduos infectados por *S. mansoni* durante a fase crônica desenvolvem as formas leves da doença, muitas vezes sendo pacientes assintomáticos. Formas graves ou avançadas desenvolvem-se em cerca de aproximadamente de 4% a 10% dos casos. (ANDRADE, 2009).

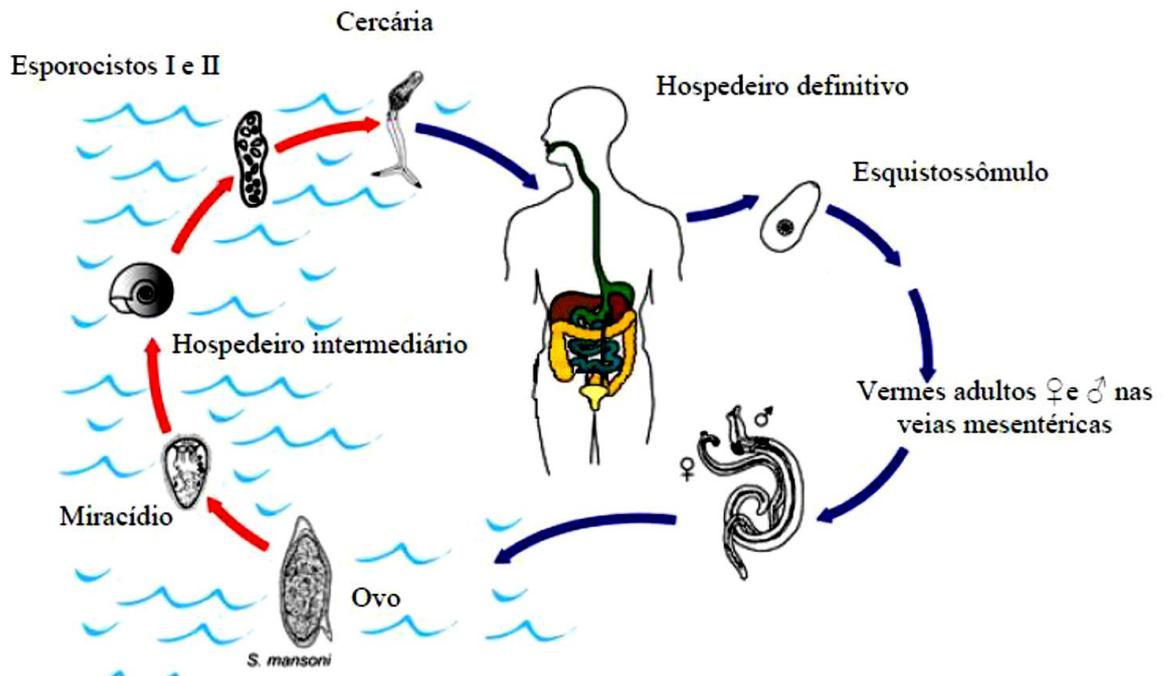
### **2.1.1 Ciclo de vida do parasito e transmissão**

O ciclo biológico de *S. mansoni* (figura 2), mostra alternância de estágios entre o hospedeiro intermediário (os moluscos), e os hospedeiros definitivos (vertebrados, entre eles o ser humano) (BRASIL, 2008).

Há, ainda, duas passagens de larvas de vida livre (miracídio e cercária) no meio aquático, que se alternam com as fases parasitárias. As etapas evolutivas consistem no verme adulto (macho e fêmea), ovo, miracídio, esporocisto, cercária e esquistossômulo. O ciclo evolutivo do parasito se completa em condições favoráveis em torno de 80 dias. No homem, o ciclo é sexuado e o período decorrido entre a penetração das cercárias e o encontro de ovos nas fezes é de 45 dias. No molusco do gênero *Biomphalaria*, o ciclo é assexuado, dura aproximadamente, 30 dias (COLLEY et al., 2014). A transmissão da doença ocorre com o contato do homem com águas contendo larvas do parasito, as cercárias. O ciclo de vida do parasito ocorre com a penetração das cercárias na pele do hospedeiro definitivo, onde se transformam em esquistossômulos que migram para os pulmões. Dos pulmões, os esquistossômulos migram para o sistema porta-hepático onde se transformam em vermes adultos. Após a maturação sexual o verme acasalado movimenta-se contra a corrente sanguínea e se aloja no plexo mesentérico, produzindo centenas de ovos por dia (NEVES et al., 2015). Parte dos mais de 300 ovos produzidos diariamente por cada fêmea fica retida na mucosa intestinal e nos capilares do sistema porta do hospedeiro, sendo estes os principais responsáveis pela patogenia da doença. Ocasionalmente os ovos podem se alojar em outros tecidos e causar doenças como a neuroesquistossomose (COLLEY et al., 2014). O restante dos ovos é eliminado com as fezes e em contato com a água eclodem liberando os miracídios. Estes infectam os caramujos do gênero *Biomphalaria*, nos quais, cada miracídio se

transforma em esporocisto I. Cada esporocisto I, por poliembrionia, origina 150 a 200 esporocistos II. Estes migram para a glândula digestiva (hepatopâncreas) e ovoteste do caramujo, dando origem a milhares de cercárias que serão liberadas na água (COLLEY et al., 2014).

Figura 2 - Ciclo biológico do parasito *S. mansoni*.



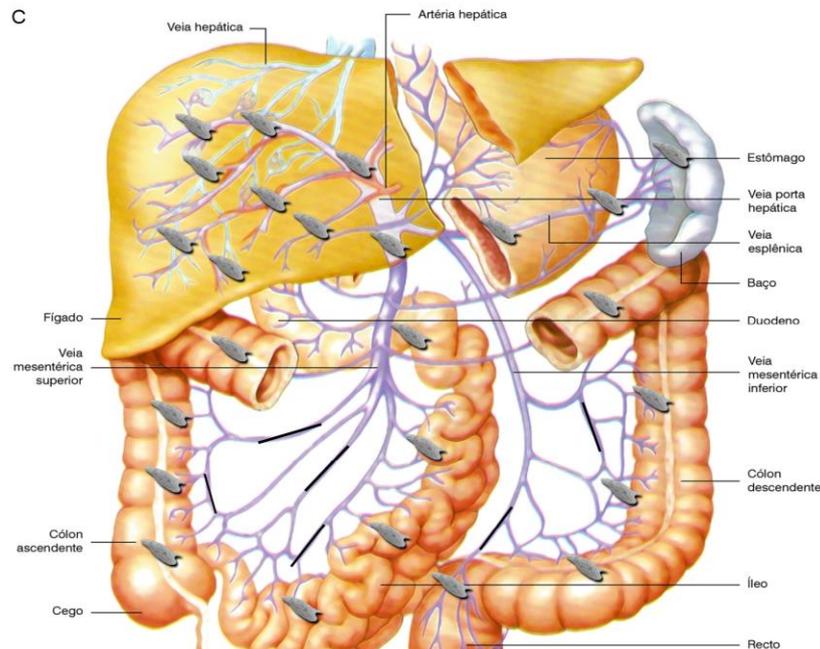
Fonte: Disponível em <http://www.ufjf.br/labproteinas/material-deapoio/esquistossomose/ciclo-biologico/> (acesso em outubro de 2017).

Notas: As setas em vermelho representam o desenvolvimento das formas evolutivas do *S. mansoni* no hospedeiro intermediário bem como as formas de vida livre. As setas em azul representam o desenvolvimento das formas evolutivas no hospedeiro definitivo.

### 2.1.2 Patogênese e Características Histológicas

A esquistossomose é uma doença sistêmica, pois, parte dos ovos do *S. mansoni*, não sendo eliminados no lúmen intestinal e carregados para o ambiente juntamente com as fezes, permanecem aderidos nos vasos sanguíneos e nos tecidos de órgãos do hospedeiro, usualmente no intestino, fígado e baço, conforme demonstrado na Figura 3, gerando uma reação inflamatória crônica granulomatosa, também conhecida como granuloma esquistossomótico, patologia característica desta doença (HAMS et al., 2013).

Figura 3 - Esquema do sistema porta e distribuição dos ovos pelos tecidos



Fonte: Carvalho; Coelho, Lenzi, 2008.

As manifestações patológicas e clínicas são decorrentes da localização dos ovos nos tecidos e da reação inflamatória, pode-se apresentar em diferentes formas: intestinal, hepato-intestinal, hepato-esplênica, distúrbios vasculares e pulmonares, pseudoneoplásicas, nefropatia esquistossomótica e as lesões ectópicas. (MS, 2014, DE SOUZA, 2011).

Dentre as várias alterações provocadas pela presença dos ovos nos tecidos, a maioria dos estudos tem como foco as alterações hepáticas, com destaque em três alterações patológicas: presença de granulomas, fibrose e alterações vasculares (BRASIL, 2008).

Na fase aguda o indivíduo infectado pode apresentar sintomas inespecíficos como febre, tosse, diarreia, anorexia e artralguas, a intensidade pode variar desde um quadro assintomático até o surgimento de dermatite, com erupção papular, eritema, edema e prurido, persistindo até cinco dias após a penetração das formas infectantes no hospedeiro vertebrado. Quanto à patologia é caracterizada pela infestação de ovos em vários órgãos, com formações de grandes granulomas periovulares, denominados hiperérgicos (LAMBERTUCCI, 2010). Através de experimentos compreendeu-se que as alterações no baço e no fígado surgem com a presença dos ovos maduros, e a partir daí alterações como hepatite e esplenites. (DE MELO e COELHO, 2010).

Na infecção crônica a presença de granulomas ao redor dos ovos dos *S. mansoni* pode evoluir para fibrose grave e hipertensão portal associada, levando à morbidade e mortalidade relacionadas à doença (COLLEY et al., 2014). A fase crônica da esquistossomose tem duas formas principais: hepato-intestinal (HI) e hepato-esplênica (HS) (GRYSEELS et al., 2006). Segundo os autores, a maioria dos indivíduos de áreas endêmicas infectadas pode desenvolver a esquistossomose HI, caracterizada por poucos granulomas hepáticos que se formam em pequenos ramos periféricos da veia porta, induzindo a fibrose hepática, sendo assintomática na maioria dos casos (ANDRADE, 2009). Estudos desenvolvidos por Andrade (2009) e Lambertucci (2014), mostram que uma pequena porcentagem de indivíduos infectados (4-10%) desenvolve uma forma grave da doença na qual, numerosos granulomas se formam dentro dos vasos que compõem o sistema porta hepático. Esta reação estimula a proliferação vascular, a expansão fibrótica (denominada fibrose de Symmers) que mesmo com preservação da arquitetura normal do parênquima, apresenta áreas confluentes de fibrose, alterações vasculares, seguida de uma neoformação conjuntivo-vascular intensa. Esta neoformação vascular forma em torno dos ramos portais, uma vasta rede capilar, levando à formação de um manguito vascular neoformado, composto por inúmeros pequenos vasos emaranhados e entrelaçados (ANDRADE et al., 1999). Tais alterações vasculares levam a esplenomegalia e hipertensão portal. Os autores mostram que, a resposta fibrótica é restrita à área portal.

A falta de um número maior de estudos a respeito da dinâmica da fase crônica, mais especificamente sobre a forma hepatoesplênica, pode ser justificada pelo fato de que, apenas uma pequena porcentagem de indivíduos infectados desenvolve esta forma da doença. O curso da doença, evoluindo ou não para as formas mais graves, está fortemente relacionado à carga parasitária, infecção durante a infância e múltiplas reinfecções, além de outros fatores, como antecedentes genéticos do hospedeiro, cepas de parasitos e interações parasito-hospedeiro. (ANDRADE, 2009; ANDRADE 2004 E LAMBERTUCCI 2014). Embora esteja bem estabelecido que a reação granulomatosa ao redor do ovo induz fibrose, os mecanismos que conduzem a fibrogênese ainda não foram completamente elucidados (ANDRADE, 2009; ANDRADE 2004; BURKE et al., 2009). Em 2016, Pereira e colaboradores identificaram a via Hedgehog como uma das principais vias reguladoras da fibrose relacionada à esquistossomose e remodelação vascular. Esta

via regula a ativação de células estreladas hepáticas (HSCs), o principal tipo de célula hepática produtora de matriz e está envolvida em várias doenças fibróticas do fígado (OMENETTI et al., 2011). De acordo com os autores, na esquistossomose mansoni, os antígenos de ovos estimulam os macrófagos hepáticos a produzir ligantes Hedgehog, que promovem ativação alternativa de macrófagos, ativação de HSCs e angiogênese.

### **2.1.3 O Granuloma Esquistossomótico**

A reação granulomatosa ao redor dos ovos é a principal causa das alterações teciduais e funcionais na esquistossomose, podendo desencadear micro ulcerações, pseudopólipos e micro hemorragias. (GRYSEELS, 2012).

O granuloma esquistossomótico é uma estrutura compacta, dinâmica e híbrida, constituída por componentes tanto dos ovos do parasito quanto por componentes do hospedeiro. Vários autores tentam descrever as diferentes fases de evolução do granuloma: (DIAS, et al., 2019; AMARAL, et al., 2017; LINS, 2008; COSTA-SILVA, et al., 2002; WYNN TA, CHEEVER AW, 1995 e LENZI, et al., 1998) demonstrando que, o granuloma evolui a partir de uma fase de maturação ou fase exsudativa-produtiva que se caracteriza por grande quantidade de células, células migrantes (componente exsudativo) e locais (fibroblastos e miofibroblastos), que produzem vários componentes da matriz extracelular, até uma fase de involução quando se encontra grande quantidade de fibras de colágeno, com aumento de: fibrócitos ao redor do granuloma; histiócitos e células epitelióides na periferia que substituem a zona leucocitária (HURST; WILLINGHAM; LINDBERG, 2000).

Desde a fase inicial de evolução dos granulomas descrita como fase exsudativa produtiva até a fase de involução vários autores descrevem fases intermediárias.

Segundo Lenzi (2008), no caso do granuloma esquistossomótico, cada etapa da evolução parece antecipar a próxima: estado pré-granulomatoso, que compreende reativo inicial e exsudativo, é seguido pelo estado granulomatoso, constituído, sequencialmente, pelas seguintes fases: exsudativo-produtivo, produtivo recente, produtivo fibróticos, involutivo e desintegração. O que determina esse percurso evolutivo ainda é desconhecido, apesar dos padrões morfológicos estarem bem determinados. Por consequências do processo de agregação e ordenação,

criam-se diferentes zonas na estrutura do granuloma, em que a combinação de diferentes tipos celulares, forma três áreas distintas: periovular, paracentral e periférica, formando principalmente uma composição esférica, a qual circunda o ovo (LENZI et al., 1998). Por este motivo, o ovo, é considerado um agente causador das alterações, induzindo a reação granulomatosa por liberação, no tecido adjacente, de diversos componentes próprios, em geral glicoproteínas (FRANCO; LOCKSLEY; ANDROBERTSON, 2007).

Segundo Amaral e colaboradores, 2017, o granuloma esquistossomótico pode ser classificado de acordo com seus estágios evolutivos, em quatro principais fases: 1) fase exsudativa pré-granulomatosa (PE) caracterizada por um infiltrado de células inflamatórias em processo de organização em torno do ovo do parasito; 2) necrótico-exsudativo (NE) identificado por um halo central de necrose e numerosas células inflamatórias distribuídas irregularmente nas camadas subsequentes; 3) exsudativa-produtiva (EP) caracterizada por uma rica estrutura de fibras colágenas e células inflamatórias concentradas na periferia, apresentando um aspecto mais organizado e circunferencial e 4) produtivo (P), com uma típica faixa espessa de fibras de colágeno entre o ovo, e poucos números de células inflamatórias.

De acordo com Dias e colaboradores, 2019, os granulomas podem ser observados em vários estágios de evolução da patologia, os granulomas grandes, com predominância em componentes exsudativo, exibindo infiltração de leucócitos, rico em eosinófilos, com periferia mal delimitada, são características morfológicas típicas de granulomas exsudativos-produtivos.

Já os granulomas de formas involutivas são menores principalmente na fase crônica, uma vez que a reação inflamatória é equilibrada pela destruição de granulomas mais antigos, apresentam baixa celularidade, alta densidade de colágeno, maior acúmulo de fibras colágenas, com maior grau de compactação e organização circunferencial em torno dos ovos de *S. mansoni*, essa definição, são características morfológicas típicas de granulomas no estágio involutivo, granulomas organizados (DIAS, et al., 2019). Apesar das divergências quanto à classificação das fases intermediárias do desenvolvimento do granuloma, a maioria dos autores reconhece que os granulomas evoluem de uma fase exsudativa produtiva até a forma organizada, involutiva.

A forma avançada da esquistossomose é histologicamente representada pela presença de fibrose hepática periportal. No fígado os ovos funcionam como

êmbolos, ficando retidos na luz de pequenos vasos, desencadeando resposta imune celular. A obstrução associada à fibrose trará como consequência a manifestação mais típica e mais grave na esquistossomose mansônica, à hipertensão portal (NEVES, 2005). Na esquistossomose, as lesões obstrutivas da veia porta acopladas à hipertrofia da artéria hepática são as alterações vasculares dominantes (ANDRADE et al., 2006). Estas alterações são a fonte de distúrbio fisiológico, não só expressa como hipertensão portal, mas também como insuficiência hepática.

#### **2.1.4 Hipertensão portal e angiogênese**

O Sistema Porta Hepático é formado por duas veias, sendo elas a veia mesentérica superior que drena o intestino delgado, estômago e parte do colo, e a mesentérica inferior que drena o intestino grosso (FREITAS 2004). A veia mesentérica inferior reúne-se com a veia esplênica antes desta se anastomosar com a veia mesentérica superior para formar a veia porta. No interior do fígado a veia porta se ramifica em vênulas portais, de calibre, cada vez menores (HERLIHY et al., 2002).

Já o sistema arterial hepático é formado pela artéria hepática própria que se ramifica em ramos direito e esquerdo, já dentro do fígado, estas novamente se ramificam formando as arteríolas interlobulares irrigando estruturas do espaço porta. (HERLIHY et al., 2002).

Um trabalho clássico, realizado por Andrade e Cheever (1971), utilizando injeção de resinas de cor diferentes na veia porta, artéria hepática e veia hepática, mostra que durante a infecção por *S. mansoni* a rede porta é consideravelmente reduzida, com desaparecimento dos seus ramos mais finos e mais periféricos e com amputação de ramos medianos. Quanto aos vasos mais calibroso, em seu entorno formam uma fina rede de vasos periportais finos. Em contraste, os ramos arteriais que eram escassos nos fígados normais passam a ser predominante no fígado esquistossomótico.

Segundo Andrade (2008), A hipertensão portal provavelmente se estabelece como uma reação compensatória à destruição progressiva dos ramos porta e o fígado se torna essencialmente um órgão arterializado. Em casos humanos este tipo de alteração não evolui sem consequências importantes e uma delas é que o parênquima hepático se torna muito dependente da perfusão arterial. Isso pode

atingir níveis críticos quando a pressão sistêmica cai decorrente dos sangramentos digestivos frequentes. Estudos realizados, ainda na década de setenta, através da medida da pressão sinusoidal, *in vivo*, revelaram que a hipertensão arterial é de fato responsável pela hipertensão de tipo pós-sinusoidal que aparece nas formas mais avançadas da esquistossomose (ALVES et al., 1977). Além disso, a hipertensão portal está relacionada à dilatação vascular intrapulmonar, o que ocasiona a Síndrome Hepato-pulmonar (QUEIRÓS et al., 2014)

Na tentativa de se compensar as alterações hemodinâmicas decorrentes das alterações parenquimatosas, ocorrem no tecido hepático alterações vasculares peculiares que caracterizam a forma hepatoesplênica da esquistossomose.

De acordo com Pereira e colaboradores (2015) os antígenos do ovo de *S. mansoni* estimulam a proliferação de colangiócitos e a secreção de osteopontina (OPN). Os níveis de OPN no fígado e no sangue correlacionam-se com o estágio de fibrose e a gravidade da hipertensão portal.

Freedman e Ottesen (1988), através de estudos *in vitro* mostraram que os antígenos solúveis do ovo (SEA) induzem a proliferação de células endoteliais, e estas por sua vez têm um papel importante no desenvolvimento do granuloma, por induzir aumento da produção de fator de crescimento endotelial e angiogênese (LENZI et al., 1988; LOEFFLER et al., 2002).

Angiogênese, formação de novos vasos sanguíneos de pré-existentes, desempenha uma extraordinária ação na esquistossomose. Como esquistossomos são parasitos intravasculares capazes de ocasionar lesões, destruindo os vasos sanguíneos, especialmente no fígado no caso de *S. mansoni*. Estudos revelaram que a angiogênese desempenha um papel dinâmico e fundamental no granuloma periovular esquistossomótico. A proliferação vascular é demonstrada no início granuloma periovular, mas logo é evidenciado gradualmente em direção à periferia, formando um colar vascular ao redor do granuloma periovular, enquanto que o centro do o granuloma pode parecer quase avascular (ANDRADE, et.al., 2006). Os granulomas com áreas densas de fibrose são avasculares, de modo que vasos são encontrados mais frequentemente em granulomas de fase inicial de desenvolvimento, sendo a presença deste inversamente proporcional ao tempo de evolução do granuloma (ANDRADE & BATISTA, 2005).

Estudos mostram que a angiogênese é fundamental para o desenvolvimento da fibrose do granuloma esquistossomótico (LOEFFLER et al., 1999; ANDRADE &

BATISTA, 2005). Esta associação de neoformação e diferenciação do tecido conjuntivo com a proliferação vascular são bem representadas durante a formação do granuloma esquistossomótico. Um número crescente de artigos está apontando para a importância da angiogênese na gênese e progressão da fibrose e cirrose hepática. Ramarduc e colaboradores (2003) associam isquemia, produção de fatores pró-angiogênicos, como fator de crescimento vasculho-endotelial e proliferação vascular à geração de fibrose de ductos biliares.

O processo de angiogênese foi associado de maneira positiva mais à formação de fibrose (Bataller & Brenner 2005), do que à remoção de fibrose. Pesquisas mostram que há possibilidade de a angiogênese ser capaz de exercer um papel bidirecional. Não pode ser descartado, que a presença da rica vasculatura em camundongos com esquistossomose é explicada pela recanalização de grandes vasos portais, obstruídos, seguido de dilatação dos numerosos pequenos ramos e de capilares, por pressão, desenvolvendo a neoformação vascular (angiogênese). Os mecanismos envolvidos nessas alterações parecem ter um alto grau de complexidade. Pode-se indagar a presença de células-tronco residentes ou migradas de outros lugares, com capacidade de induzir a remodelação vascular, remoção do excesso de matriz extracelular e angiogênese (THEISE, 2003).

Evidências sugerem que novos enfoques na terapia de fibrose hepática, podem ter como enfoque a angiogênese (LAI E ADAMS 2005). Segundo os autores a proliferação endotelial e o surgimento de numerosos vasos no tecido periportal após quimioterapia curativa de esquistossomose levanta a hipótese de que a angiogênese pode atuar de forma bidirecional, sendo importante na formação e a remoção da fibrose.

### **2.1.5 Controle e tratamento da esquistossomose**

O controle da esquistossomose tem sido um desafio constante para as regiões endêmicas e para os serviços de saúde pública, principalmente devido a dificuldades na prevenção da infecção precoce e reinfeção frequente. Várias estratégias como controle ambiental do hospedeiro intermediário, provisão de água potável e tratamento médico, foram usadas isoladamente e em combinação (ANDRADE et al., 2017).

Até a década de 70, o combate à esquistossomose tinha como objetivo principal o controle da transmissão, tendo como principal medida a redução das populações dos moluscos, hospedeiros intermediários. A partir dos anos 80, depois do advento de fármacos mais eficazes, seguros e baratos, o principal objetivo passou a ser o controle da morbidade, com ênfase no tratamento quimioterápico (CRELLEN et al., 2016). A quimioterapia tem sido a principal alternativa para reduzir a morbidade da doença em áreas endêmicas, bem como tratar casos isolados da doença. Contudo, a estratégia atual é conjugar o controle quimioterápico com medidas preventivas, como a educação em saúde e o saneamento, além do controle dos hospedeiros intermediários, por meio do uso de moluscidas, controle biológico e alterações no ambiente aquático. (MENDONÇA et al., 2016).

O PZQ, um derivado sintético da pirazina isoquinolina é um medicamento altamente eficaz com um bom perfil de segurança e um amplo espectro contra as infecções por helmintos e continua sendo o medicamento de escolha para a quimioterapia da esquistossomose há quase 40 anos (BERGQUIST; UTZINGER; KEISER, 2017).

O PZQ começa a atuar cerca de uma hora após sua administração, provocando paralisia e contrações musculares do parasito, dano tegumentar e aumento na exposição de antígenos na superfície do parasito. Seus efeitos colaterais podem variar de acordo com os indivíduos, mas normalmente são leves, incluindo náuseas, vômitos, mal-estar e dor abdominal, podendo ocorrer alguns efeitos mais severos incluindo diarreia sanguinolenta e urticária edematosa observada em área com altas intensidades de infecções que podem ser devido à liberação de antígenos e outros metabólitos através da morte vermes (GRYSEELS et al., 2006; VALE et al., 2017).

Apesar de muitos anos de uso e o tratamento de milhões de pessoas, o mecanismo (s) de ação de PZQ ainda não foi estabelecido. No entanto, os primeiros efeitos exercidos pelo PZQ nos vermes adulto são: (i) influxo de cálcio, (ii) contração muscular e (iii) modificações no tegumento (CIOLI et al., 2014).

O Ministério da Saúde utiliza o PZQ produzido pelo Instituto de Tecnologia em Fármacos (Farmanguinhos/Fiocruz), que é apresentado em comprimidos de 600 mg, administrados por via oral e recomenda uma dose única de 50 mg/kg de peso corporal para adolescentes acima de 15 anos e adultos e 60 mg/kg para crianças de até 15 anos (BRASIL, 2010). Após o tratamento, são relatadas taxas de cura de até

60% durante a fase aguda e 90% durante a fase crônica, com redução da contagem de ovos acima de 90% entre os não curados (CIOLI et al., 2014; GRYSEELS et al., 2006; KATZ e COELHO, 2008). Nas populações expostas às reinfecções, com número de ovos elevado, a taxa de cura pode ser reduzida, podendo a dose do medicamento, ser aumentada e fracionada (DAVIS, 1993).

Apesar de o PZQ ser o fármaco esquistossomicida disponível para o tratamento da doença, sendo eficiente e apresentando poucos efeitos colaterais, alguns aspectos relevantes devem ser considerados, tais como: (i) o PZQ é um medicamento que apresenta poucos efeitos sobre ovos e vermes imaturos do *Schistosoma*, (ii) apresenta sob a forma de uma mistura racêmica de dois estereoisômeros, sendo que apenas um é dotado de propriedades esquistossomicida, enquanto o outro contribui com a ocorrência de efeitos colaterais, sendo também responsável pelo sabor desagradável da medicação, (iii) sugere-se, também, que baixos índices de cura em algumas regiões possam manifestar uma falsa resistência/tolerância, sendo as altas taxas de infecção e reinfecção, em grandes proporções, os principais responsáveis pela baixa eficácia do PZQ durante o tratamento (COLLEY et al., 2014).

Além disso, a dependência de um único fármaco para o tratamento de uma doença com o significado público global da esquistossomose corre o risco de desenvolver e disseminar a resistência aos medicamentos, especialmente porque a susceptibilidade reduzida tem sido demonstrada no campo e no laboratório (VALE et al., 2017).

KATZ et al. (1991) e GOMES et al. (1993) observaram a ineficácia do tratamento, com PZQ, em indivíduos acometidos pela esquistossomose. Entretanto, o primeiro relato de resistência a esse fármaco foi descrita por (FALLON; DOENHOFF, 1994) em laboratório. A partir disso, alguns estudos têm sugerido a existência de resistência ao PZQ (BONESSO-SABADINI; DE SOUZA DIAS; DIAS, 2002). Sugere-se também, que baixos índices de cura em algumas regiões, possam ser atribuídos à alta carga de vermes, altas taxas de infecção e reinfecção, além da presença em grandes proporções, de vermes imaturos, responsáveis pela baixa eficácia do PZQ durante o tratamento (COLLEY et al., 2014).

## 2.2 ASSOCIAÇÃO DE FÁRMACOS

Diferentes tipos de fármacos quando associados em dosagens baixas, pode ser uma opção de melhoria no tratamento de várias enfermidades infecciosas. Este fato é de grande relevância, visto que a redução na quantidade de doses pode induzir a uma diminuição dos efeitos tóxicos e colaterais. Podendo ser então uma saída para retardar e/ou impedir o aparecimento de resistência das enfermidades (ARAUJO et al., 2008).

A tentativa de associar dois fármacos, que possam ter ação anti-esquistossomóticos, proporciona: minimizar a dose de cada fármaco administrado, diminuindo assim os efeitos colaterais e tóxicos, aumentando então o índice terapêutico, também baixar o custo do tratamento e prevenir a manifestação de cepas resistentes (CREASEY, TAYLOR; THOMAS, 1986).

## 2.3 REPOSICIONAMENTO DE FÁRMACOS

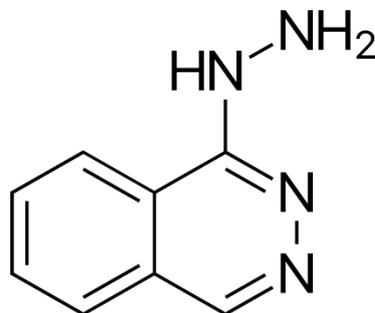
Atualmente a investigação de novos fármacos que atuem no combate à esquistossomose e que proporcionem novos mecanismos de ação podendo ser empregados com associação ao praziquantel é extremamente importante (SECOR et al., 2015). Contudo, a procura por novos fármacos é um processo complexo, competitivo, muito dependente de pesquisa, experimentos e investimento financeiro (LOMBARDINO e LOWE, 2004). Em comparação às doenças negligenciadas, pesquisas de novos fármacos são mais frequentes em enfermidades como: Artrites, diabetes e doenças cardiovasculares, uma vez que, no caso das doenças negligenciadas, estas pesquisas geram um custo no método de desenvolvimento maior do que o retorno financeiro após o lançamento do fármaco no mercado (TAMIMI e ELLIS, 2009). Sendo assim, a avaliação do reposicionamento de fármacos torna-se uma estratégia interessante de terapia em enfermidades negligenciadas, como a Esquistossomose. Esta estratégia consiste na utilização de fármacos já existente, com mecanismos de ação já conhecidos, sendo utilizados para o tratamento de outras doenças. O conceito de reposicionamento visa principalmente à redução de custos e agilidade no desenvolvimento e validação de um novo medicamento (CHONG, 2007).

As principais descobertas do modelo de reposicionamento na esquistossomose foram obtidas na década de 1980, precisamente com identificação da ação esquistossomicida dos antimaláricos: artemeter, artesunato e diidroartemisinina (LIU et al., 2014; SAEED et al., 2016). Tais fármacos exibem ação esquistossomicida contra os estágios iniciais de desenvolvimento do parasito, porém não apresentam ação satisfatória contra vermes adultos, além do mais ainda não é esclarecido o seu mecanismo de ação. Contudo, algumas pesquisas indicam que o mecanismo de ação das artemisininas, pode estar envolvido exatamente na clivagem do grupo endoperóxido do fármaco intercedida justamente pela interação com Fe<sup>2+</sup> de grupos heme. Resultando na geração de espécies radicalares lesivas para os componentes celulares do parasito (SAEED et al., 2016).

#### 2.4 UTILIZAÇÃO DA HIDRALAZINA NO DESENVOLVIMENTO DA ESQUISTOSSOMOSE MURINA

A Hidralazina (HDZ) é um vasodilatador que faz parte da terceira geração de fármacos anti-hipertensivos, posterior a pentaquina e os bloqueadores ganglionares, sendo empregada pela primeira vez em 1949. Os fármacos vasodilatadores agem na musculatura lisa vascular, promovendo relaxamento e reduzindo a resistência vascular periférica (CAMPANA et al., 2009).

Figura 4: Estrutura química da HDZ.



Fonte: disponível em <https://pt.wikipedia.org/wiki/Hidralazina>; (acesso em fevereiro de 2019).

Como um vasodilatador arterial, a hidralazina reduz a resistência da musculatura lisa vascular periférica sistêmica, e no coração alivia a ejeção do ventrículo esquerdo e aumenta seu volume. O uso da hidralazina pode provocar

redução no volume de regurgitação mitral, que reduz a tensão da parede do átrio esquerdo e afeta de maneira benéfica a redistribuição do fluxo sanguíneo (NYOLCZAS et al., 2017).

O mecanismo de ação preciso da hidralazina é desconhecido, mas provavelmente envolve uma alteração no equilíbrio de  $\text{Ca}^{2+}$  nas células do músculo liso vascular, que previne a contração mediada por ATPases, quinases ou canais iônicos dependentes de  $\text{Ca}^{2+}$ . Esse desequilíbrio é secundário a um evento de hiperpolarização de membrana (KNOWLES et al., 2004).

Segundo Karna e colaboradores (2013), a HDZ em diferentes concentrações pode contribuir sim, para o aumento da biossíntese de colágeno de um modo dependente da dose, visto que em 24 horas de incubação, células de fibroblastos confluentes em meio de cultura na presença de HDZ na dose de 500  $\mu\text{m}$  induziu um aumento de duas vezes na biossíntese de colágeno em comparação ao controle. Em vista desses dados, parece que o aumento da biossíntese do colágeno causado pela HDZ, pode ser correlacionado com o aumento da atividade da prolidase, a qual é uma enzima que catalisa a etapa final da degradação do colágeno, que completa a reciclagem da prolina para a resíntese de colágeno. Contribuindo na ativação do fator de transcrição HIF-1 $\alpha$  o qual estimula fortemente a biossíntese do colágeno. Portanto, a estimulação da atividade da prolidase (por exemplo, por HDZ) pode prevenir a degradação do fator de transcrição HIF-1 $\alpha$  e facilitar seu papel como um indutor da angiogênese.

#### **2.4.1 Contraindicação da hidralazina**

De acordo com os dados da ANVISA, a hidralazina apresenta as seguintes contraindicações: (i) Hipersensibilidade conhecida à hidralazina (substância ativa), de hidralazina ou a qualquer componente da formulação; (ii) Lúpus eritematoso sistêmico idiopático e doenças correlatas; (iii) Taquicardia grave e insuficiência cardíaca com alto débito cardíaco (por exemplo, em tireotoxicose); (iv) Insuficiência do miocárdio devido à obstrução mecânica (por exemplo, em estenose aórtica ou mitral e na pericardite constrictiva); (v) Insuficiência cardíaca isolada do ventrículo direito devido à hipertensão pulmonar (cor pulmonale); (vi) Aneurisma dissecante da aorta.

A hidralazina é administrada oralmente sendo absorvido de maneira rápida pelo trato gastrointestinal e a absorção é variável de acordo com a capacidade acetiladora do indivíduo. (Vigilância Sanitária – NOTIVISA, disponível em [www.anvisa.gov.br/hotsite/notivisa/index.htm](http://www.anvisa.gov.br/hotsite/notivisa/index.htm); acesso em outubro 2018).

#### **2.4.2 Reações adversas**

Alguns dos efeitos indesejáveis, tais como taquicardia, palpitação, sintomas de angina, flushing (rubor), cefaleia, vertigens, congestão nasal e distúrbios gastrintestinais, são comumente observados no início do tratamento, especialmente se a posologia for aumentada rapidamente. Contudo, tais reações geralmente diminuem no decorrer do tratamento. (Vigilância Sanitária – NOTIVISA, disponível em [www.anvisa.gov.br/hotsite/notivisa/index.htm](http://www.anvisa.gov.br/hotsite/notivisa/index.htm); acesso em outubro 2018).

### 3 OBJETIVOS

Abaixo serão descritos os objetivos gerais e específicos abordados no presente estudo.

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito do fármaco vasodilatador hidralazina no tratamento das alterações hepáticas associadas à esquistossomose murina na evolução dos granulomas.

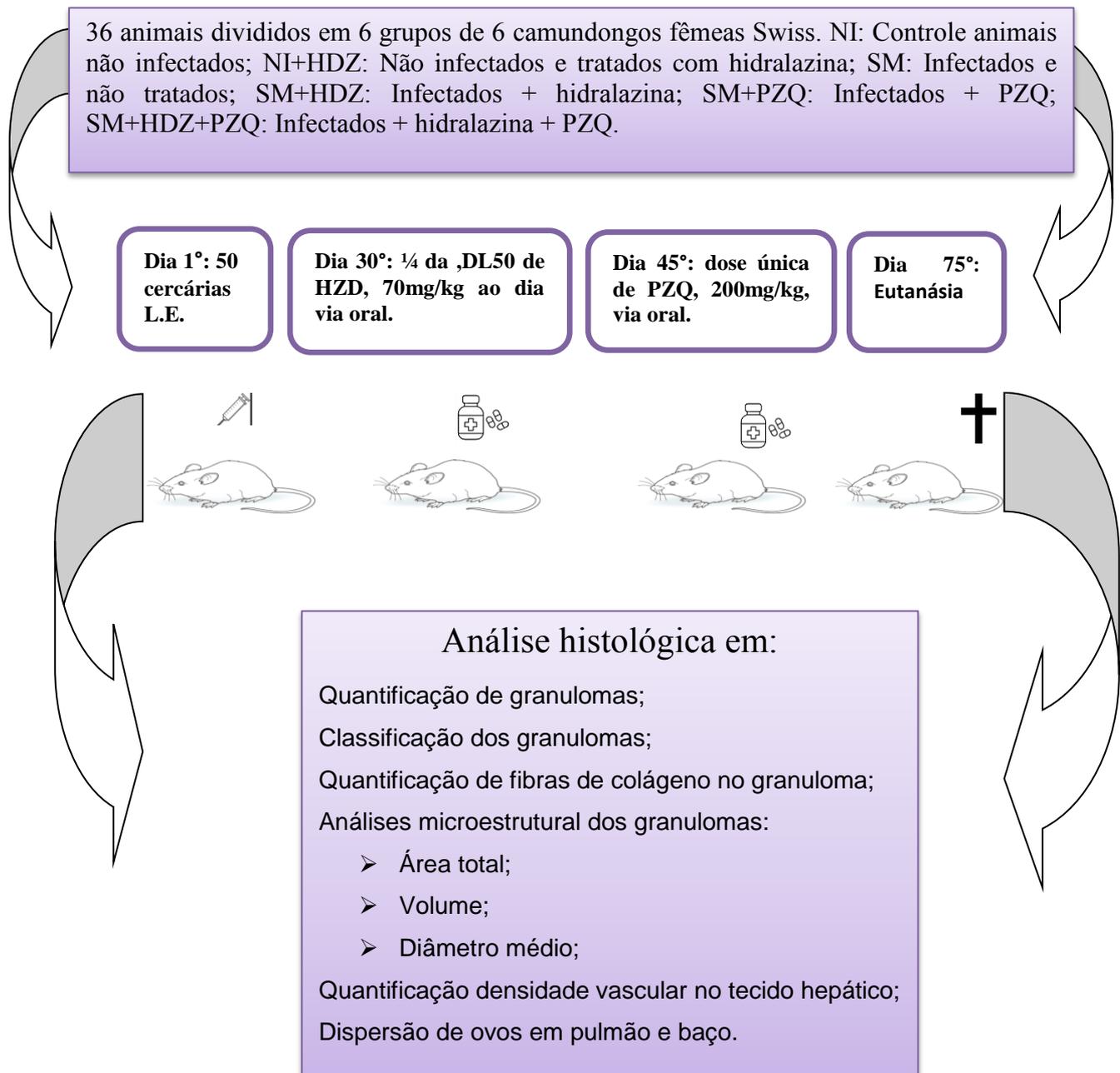
#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar o efeito da hidralazina isolado ou associado ao praziquantel durante a evolução dos granulomas na esquistossomose murina, sobre:

- a) formação de granulomas;
- b) classificação de granulomas;
- c) deposição de fibras de colágeno no granuloma;
- d) alterações morfométricas do granuloma;
- e) alterações vasculares no tecido hepático;
- f) formação de granulomas em outros órgãos.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 DELIAMENTO EXPERIMENTAL



### 4.2 ANIMAIS

Os animais empregados nesta pesquisa foram camundongos, fêmeas da linhagem *Swiss*, obtidos do Biotério do Centro de pesquisa Renê Rachou Fiocruz. Após a infecção os animais foram mantidos no Biotério de experimentação da

UNIFAL-MG, com controle de temperatura ( $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ), luminosidade (ciclos de 12h/12h, claro/escuro) e alimentados com ração comercial e água “*ad libitum*”.

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética, de pesquisas em animais da Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL – MG). Conforme o protocolo de aprovação do CEUA 26/2018 e 47/2018 e também pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Fundação Oswaldo Cruz (CEUA/FIOCRUZ).

#### 4.3 O PARASITO E INFECÇÃO

A cepa LE (isolada de paciente Luiz Evangelista Belo Horizonte Minas Gerais, 1959) de *S. mansoni* é rotineiramente mantida por passagens em série em modelos *Biomphalaria glabrata* e camundongos da linhagem *Swiss*, por mais de 40 anos no Centro de Pesquisas René Rachou/Fundação Oswaldo Cruz.

A infecção foi realizada através da inoculação de 50 cercarias (cepa LE) por via subcutânea, inoculados no dorso, de acordo com a técnica descrita por Pellegrino e Katz (1968).

#### 4.4 ADMINISTRAÇÃO DE HIDRALAZINA E PRAZIQUANTEL

Os animais tratados com hidralazina receberam por gavagem  $\frac{1}{4}$  da DL50 do fármaco (SHAW & BRAMMER, 1983), referente à 70mg/kg ao dia, por via oral, a partir do 30° dia após a infecção até o dia da eutanásia 75° dia após a infecção. A escolha do início do tratamento com HDZ aos 30 dias de infecção foi feita com o propósito de iniciar o tratamento antes do início da formação de granuloma e que o tratamento fosse mantido durante a formação deste.

Após o 45° dia de infecção os animais foram tratados com praziquantel, que receberam uma dose única de 200mg/kg, por via oral (CAMPOS et al., 1989).

#### 4.5 EUTANÁSIA E COLETA DE MATERIAL

Ao final do período experimental de 75 dias após a infecção por *S.mansoni* os animais foram eutanasiados, por overdose de quetamina associada a xilazina na proporção de 1:1 até a completa abolição dos movimentos respiratórios e dos

reflexos profundos (caudal e podal). Por meio de craniectomia, toracotomia e laparotomia, o cérebro, coração, pulmão, fígado, baço e rins foram coletados. Fragmentos de cada órgão foram fixados em solução de formalina 10%, tamponado à 10% (pH=7,4) por 48 horas.

## 4.6 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA

### 4.6.1 Processamento das amostras

1) Após a fixação histológica, os órgãos foram desidratados em concentrações crescentes de álcool a partir de 70% até álcool absoluto (99,8%). Em seguida os órgãos foram diafanizados em xilol e incluídos em parafina a 60°C.

2) Para cada órgão, foram confeccionadas laminas em micrótomo rotativo: 3 laminas contendo 3 fragmentos de tecido em cada uma, e para cada coloração. Totalizando 6 lâminas de cada órgão, com total de 18 cortes. A cada corte realizado foi desprezado como semi-intervalos de 300 micrometros do tecido para evitar analisar a mesma área histológica.

3) As lâminas então foram coradas pela técnica de hematoxilina e eosina (HE), para análise histopatológica geral, evidenciação do número e da área dos granulomas e vasos. E para a evidenciação de fibras colágenas foi utilizada a técnica de coloração por picrossirius (MONTES; JUNQUEIRA, 1991).

### 4.6.2 Obtenção de Imagens para análises microscópicas

Os cortes histológicos montados sobre lâmina histológica foram visualizados com a utilização de câmera fotográfica digital (QColor 3, Olympus, Tóquio, Japão) acoplada ao microscópio de luz convencional (Axioscope A1, Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha). Imagens digitalizadas foram obtidas a partir de corte histológico utilizando-se o software de captura e análise de imagens Axion Vision LE (Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha).

### **4.6.3 Análise histopatológica**

A avaliação histopatológica foi realizada de forma qualitativa, observando-se evidências de granulomas no fígado, baço e pulmão e a diferenciação dos granulomas hepáticos em exsudativos produtivos e organizados (fibróticos) de acordo com uma caracterização morfológica previamente estabelecida por Rodrigues e colaboradores (2017).

### **4.6.4 Análises morfométricas**

Nas análises de quantificação, foram avaliados de todos os animais de cada grupo, pelos seguintes parâmetros:

#### **4.6.4.1 Quantificação de granulomas; vasos arteriais e venosos no fígado**

Para a contagem de granulomas e a diferenciação dos vasos utilizou-se a coloração de Hematoxilina e Eosina (HE). Para a análise quantitativa dos vasos, empregou-se a metodologia de contagem aleatória simples. De cada fígado foram retiradas amostras não seriadas sendo que de cada corte amostrado 60 cortes eram eliminados para evitar a contagem do mesmo vaso sanguíneo (MUHLFELD et al., 2009; MANDARIM-DE-LACERDA et al., 2010). Após a coloração, cada corte teve 5 áreas quantificadas, totalizando 3 cortes analisados por animal. Assim, para cada animal, foram quantificados o total de 15 áreas em um aumento de 10x. Todas as análises foram feitas em um computador com o Sistema Analisador de Imagens *Axiovision4 Module Interactive Measurement* acoplado ao microscópio *AxioScope A1* da Carl Zeiss®.

#### **4.6.4.2 Determinação da área total, volume e diâmetro médio dos granulomas hepáticos:**

Área da seção equatorial dos granulomas foi determinada diretamente por um método morfométrico usando a ferramenta de contorno do programa de análise de imagem *Image-Pro plus 4.5* (Media Cybernetics Inc., Silver Spring, Maryland, EUA). O volume médio de granuloma foi estimado pelo princípio do prolato (P)

esferóide, de acordo com a fórmula  $VP = (4/3) * \pi a^2 b$ ; onde “a” representa o diâmetro menor e “b” representa o diâmetro maior do perfil da seção transversal de uma estrutura esférica (RODRIGUES et al., 2017). Foram analisados 60 granulomas exsudativo produtivo e 60 organizado por grupo, dentro do qual um ovo de *S. mansoni* foi claramente evidenciado. (RODRIGUES et al., 2017).

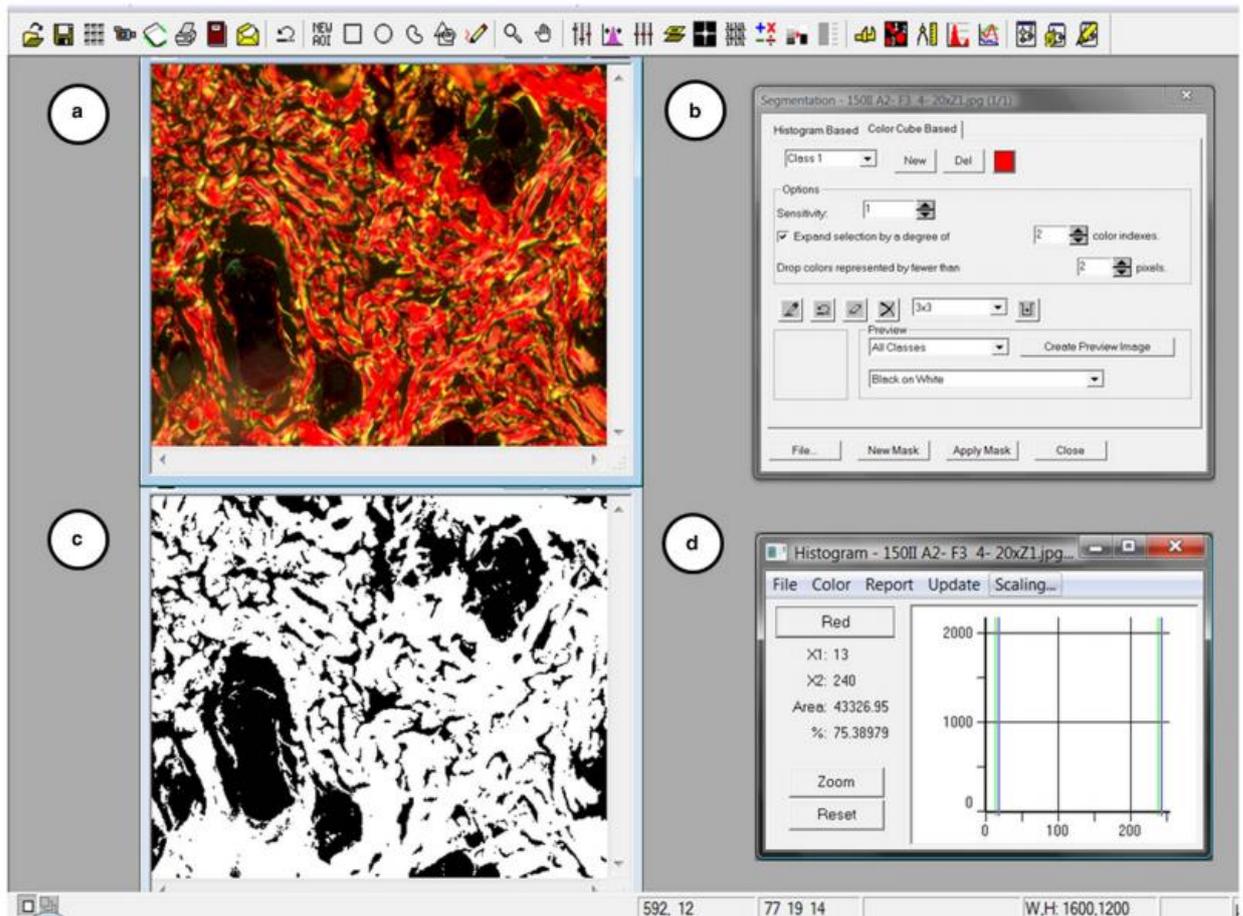
#### **4.6.4.3 Análise de colágeno com microscopia de luz polarizada e quantificação computacional de colágeno**

A quantificação das fibras de colágeno foi realizada em seções de cortes corados com picosírius, por campo de polarização microscópica. As imagens dos cortes histológicos foram capturadas por microscópio conectado a uma câmera digital Q-Color3® (Olympus). Usando uma lente de objetiva de 20x, foram capturados dez campos histológicos com área de 0,24 mm<sup>2</sup> para cada animal de modo aleatório (NOVAES, et. al., 2015).

Em seguida as imagens foram analisadas através da sobreposição de uma grade de filtro contendo 36 pontos dentro de uma área de teste padrão (AT) de 73 × 10<sup>3</sup> μm<sup>2</sup>. A área histológica ocupada pelas fibras de colágeno foi analisada por métodos computacionais previamente descritos por Mandarin e colaboradores (2010). Inicialmente, as imagens digitais foram obtidas por parâmetros ópticos para determinar o maior grau de polarização, como descrito acima, em que as fibras de colágeno aparecem brilhantes contra um fundo preto.

As imagens capturadas foram então preparadas computacionalmente usando o software Image-Pro Plus 4.5® e a distribuição das fibras de colágeno foi determinada da seguinte forma: (i) o tecido conjuntivo foi segmentado em preto puro e imagem branca para abolir qualquer diferença na intensidade da cor, (ii) fibras de colágeno brilhantes foram selecionadas e atribuídas a elas a cor branca, (iii) o tecido remanescente foi selecionado e atribuído por cor preta, e (iv) a área percentual ocupada pela cor branca (fibras de colágeno) na imagem inteira foi medida usando uma ferramenta de histograma (Figura 6). (NOVAES, et. al., 2015).

Figura 5 - Segmentação de cores computacional e quantificação de colágeno.



Fonte: (NOVAES, et. al., 2015).

Legenda:

- fibras de colágeno manchadas com picosirius com microscópio de luz polarizada. Neste método, as fibras de colágeno têm cores brilhantes que variam de verde, amarelo, laranja ou vermelho (predominante).
- caixa de segmentação aberta (modo baseado em cubo de cor) e uma nova máscara foram aplicadas selecionando todos os pixels de diferentes níveis de cor para fibras de colágeno, então uma nova imagem em preto e branco foi gerada
- Após a segmentação das cores (coloração escura), a porcentagem de fibras colágenas foi medida na imagem em preto e branco por uma ferramenta de histograma
- Pelo software Image-Pro Plus 4.5®

#### 4.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os resultados foram submetidos à análise de variância, seguida por comparações múltiplas utilizando testes Anova para os dados paramétricos e o teste de Tukey para os dados não paramétricos, de acordo com o número de grupos experimentais comparados.

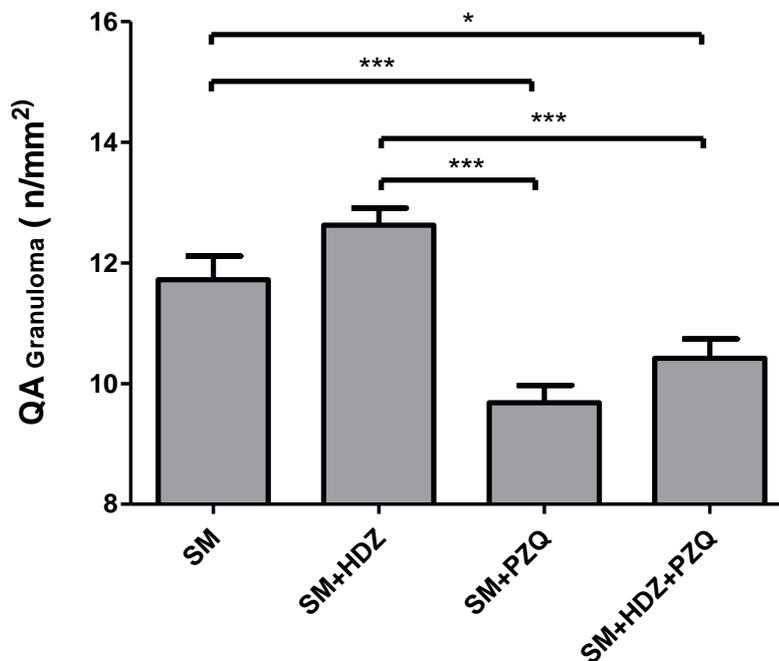
## 5 RESULTADOS

Abaixo serão descritos os resultados obtidos nesse presente estudo.

### 5.1 EFEITO DA HIDRALAZINA SOBRE O NÚMERO TOTAL DE GRANULOMAS HEPÁTICOS

Na figura 6 abaixo, mostra os resultados da quantidade de granulomas nos animais infectados com *S. mansoni*. Nota-se que os grupos SM e SM+HDZ apresentaram um número significativamente maior de granuloma com médias de 11,7 por mm<sup>2</sup> e média de 12,6 por mm<sup>2</sup> respectivamente, quando comparados com os grupos SM+PZQ e SM+HDZ+PZQ, porém não houve diferença estatística em relação ao grupo SM. Foi observada uma diminuição significativa de granulomas no grupo de animais que receberam apenas tratamento com PZQ (SM+PZQ e SM+HDZ+PZQ) com médias de 9,6 e 10,4 granulomas por mm<sup>2</sup>, respectivamente.

Figura 6 - Quantidade de granulomas



Fonte: Da autora.

Notas: Representando a quantidade de granulomas hepáticos por área em mm<sup>2</sup> entre os grupos: SM (animais infectados com *S. mansoni* e não tratados), SM+HDZ (animais infectados com *S. mansoni*, mais tratamento com hidralazina), SM+PZQ (animais infectados com *S. mansoni* mais tratamento

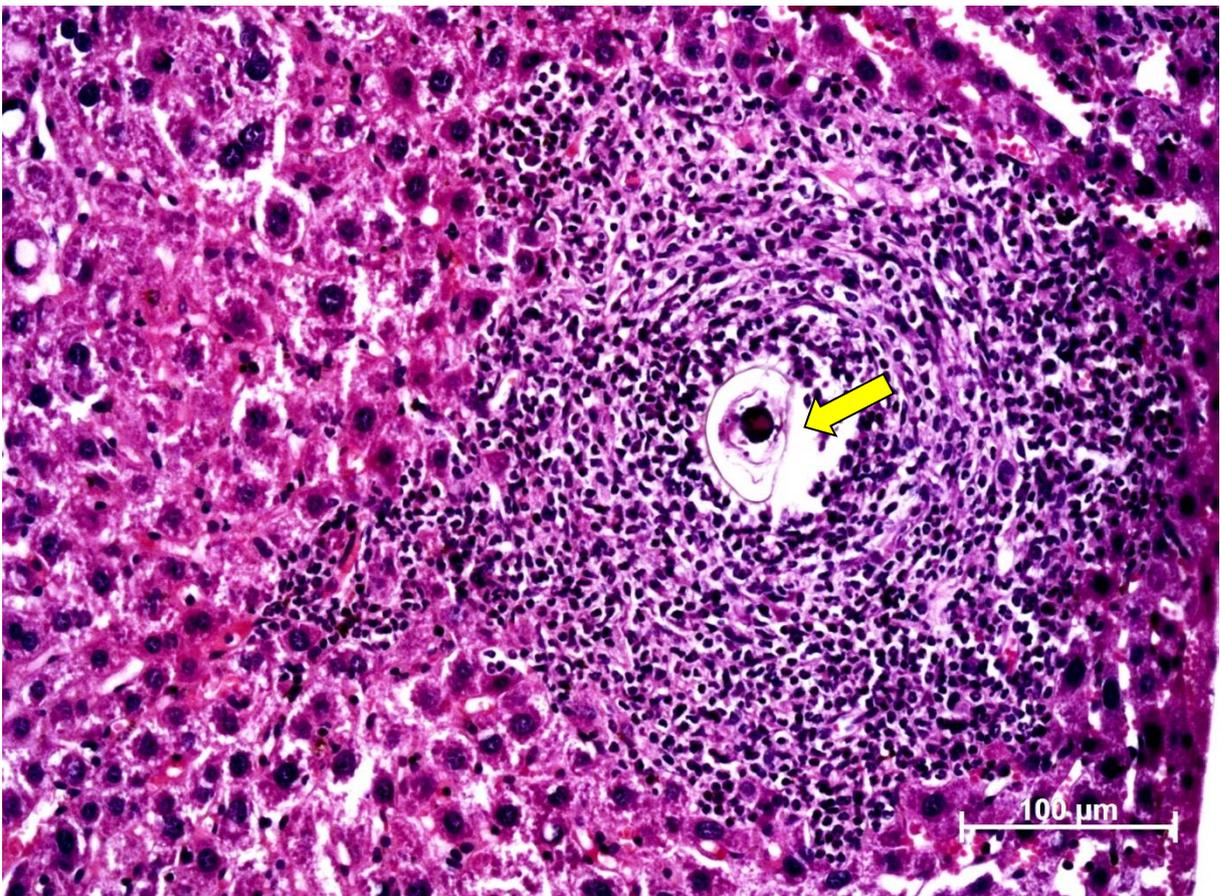
com praziquantel) e SM+HDZ+PZQ (animais infectados com *S. mansoni* mais tratamento com hidralazina e praziquantel). Diferenças estatisticamente significativa entre os grupos (\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$ ).

## 5.2 EFEITO DA HIDRALAZINA NA EVOLUÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DOS TIPOS DE GRANULOMAS HEPÁTICOS

As figuras abaixo, 7 e 8, representam microfotografias dos granulomas esquistossomóticos, classificados como granulomas exsudativos produtivos e organizados, coradas com Hematoxilina e Eosina.

A figura 7 representa um granuloma exsudativo produtivo, com grande infiltrado inflamatório ao redor do ovo de *S. mansoni* (seta).

FIGURA 7 – Granuloma exsudativo produtivo.

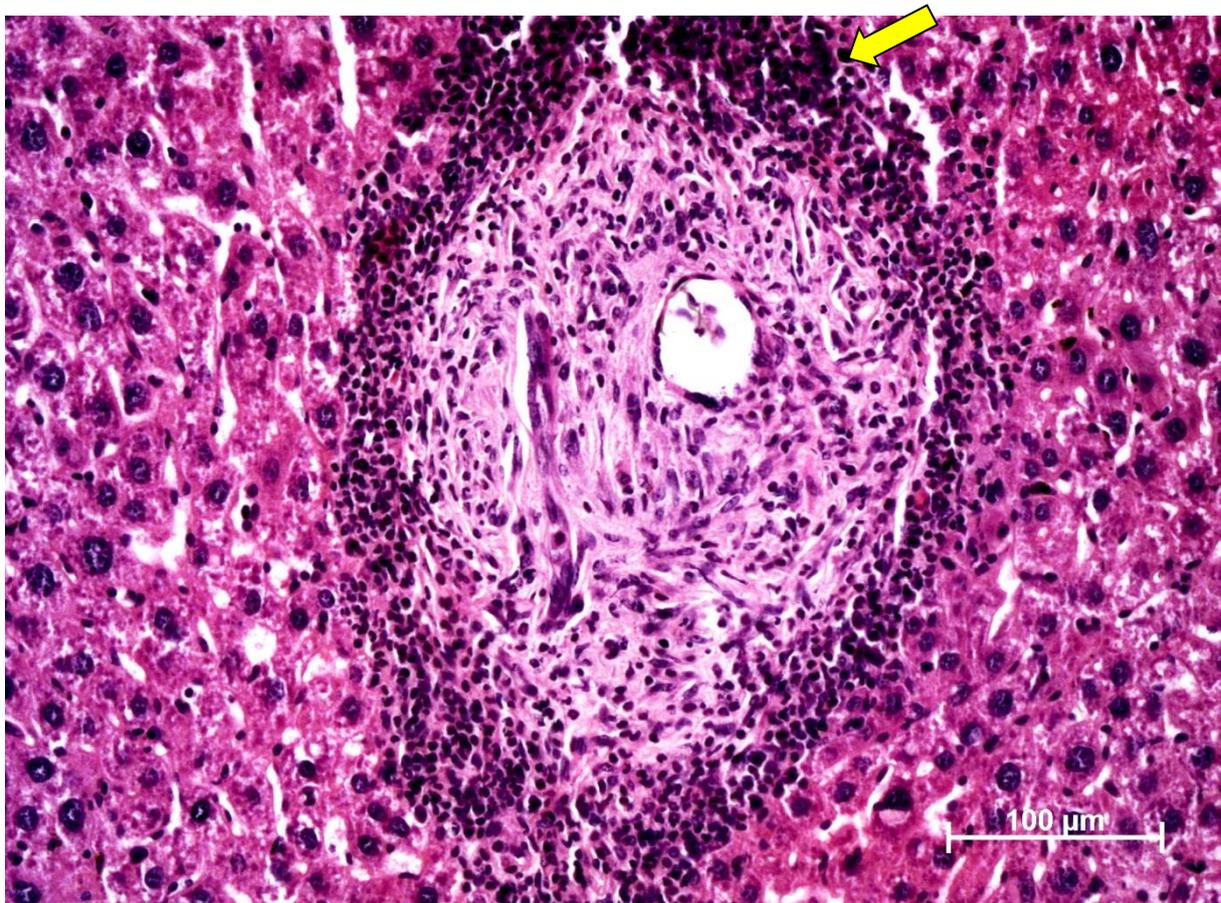


Fonte: Da autora.

Notas: Fotomicrográficas histológicas de granulomas esquistossomótico hepáticos em camundongos infectados por *Schistosoma mansoni*, classificado como granuloma exsudativo produtivos, coradas com Hematoxilina e Eosina em objetiva de 20x. Com grande infiltrado inflamatório ao redor do ovo (seta).

A figura 8 representa um granuloma produtivo, com pouco infiltrado inflamatório em comparação ao granuloma exsudativo, com aumento de depósito de fibras de colágeno ao redor do ovo de *S. mansoni* (seta).

FIGURA 8 – Granuloma organizado



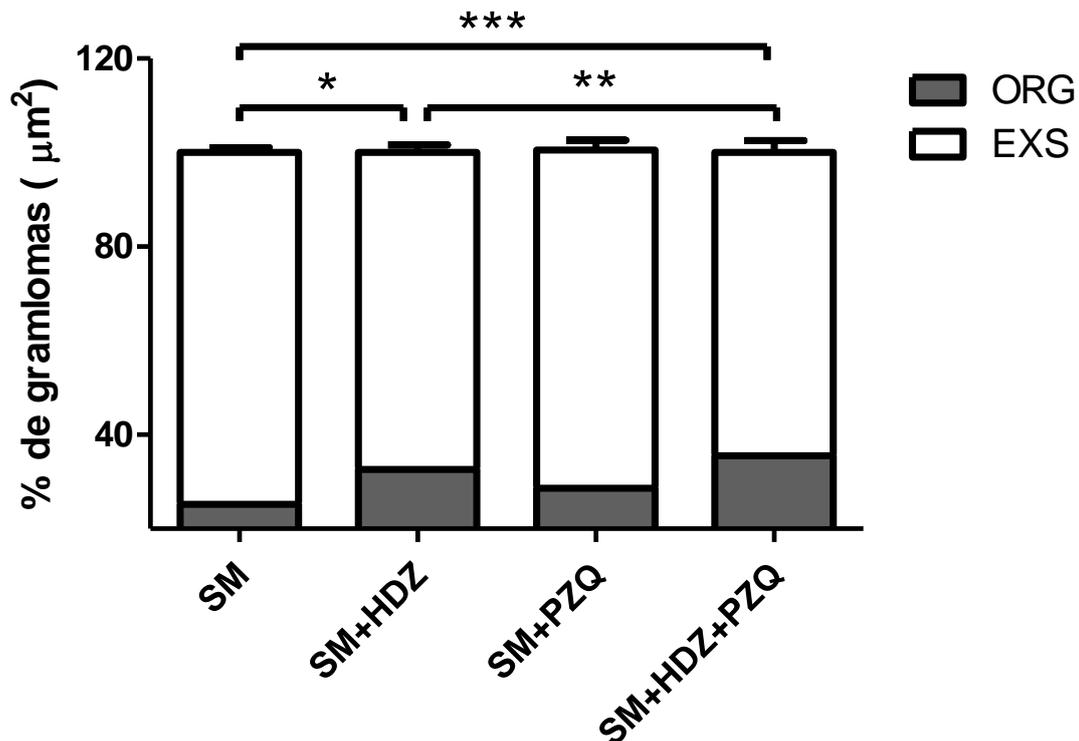
Fonte: Da autora.

Notas: Fotomicrográficas histológicas de granulomas esquistossomótico hepáticos em camundongos infectados por *Schistosoma mansoni*, classificado como granuloma organizado, corados com Hematoxilina e Eosina em objetiva de 20x. Com pouco infiltrado inflamatório em comparação ao granuloma exsudativo e aumento de depósito de fibras de colágeno ao redor do ovo (seta).

A figura 9 mostra, a porcentagem de granulomas classificados em exsudativos produtivos e organizados por  $\mu\text{m}^2$ . Nota-se um aumento significativo do número de granuloma organizado nos grupos que receberam HDZ (SM+HDZ e SM+HDZ+PZQ), quando comparados com o grupo controle de infecção SM e SM+PZQ. O grupo controle de infecção SM apresentou uma média de 25,2% de granulomas organizados, SM+HDZ média de 32,65% de granulomas organizados,

SM+PZQ com média de 28,65% e o grupo com a maior média, 35,5% referente aos granulomas organizados, foi o SM+HDZ+PZQ.

Figura 9 - Contagem geral de granulomas



Fonte: Da autora.

Notas: Representa a porcentagem de granulomas exsudativos produtivos e organizados no fígado dos animais de cada grupo. Onde SM é grupo de animais infectados com *S. mansoni* e não tratados, SM+HDZ animais infectados com *S. mansoni*, mais tratamento com hidralazina, SM+PZQ animais infectados com *S. mansoni* mais tratamento com praziquantel e SM+HDZ+PZQ animais infectados com *S. mansoni* mais tratamento com hidralazina e praziquantel. ESX representa os granulomas exsudativos produtivos e ORG granulomas organizados. Diferenças estatisticamente significativa entre os grupos (\* $p < 0,01$  \*\* $p < 0,05$  e \*\*\* $p < 0,001$ ).

### 5.3 DETERMINAÇÃO DA ÁREA DO GRANULOMA HEPÁTICO OCUPADA POR FIBRAS DE COLÁGENO

A figura 10 mostra a coloração das fibras de colágeno presente no tecido hepático dos diferentes grupos experimentais com a utilização da coloração de Picrosiurs. Nos grupos de animais sem infecção (NI e NI+HDZ) a coloração mostra baixa densidade de fibras finas de colágeno no tecido hepático, com distribuição predominantemente perivascular e ausência de granulomas esquistossomótico

(figura 10 A e 10 B). Nos grupos de animais infectados (SM, SM+HDZ, SM+PZQ, SM+HDZ+PZQ), a coloração permitiu a evidência de uma maior quantidade de colágeno intersticial, distribuído entre os cordões de hepatócitos, mas especialmente organizadas ao redor do granuloma esquistossomótico (Figura 10C, 10D, 10E e 10F).

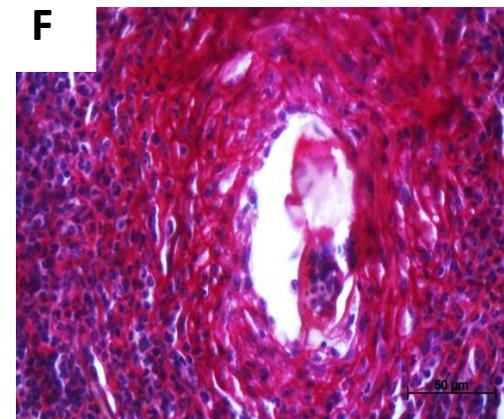
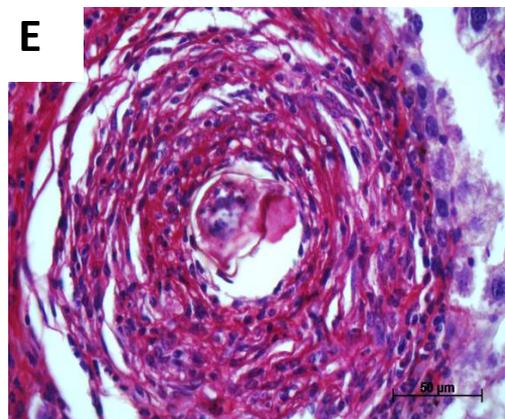
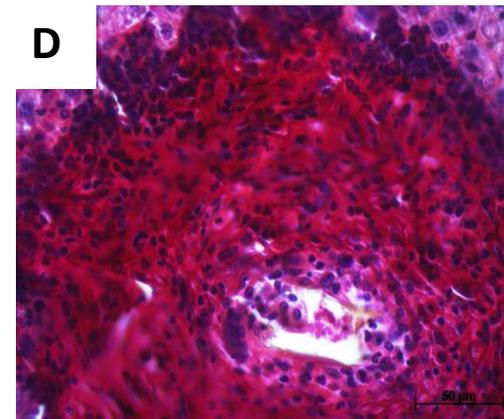
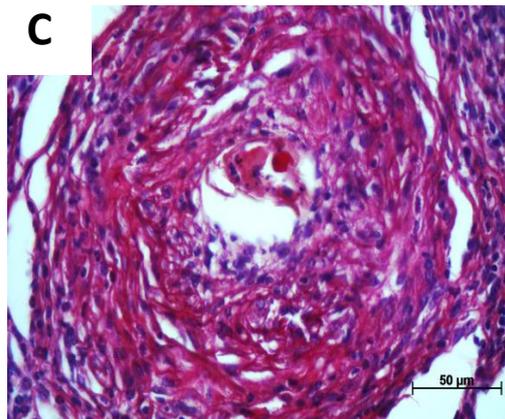
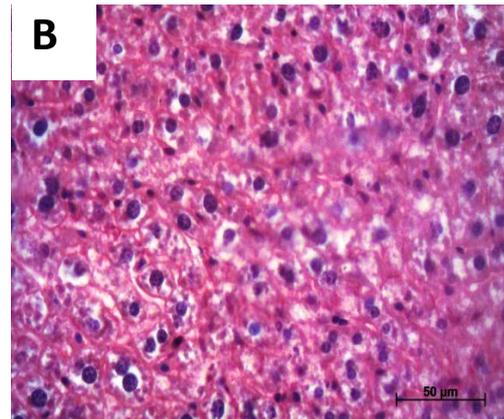
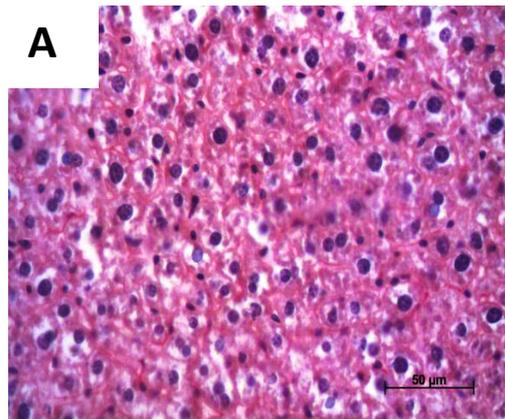


Figura 10  
-  
Coloração  
o das  
fibras de  
colágeno

Fonte: Da autora.

Notas: Análise histológica do tecido hepático, microscopia de campo claro, coloração em picosirius em objetiva de 40x. A) Imagem representativa do grupo NI (controle sem infecção e sem tratamento). B) grupo NI+HDZ (animal não infectado, mas tratado com hidralazina). C) SM (animal infectado com *S. mansoni*). D) SM+HDZ (animal infectado com *S. mansoni* mais tratamento com hidralazina). E) SM+PZQ (animal infectado com *S. mansoni* mais tratamento com praziquantel). F) SM+HDZ+PZQ (animal infectado com *S. mansoni* mais tratamento com hidralazina e praziquantel).

A figura 11 representa a distribuição das fibras de colágeno no tecido hepático através da microscopia de luz polarizada. A imagem em vermelho corresponde às fibras de colágeno, podendo ser visualizada nos grupos infectados por *S. mansoni* (SM, SM+HDZ, SM+PZQ e SM+HDZ+PZQ) (Figura 11C, 11D, 11E e 11F) porém, mais predominantemente nos animais que receberam a hidralazina isolada bem como HDZ associada ao PZQ (SM+HDZ e SM+HDZ+PZQ) (Figura 11D e 11F).

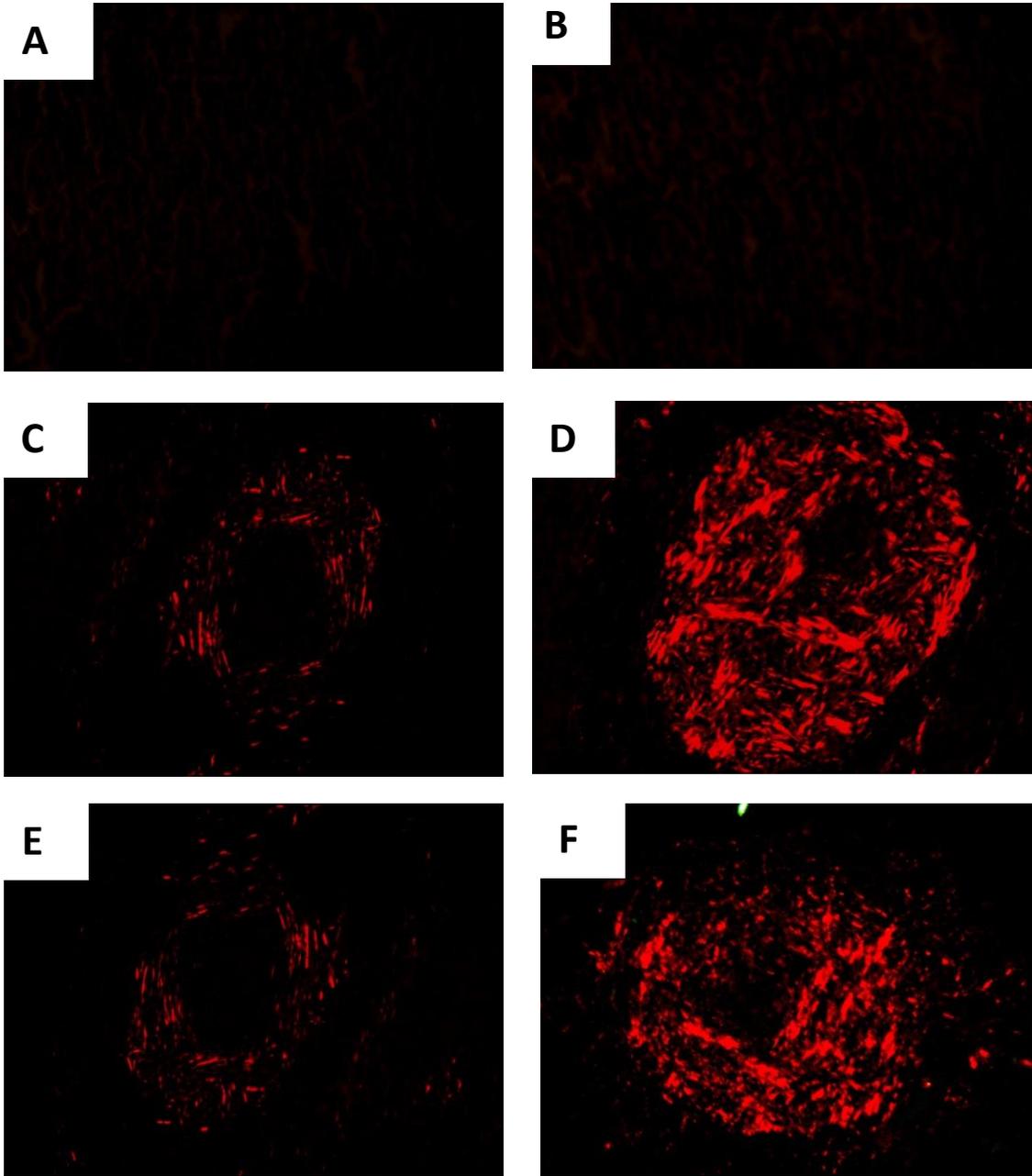


Fig  
ura  
11 -  
Dist  
ribu  
içã  
o  
das  
fibr  
as  
de  
col  
áge  
no

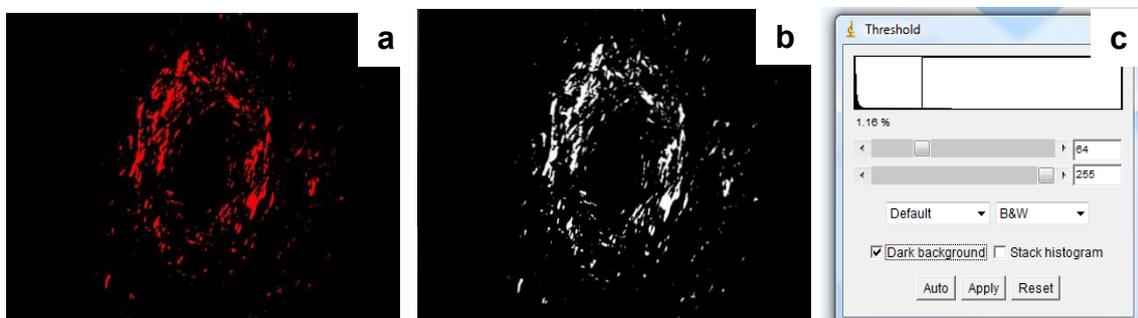
Fonte: Da autora.

Notas: Fibras de colágeno coradas com técnica de pricosirius em microscópio de luz polarizada, A) Imagem representativa do grupo NI (controle sem infecção e sem tratamento). B) grupo NI+HDZ (animal não infectado, mas tratado com hidralazina). C) SM (animal infectado com *S. mansoni*). D) SM+HDZ (animal infectado com *S. mansoni* mais tratamento com hidralazina). E) SM+PZQ (animal infectado com *S. mansoni* mais tratamento com praziquantel). F) SM+HDZ+PZQ (animal infectado com *S. mansoni* mais tratamento com hidralazina e praziquantel).

### 5.3.1 Quantificação da área ocupada pelo colágeno em porcentagem por meio do software Image-Pro Plus 4.5®

Para determinar a área ocupada pelas fibras de colágenos ao redor dos granulomas hepáticos, as imagens obtidas pela microscopia de luz polarizada, a imagens foram analisadas utilizando o software Image-Pro Plus 4.5®. Por meio deste sistema computacional, foi possível delinear em porcentagem (%) a área ocupada pelo colágeno em uma área total de 0,24 mm<sup>2</sup>, demonstrado nas figuras 12 e 13 abaixo.

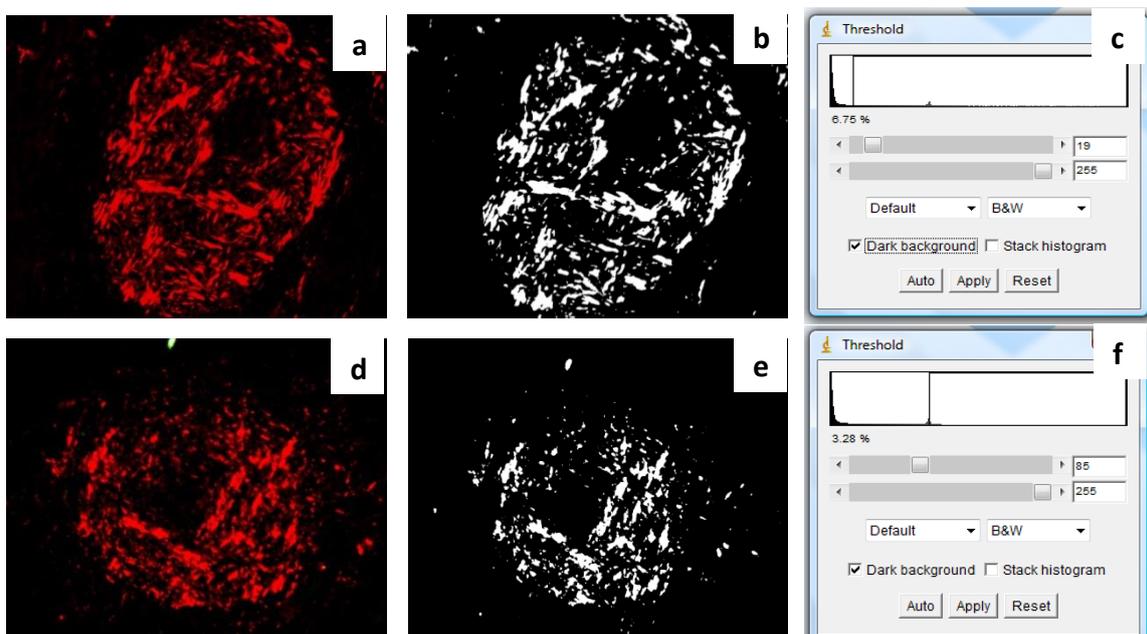
Figura 12 - Porcentagem (%) da área ocupada pelo colágeno nos grupos SM e SM+PZQ



Fonte: Da autora.

Notas: Segmentação de cores microscópica, computacional e quantificação de colágeno. Imagens de fotos com fibras de colágeno coradas com a técnica de picosirius em microscópio de luz polarizada, comparadas com as alterações de cores computacional no software Image-Pro Plus 4.5®. (a e b) Grupo de animais SM (infectados e sem tratamentos), (a) foto microscópica, (b) mesmo foto de (a), mas processada em aplicativo computacional, (c) quantificação da área ocupada pelas fibras de colágeno na mesma imagem (a e b). Imagem (d) e (e) Grupo de animais SM+PZQ (infectados e tratados com praziquantel), (d) foto microscópica, (e) mesmo foto de (d), mas processada em aplicativo computacional, (f) quantificação da área ocupada pelas fibras de colágeno na mesma imagem (d) e (e).

Figura 13 - Porcentagem (%) da área ocupada pelo colágeno nos grupos SM+HDZ e SM+HDZ+PZQ

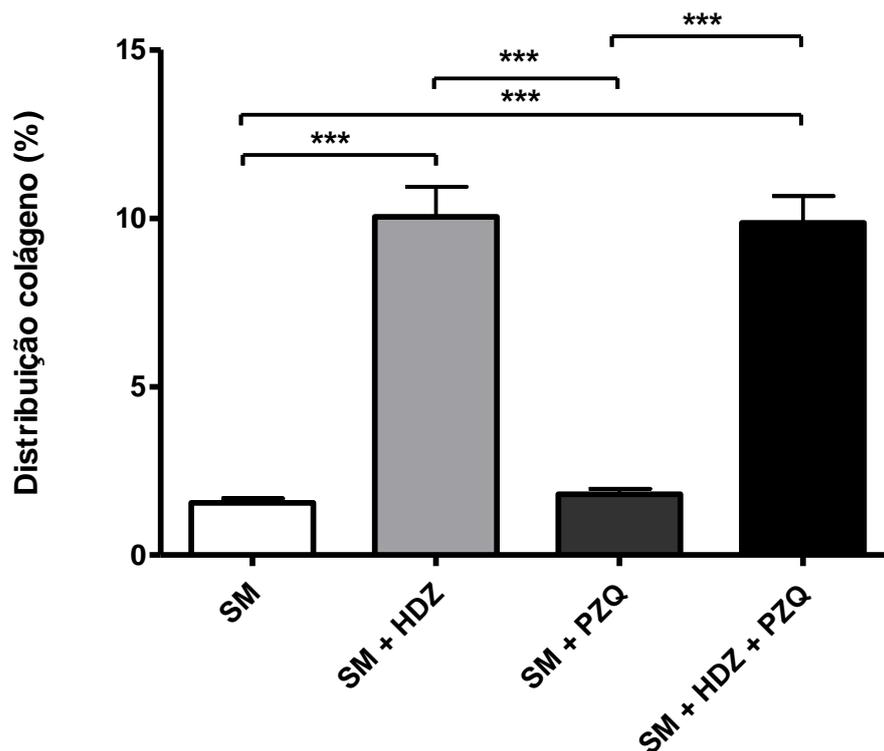


Fonte: Da autora.

Notas: Segmentação de cores microscópica, computacional e quantificação da área ocupada por fibras de colágeno. Imagens de fotos com fibras de colágeno coradas com técnica de picosirius em microscópio de luz polarizada, comparadas com as alterações de cores computacional no software Image-Pro Plus 4.5®. (a e b) Grupo de animais SM+HDZ (infectados mais tratados com hidralazina), (a) foto microscópica, (b) mesmo foto de (a), porém processada em aplicativo computacional, (c) quantificação da área ocupada pelas fibras de colágeno na mesma imagem (a e b). Imagem (d) e (e) Grupo de animais SM+HDZ+PZQ (infectados e tratados com hidralazina mais praziquantel), (d) foto microscópica, (e) mesmo foto de (d), mas processada em aplicativo computacional, (f) quantificação da área ocupada pelas fibras de colágeno na mesma imagem (d) e (e).

A partir do processamento computacional foi estabelecida a área de distribuição em % de fibras de colágeno detectadas na área da foto ( $0,24\text{mm}^2$ ), figura 14. A análise das imagens mostra um aumento significativo da área ocupada pelas fibras de colágeno no grupo de animais SM+HDZ e no grupo SM+HDZ+PZQ, sendo que, nestes grupos, em média as fibras de colágeno ocupam cerca de 10 % da área total da foto. Nos grupos que não receberam a hidralazina (SM e SM+PZQ) a porcentagem da área ocupada pelas fibras de colágeno varia em torno de 1,5 a 1,8 %, respectivamente (Figura 14).

Figura 14 - Área de distribuição em % de fibras de colágeno



Fonte: Da autora.

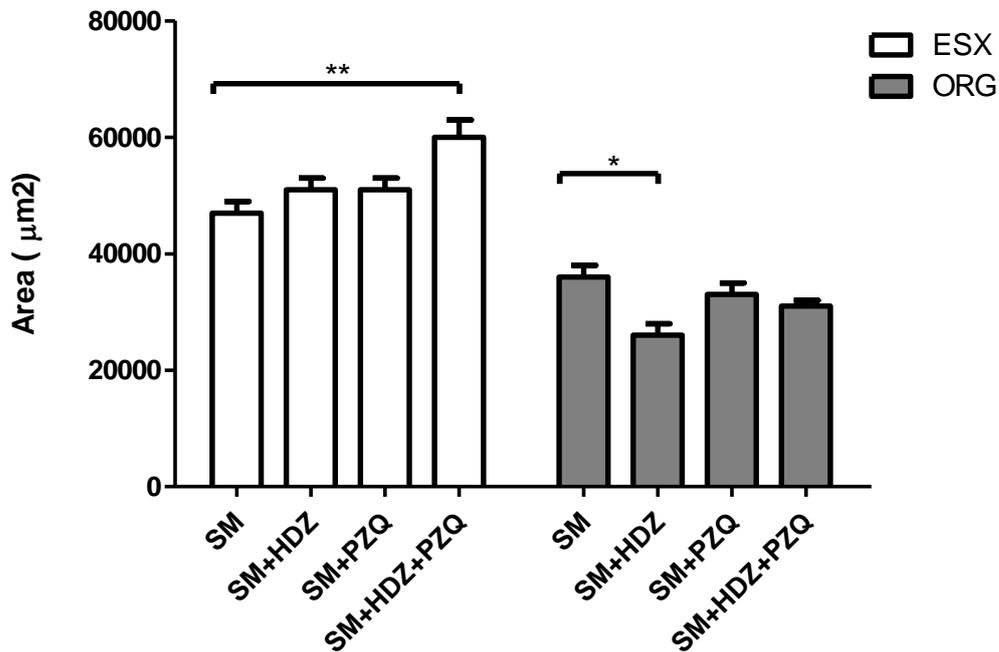
Notas: Representa a distribuição em porcentagem de fibras de colágeno na área da foto analisada ( $0,24\text{mm}^2$ ). Grupos: SM (animais infectados com *S. mansoni* e não tratados), SM+HDZ (animais infectados com *S. mansoni*, mais tratamento com hidralazina), SM+PZQ (animais infectados com *S. mansoni* mais tratamento com praziquantel) e SM+HDZ+PZQ (animais infectados com *S. mansoni* mais tratamento com hidralazina e praziquantel), para cada grupo estão representados como porcentagem média  $\pm$  erro padrão. Diferenças estatisticamente significativa entre os grupos (\*\*\*) $p < 0,001$ .

#### 5.4 ANÁLISE MICROESTRUTURAL: ÁREA TOTAL DOS GRANULOMAS HEPÁTICOS

A figura 15 mostra a medida da área dos granulomas. Nos animais SM+HDZ os granulomas organizados apresentaram uma diminuição significativa da área com média de  $26000\mu\text{m}^2$  quando comparado com os outros grupos. O grupo controle SM apresentou média de  $36000\mu\text{m}^2$ . O grupo SM+PZQ apresentou média da área de  $33000\mu\text{m}^2$  e o grupo SM+HDZ+PZQ média de  $31000\mu\text{m}^2$ .

Em relação aos granulomas exsudativos produtivos é notável que o grupo de animais SM+HDZ+PZQ exibiu um aumento significativo na área dos granulomas, quando comparado com os outros grupos, com média de  $60000\mu\text{m}^2$ . O grupo SM+PZQ e o SM+HDZ apresentaram a mesma média de  $51000\mu\text{m}^2$ . Já o grupo controle de infecção SM apresentou média de  $47000\mu\text{m}^2$ .

Figura 15 - Medida da área dos granulomas



Fonte: Da autora.

Nota: Representa a área total dos granulomas exsudativos produtivos e organizados nos fígados dos animais de cada grupo. Onde SM é grupo de animais infectados com *S. mansoni* e não tratados, SM+HDZ animais infectados com *S. mansoni*, mais tratamento com hidralazina, SM+PZQ animais infectados com *S. mansoni* mais tratamento com praziquantel e SM+HDZ+PZQ animais infectados com *S. mansoni* mais tratamento com hidralazina e praziquantel. ESX representa os granulomas exsudativos produtivos e ORG granulomas organizados. Diferenças estatisticamente significativa entre os grupos (\* $p < 0,01$  e \*\* $p < 0,05$ ).

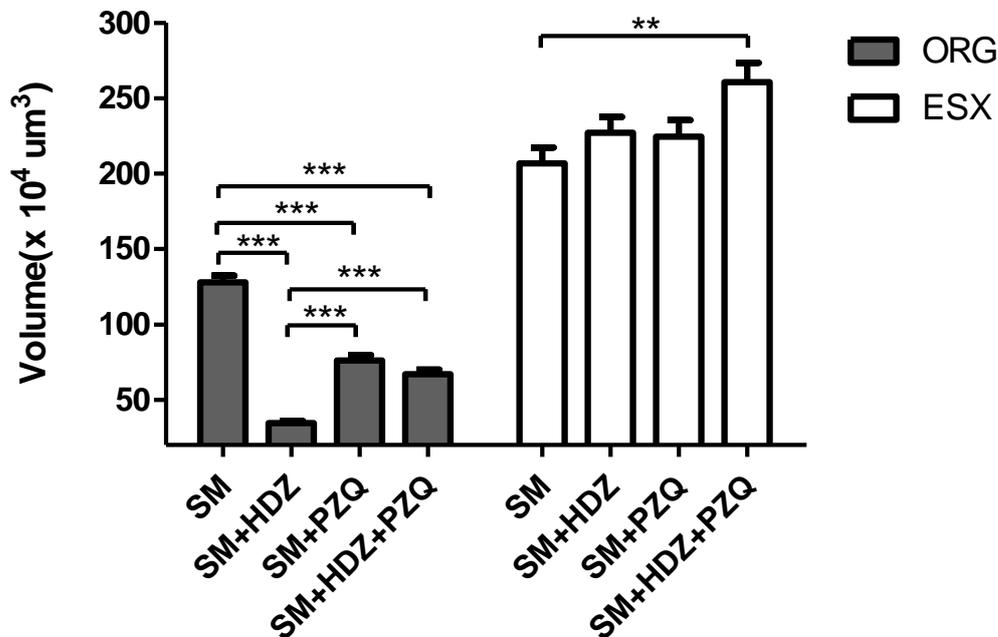
#### 5.4.1 Análise microestrutural: Volume dos granulomas

Na figura 16, nota-se que a medida do volume dos granulomas apresentou diferenças estatisticamente significativas, tanto nos granulomas exsudativos produtivos quanto nos organizados. Em relação aos granulomas organizados a figura 16 mostra que o grupo SM apresentou um volume médio ( $127,8 \times 10^4 \mu\text{m}^3$ ), significativamente maior que os demais grupos. Os granulomas do grupo SM+HDZ apresentaram volume médio de  $34,5 \times 10^4 \mu\text{m}^3$ , sendo significativamente menor que os demais grupos SM+HDZ+PZQ com volume médio de  $67,01 \times 10^4 \mu\text{m}^3$  e SM+PZQ teve com volume médio de  $76,13 \times 10^4 \mu\text{m}^3$ .

Os granulomas exsudativos do grupo SM+HDZ+PZQ, apresentou um volume médio dos granulomas ( $260,6 \times 10^4 \mu\text{m}^3$ ) significativamente maior que o grupo SM que volume médio de  $206,8 \times 10^4 \mu\text{m}^3$ . O grupo SM+PZQ apresentou

volume médio de  $224,5 \times 10^4 \mu\text{m}^3$  e o grupo SM+HDZ volume médio de  $227,1 \times 10^4 \mu\text{m}^3$  nos granulomas exsudativos produtivos.

Figura 16 - Valor do volume dos granulomas



Fonte: Da autora.

Notas: Representa o valor volume dos granulomas exsudativos produtivos e organizados nos fígados dos camundongos, dos grupos infectados com *S. mansoni*. Onde SM é grupo de animais infectados com *S. mansoni* e não tratados, SM+HDZ animais infectados com *S. mansoni*, mais tratamento com hidralazina, SM+PZQ animais infectados com *S. mansoni* mais tratamento com praziquantel e SM+HDZ+PZQ animais infectados com *S. mansoni* mais tratamento com hidralazina e praziquantel. ESX representa os granulomas exsudativos produtivos e ORG granulomas organizados. Diferenças estatisticamente significativa entre os grupos (\*\* $p < 0,05$  e \* $p < 0,001$ ).

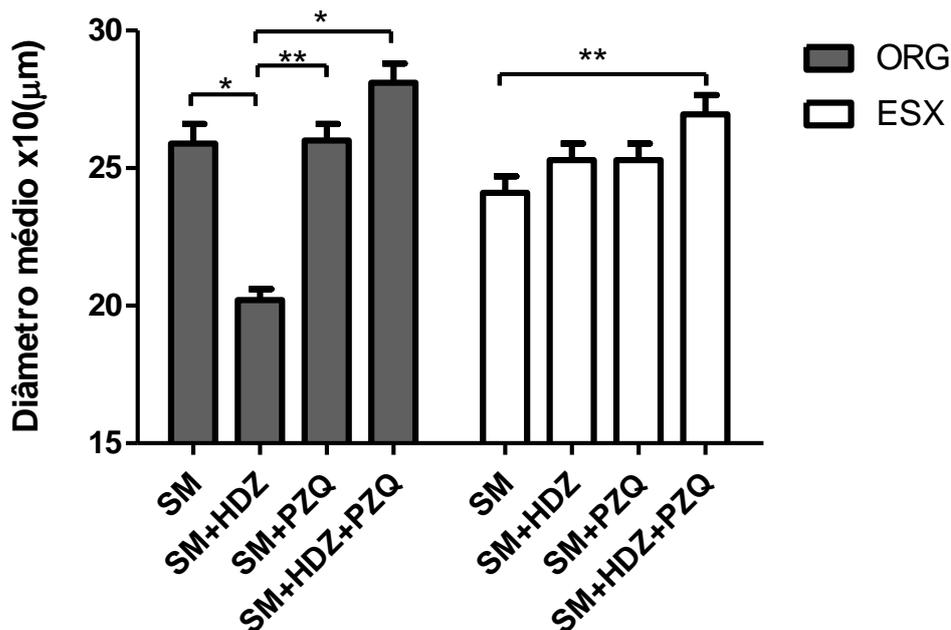
#### 5.4.2 Análise microestrutural: Diâmetro médio dos granulomas

A análise do diâmetro médio dos granulomas mostra diferenças estatísticas significantes, tanto nos granulomas organizados quanto nos exsudativos produtivos (figura 17).

Em relação aos granulomas organizados, foi observado que o grupo SM+HDZ, apresentou diâmetro médio dos granulomas ( $20,2 \times 10 \mu\text{m}$ ), significativamente menor quando comparados com os outros grupos. O grupo controle SM apresentou diâmetro médio de  $25,9 \times 10 \mu\text{m}$ , o grupo SM+HDZ+PZQ  $28,1 \times 10 \mu\text{m}$  e o grupo SM+PZQ  $26 \times 10 \mu\text{m}$ .

O diâmetro médio dos granulomas exsudativos produtivos do grupo SM, (24,11 x10 $\mu$ m) foi significativa menor que o grupo SM+HDZ+PZQ (26,96 x10 $\mu$ m), sendo estas diferenças estatisticamente significativas. Os granulomas dos grupos SM+HDZ e SM+PZQ apresentaram o diâmetro médio de 25,3 x10 $\mu$ m.

Figura – 17 Medida do diâmetro médio dos granulomas



Fonte: Da autora.

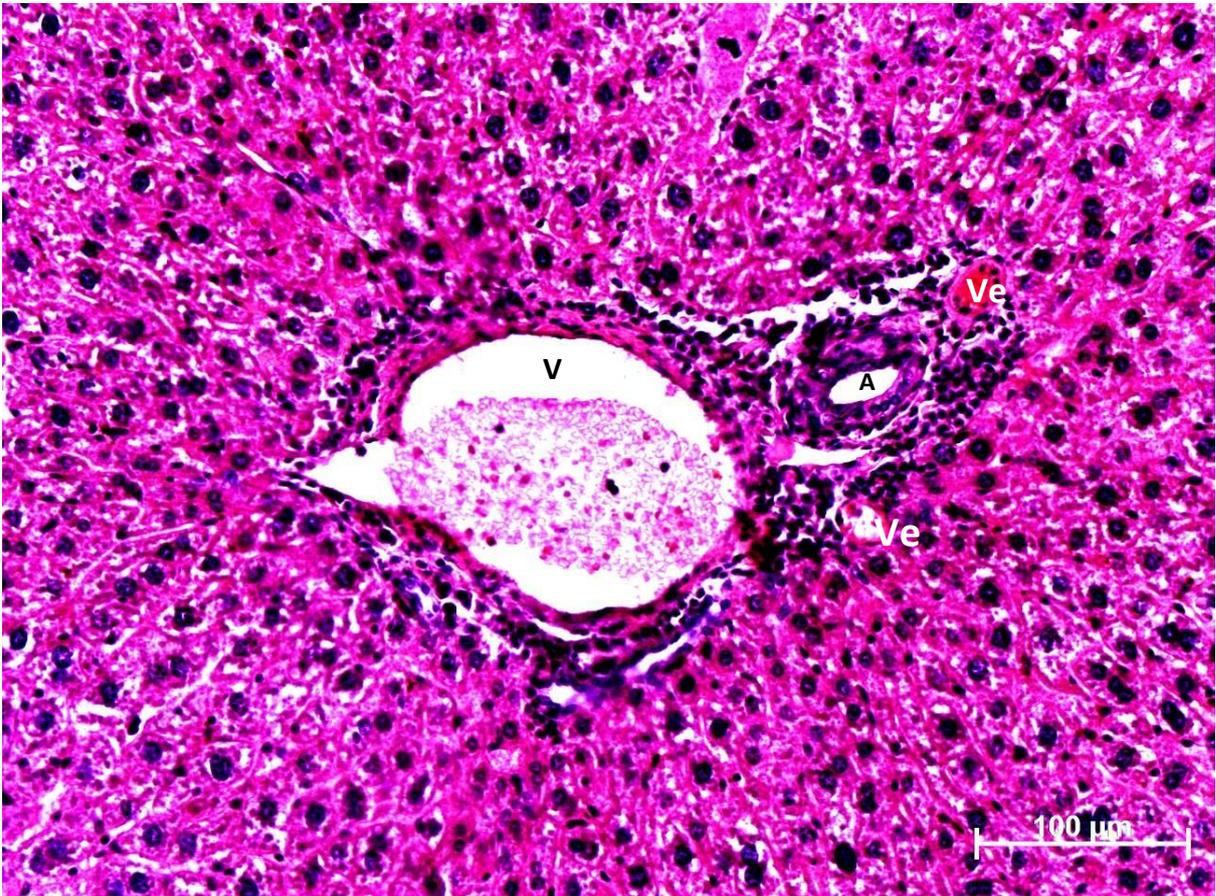
Notas: Representa o valor do diâmetro médio dos granulomas hepáticos em camundongos infectados por *Schistosoma mansoni*, de cada grupo. Onde SM é grupo de animais infectados com *S. mansoni* e não tratados, SM+HDZ animais infectados com *S. mansoni*, mais tratamento com hidralazina, SM+PZQ animais infectados com *S. mansoni* mais tratamento com praziquantel e SM+HDZ+PZQ animais infectados com *S. mansoni* mais tratamento com hidralazina e praziquantel. ESX representa os granulomas exsudativos produtivos e ORG granulomas organizados. Diferenças estatisticamente significativa entre os grupos (\*p<0,01 e \*\*p<0,05).

### 5.5 DENSIDADE VASCULAR: vasos arteriais e venosos

Na figura 18 podemos observar o tecido hepático de camundongo e suas estruturas vasculares tais como artéria (A), veias (V) e vênulas (Ve).

A artéria apresenta um espesso revestimento proeminente por células musculares lisas. Enquanto que as veias bem como as vênulas observam-se externamente apenas algumas células musculares lisas entremeadas com fibras reticulares (Figura 18).

Figura 18 – Estruturas de sistema circulatório porta hepático: artéria (A), veias (V) e vênulas (Ve).

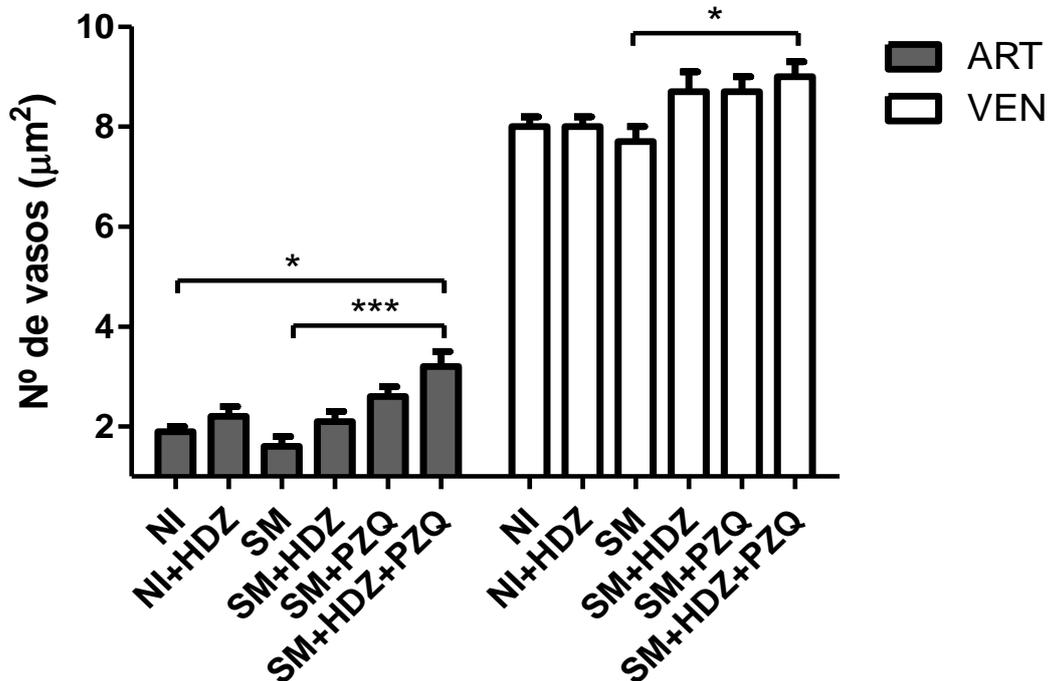


Fonte: Da autora.

Notas: Fotomicrográficas histológica de tecido hepático de camundongo com coloração de HE, visualizado na de câmera fotográfica digital acoplada ao microscópio de luz convencional em objetiva de 20x. Onde "V" nos indicam veias, Ve as vênulas e "A" vaso arterial.

A partir do que foi identificado na figura 18, foi realizada a quantificação de vasos arteriais e venosos no tecido hepático dos animais infectados com *S. mansoni*, (figura 19). O grupo SM+HDZ+PZQ apresentou um aumento significativo no número de vasos arteriais (3,2 vasos arteriais por  $\mu\text{m}^2$ ) quando comparado ao grupo NI controle (número médio de 1.9 artérias por  $\mu\text{m}^2$ ) e ao grupo SM com média de 1.6 arteriais por  $\mu\text{m}^2$ . Em relação ao número de vasos venosos o grupo SM+HDZ+PZQ apresentou número médio de 9 por  $\mu\text{m}^2$  sendo esta média significativamente maior que o grupo SM (média de 7.7 vasos venosos por  $\mu\text{m}^2$ ). O grupo NI+HDZ apresentou media de 2.2 vasos artérias e 8 venosos por  $\mu\text{m}^2$ . SM+HDZ média de 2.1 vasos artérias e 8.7 venosos por  $\mu\text{m}^2$ . SM+PZQ média de 2.6 vasos arteriais e 8.7 venosos por  $\mu\text{m}^2$ .

Figura 19 - Quantidade de vasos arteriais e venosos no tecido hepático



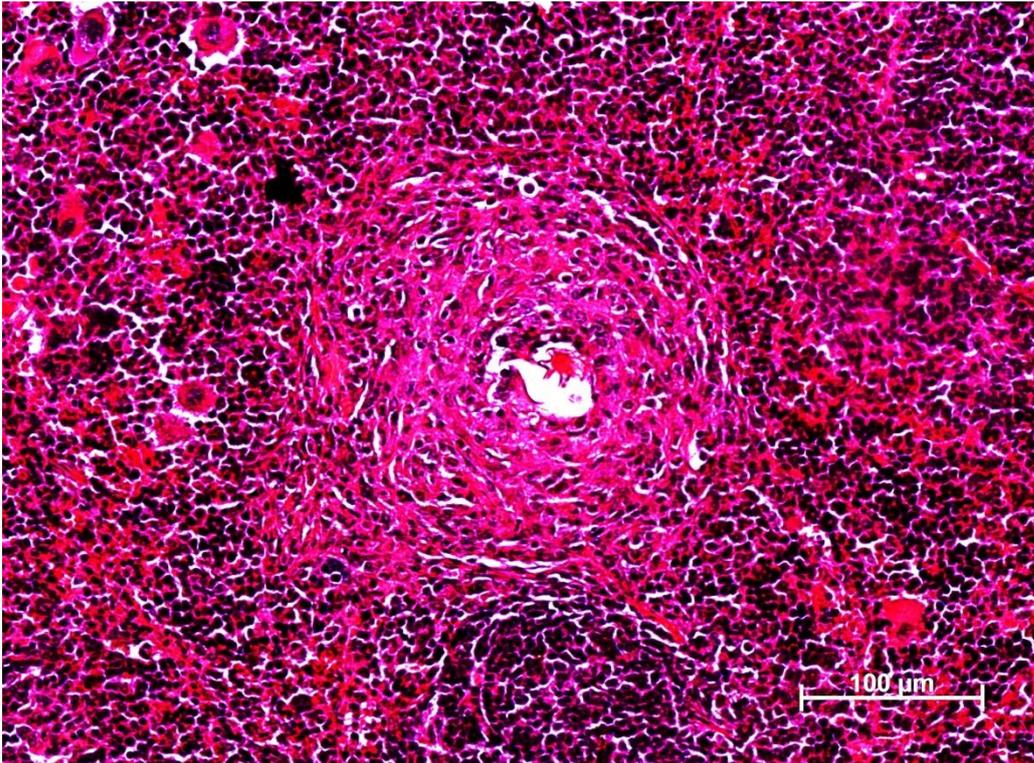
Fonte: Da autora.

Notas: Quantidade de vasos artérias e venosos, onde ART são vasos arteriais e VEN representa vasos venosos, por área, entre os grupos: NI (não infectados e não tratados), NI+HDZ (não infectado mais tratamento com hidralazina), SM (animal infectado com *S. mansoni* e não tratado), SM+HDZ (animal infectado com *S. mansoni* mais tratamento com hidralazina), SM+PZQ (animal infectado com *S. mansoni* mais tratamento com praziquantel) e SM+HDZ+PZQ (animal infectado com *S. mansoni* mais tratamento com hidralazina e praziquantel), para cada grupo estão representados como média  $\pm$  desvio padrão. Diferença estatisticamente significativa entre os grupos (\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$ ).

## 5.6 GRANULOMAS EXTRA-HEPÁTICOS

A figura 20 representa microfotografia do baço de camundongo infectado por *S. mansoni*, na qual observa-se a presença de granuloma periovular do tipo organizado, apresentando arranjo celular mais organizado, concentrado na periferia e com grande depósito de colágeno.

Figura 20 - Granuloma organizado periovular no baço

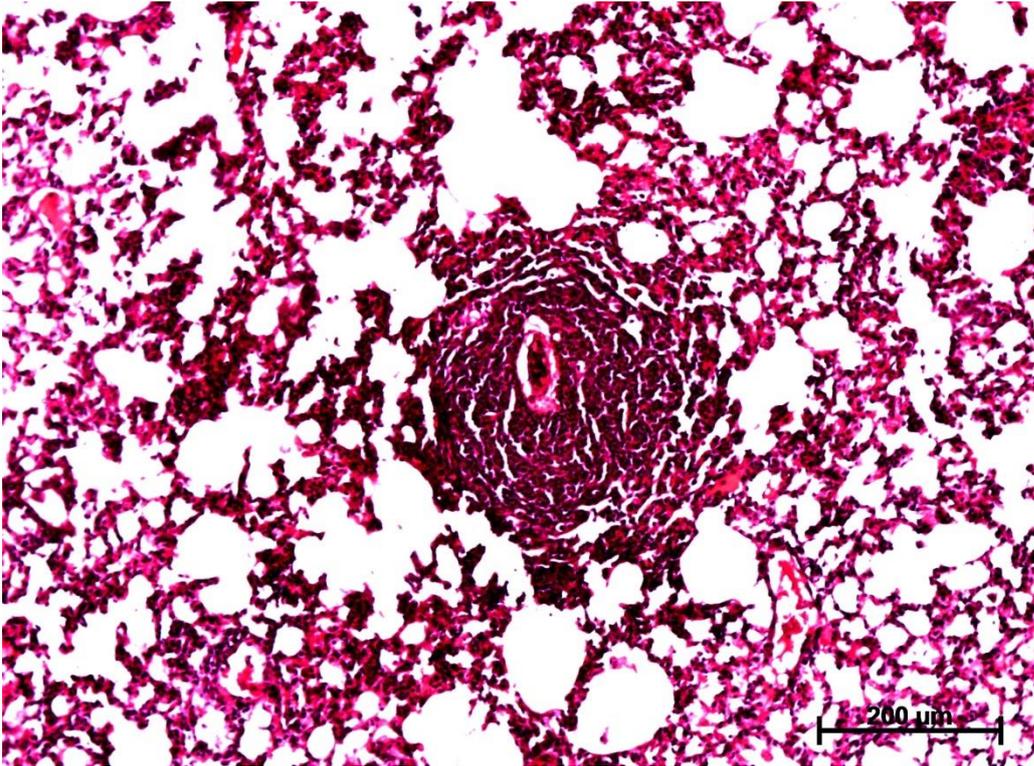


Fonte: Da autora.

Notas: Fotomicrográficas histológica de baço de camundongo com coloração de HE, visualizado na de câmera fotográfica digital acoplada ao microscópio de luz convencional em objetiva de 20x. Granuloma esquistossomótico periovular do tipo organizado com presença de material rico em colágeno

A figura 21 representa microfotografia do pulmão de camundongo infectado por *S. mansoni*, na qual observa se a presença de granuloma periovular do tipo exsudativo produtivo, compostos predominantemente, por células polimorfonucleares e mononucleares em processo de organização em torno do ovo.

Figura 21 - Granulomas exsudativo produtivo periovular no pulmão



Fonte: Da autora.

Notas: Fotomicrográficas histológica de tecido pulmonar de camundongo com coloração de HE, visualizado na de câmera fotográfica digital acoplada ao microscópio de luz convencional em objetiva de 10x. Presença de granuloma esquistosomótico periovular do tipo exsudativo produtivo.

O número de animais infectados que apresentaram granulomas periovular no baço e pulmão, está representado abaixo (tabela 1). Todos os grupos experimentais apresentaram animais com granulomas no baço e no pulmão. Porém o grupo SM, em um total de 6 animais, 5 apresentaram granulomas no baço e 3 no pulmão. O grupo SM+HDZ apresentou 6 animais com granulomas no baço e 4 no pulmão. Já no grupo SM+PZQ, dos 6 animais infectados 5 apresentaram granulomas no baço e 2 no pulmão. E por fim no grupo SM+HDZ+PZQ foram observados granulomas no baço de 5 animais e no pulmão de 3 animais.

Tabela 1: Número de animais com presença de granulomas periovular em baço e

pulmão.

ANIMAS COM GRANULOMAS PERIOVULAR NO BAÇO E PULMÃO			
Grupo de animais	Total de animais	Total de animais positivo baço	Total de animais positivo pulmão
SM	6	5	3
SM + HDZ	6	6	4
SM + PZQ	6	5	2
SM + HDZ + PZQ	6	5	3

Fonte: Da autora.

## 6 DISCUSSÃO

Mesmo com tantos empenhos e estratégias direcionadas ao controle da esquistossomose, essa patologia ainda apresenta uma elevada incidência e prevalência mundial, principalmente em países em desenvolvimento (REY 2016).

Diante das limitações terapêuticas específicas, faz-se necessário, novas busca por mais opções de tratamento, bem como a busca por novos compostos antiparasitários contra os diversos estágios do ciclo de vida de *S. mansoni*. (ARAUJO et. al., 2004). A partir disto, ressalta se a alternativa de reposicionamento de fármacos já comercializados para o possível tratamento da esquistossomose. Tal prática auxilia na descoberta de novas funções para medicamentos já existentes com potencial esquistossomicida. A utilização de medicamentos que apresentam a farmacocinética e a farmacodinâmica já descritas para uma patologia específica, na atuação com outra patologia, demonstra ser uma prática interessante e atraente, podendo ser uma nova estratégia para a busca de novos medicamentos antiparasitários (EL-FAHAM et al., 2017).

A esquistossomose mansônica, é uma doença causada resultante da infecção parasitaria por *Schistosoma mansoni* e segundo Raso e Bogliolo (1970) uma das principais consequências ocasionada pelo parasito é fibrose de symmers, uma fibrose periportal, decorrente da deposição abundante ovos de *S. mansoni*. A presença de ovos no tecido hepático causa alterações vasculares, definidas e representadas por espaços porta expandidos, por fibrose com lesões obstrutivas ou destrutivas da veia porta, seguindo com neoformação de vasos.

Neste contexto o presente estudo mostrou o efeito da hidralazina no desenvolvimento da infecção *S. mansoni*, mais especificamente na formação do granuloma e alterações vasculares.

Para avaliar o efeito da hidralazina na formação do granuloma esquistossomótico, o fígado de camundongos infectados por *S. mansoni* tratado com HDZ isolado ou associado ao PZQ, foi submetido à análise histológica. A partir da coloração de hematoxilina-eosina, foi possível observar que animais sem infecção por *S. mansoni* permaneceram com a morfologia do seu tecido normal, por outro lado os animais infectados por *S. mansoni* exibiram um infiltrado inflamatório evidente, característico do granuloma esquistossomótico.

Em se tratando do número de granuloma encontrado no tecido hepático, como era de se esperar o grupo SM apresentou um número maior de granuloma, já que durante a infecção ativa com a presença de vermes adultos vivos, são lançados diariamente cerca de 300 ovos no sistema porta hepático e de acordo com Lenzi e colaboradores (2008), conseqüentemente o número de granulomas tende a aumentar ao longo da infecção. Quando analisamos o efeito da administração da hidralazina no número de granulomas, observamos que não houve diferença entre os grupos SM e SM+HDZ, porém o número de granulomas presentes nestes grupos foram significativamente maiores quando comparados aos grupos que receberam o tratamento com praziquantel. O tratamento com praziquantel leva à substancial redução da carga parasitária e de produção de ovos pelo *S. mansoni* (ROSS AG, BARTLEY PB, SLEIGH AC, et al. 2002). Sendo assim é de se esperar que os grupos tratados com PZQ apresentem um número menor de granulomas e conclui-se que a HDZ não interfere na formação de granulomas por não possuir ação direta sobre os vermes adultos. Não existem dados na literatura referentes a estudos sobre o efeito da HDZ no desenvolvimento da esquistossomose.

No que se refere ao desenvolvimento dos granulomas, os tipos de granulomas observados e analisados no presente estudo segue o que está descrito na literatura. Lenzi e colaboradores (1998) descreve esta reação como sendo predominantemente regida em sua fase inicial por células mononucleares migrantes, que agrupadas junto com células do órgão afetado, montam-se em meio a componentes de uma matriz extracelular heterogênea, uma estrutura esférica, que circunda cada ovo presente, formando assim os granulomas esquistossomótico. No decorrer da evolução dos granulomas Flores-Villanueva e colaboradores (1993) demonstram que o granuloma diminui seu tamanho, procedendo a uma redução na inflamação ao redor dos ovos, através de um processo de imunomodulação, que envolve vários fatores, dentre eles a participação de citocinas.

No presente trabalho, analisamos os tipos de granulomas encontrados nos diferentes grupos experimentais, classificando-os a partir do que foi descrito por Rodrigues e colaboradores (2017). De acordo com a descrição dos autores foram considerados granuloma exsudativo produtivo (EXS) aqueles que apresentavam confluência marcante, alta celularidade e poucas fibras de colágeno (figura 7), enquanto os granulomas organizados apresentavam baixa celularidade e grande depósito de colágeno (figura 8).

Como é descrito na literatura, ao longo do tempo de infecção os granulomas esquistossomóticos hepáticos vão se modificando morfológicamente, apresentando, em camundongos, seu máximo de reatividade celular entre 7 a 9 semanas após a infecção, declinando após este período (Colley, 1971). Lenzi e colaboradores (1998) descrevem a predominância de granulomas grandes com infiltrado celular intenso na fase aguda da doença (8 semanas) e já na fase crônica há um aumento de granulomas fibróticos (16 semanas após infecção). No presente trabalho os camundongos foram eutanasiados e seus órgãos foram retirados para análise, 75 dias após a infecção (10 semanas), ou seja, ainda em fase aguda da doença. Sendo assim, a contagem de granulomas Exsudativos produtivos e organizados, nos diferentes grupos experimentais, mostrou uma proporção predominante de granulomas ESX em relação aos ORG, o que era de se esperar devido ao tempo de infecção. Por outro lado, quando observamos a proporção de granulomas ORG nos diferentes grupos experimentais observamos que os animais infectados que receberam a administração de hidralazina (SM+HDZ e SM+HDZ+PZQ), apresentaram um aumento significativo na porcentagem destes granulomas quando comparados aos demais grupos. Tal fato sugere que a HDZ possa estar promovendo a involução precoce dos granulomas. De acordo com o que está descrito na literatura a HDZ causa alterações metabólicas no tecido conjuntivo, incluindo aumento de colágeno tecidual (WEGLARZ et al., 1990; MEILMAN et al., 1965 e KARNA et al., 2013). De acordo com os critérios utilizados neste trabalho para a classificação dos granulomas, os granulomas classificados em ORG apresentem uma maior quantidade de fibras de colágeno e o aumento do número destes aconteceu nos grupos nos quais a HDZ foi administrada. Uma vez percebida a ação da hidralazina no aumento do número de granulomas organizados, fez necessário à análise mais detalhada destes granulomas.

Na tentativa de comprovar o efeito da HDZ na evolução dos granulomas esquistossomóticos foi realizada a quantificação das fibras de colágeno nos granulomas. A evidenciação das fibras de colágeno foi realizada pela coloração de Picrosirius. Harvie e colaboradores (2018) mostraram análises histológicas, semelhantes, onde a deposição de colágeno e a fibrose hepática também foram visualizadas pela reação histoquímica de picrosirius. Sendo assim, os animais não infectados (NI e NI+HDZ), exibiram uma coloração vermelho de Sirius mínima sendo notada nas regiões perivascular quando comparados aos grupos infectados (SM,

SM+HDZ, SM+PZQ e SM+HDZ+PZQ). Vários autores concordam que os ovos com o miracídio em seu interior são responsáveis por desencadear a resposta inflamatória granulomatosa e inclusive a fibrose (LENZI et al., 1998; ANDRADE, 2008; BURKE, 2009), portanto, é de se esperar que no fígado dos animais infectados, a resposta inflamatória apresente coloração por picrosírius mais intensa quanto comparado aos animais não infectados. No entanto, os animais que receberam tratamento apenas com PZQ (SM+PZQ), apresentaram uma leve diminuição na intensidade da coloração por picrosírius, indicando a diminuição da expressão de fibras de colágeno, quando comparado com o grupo SM. Dados mostram que em infecções experimentais recentes (8 a 10 semanas de exposição) o tratamento leva a redução de granulomas, hepatite e ao desaparecimento da fibrose (GÖNNERT, R. & ANDREWS, 1977; WARREN, 1968 e ZILTON et al., 2006). Em se tratando dos grupos de animais infectados que receberam a administração de hidralazina, observa-se uma coloração mais intensa indicando um aumento de depósito de fibras de colágenos. Karna e colaboradores (2013) mostraram que a HDZ tem uma relação positiva com a síntese de colágeno o que pode refletir em um remodelamento intersticial, levando ao aumento ou diminuição do conteúdo colágeno dependendo da taxa de degradação do colágeno e do tipo de tecido analisado. Para comprovar os dados qualitativos observados na coloração de picrosírius, foi realizada a análise computacional das imagens.

A partir da análise computacional foi possível quantificar as fibras de colágeno nos granulomas hepáticos. Os resultados mostram que a HDZ aumenta a quantidade de colágeno presente no granuloma (figura 14). Tal fato pode ser confirmado através dos estudos de Bhatnagar e colaboradores (1972), que demonstraram que a hidralazina causa alterações metabólicas no tecido conjuntivo, aumentando o conteúdo de colágeno tecidual, na atividade colagenolítica de camundongos.

Em adição, as análises microestruturais dos granulomas mostraram que a HDZ influenciou diretamente na evolução dos granulomas classificados como organizados de maneira que, mesmo apresentando uma quantidade maior de fibras de colágenos, a área, o volume e o diâmetro médio destes granulomas foram menores que o grupo SM. Acredita-se que a HDZ possa estar influenciando no processo maturação e involução dos granulomas. Segundo Lenzi e colaboradores (1998), a matriz extracelular apresenta, durante as fases de maturação e involução

do granuloma, três padrões básicos: o temporário (caracterizado pela predominância de fibronectina); o quase-definitivo (rico em colágeno) e involutivo (quando ocorre a degradação, ou seja, a lise da matriz extracelular predomina a síntese). Deste modo, acredita-se que a presença da HDZ possa acelerar a involução dos granulomas baseado nos padrões descritos por Lenzi e colaboradores (1998), e justifica a diminuição dos parâmetros microestruturais do granuloma dos grupos tratados com HDZ. Segundo Karna e colaboradores (2013) ao contrário do que acontece com fibras de colágenos, a HDZ reduz a fibrose em alguns tecidos, o que sugere o envolvimento de colágenos do tipo 1, neste contexto, devido a sua característica de ser biodegradável.

Em relação aos granulomas do tipo exsudativos produtivos, a predominância deste pode ser justificada pelo fato das análises realizadas no presente trabalho, terem sido realizadas durante a fase aguda da infecção. Segundo Lenzi (2008), a regulação do granuloma parece seguir mecanismos diferentes, conforme a fase da infecção.

Baseado nos possíveis efeitos de indução de angiogênese e vasodilatação da hidralazina, o presente trabalho analisou o efeito deste fármaco no sistema porta hepático durante a infecção por *S. mansoni*. Carvalho e Andrade (2005) observaram as alterações na árvore vascular portal na esquistossomose. Inicialmente os autores descrevem a ocorrência de obstrução e destruição de finos vasos portais, por numerosos ovos embolizados, seguida de uma adaptação do sistema porta, com a dilatação de finos ramos periportais. Se a oviposição continua em ritmo adequado, ocasiona a oclusão dos mesmos, provocando inflamação granulomatosa, angiogênese e fibrose. De maneira que ao final deste processo há uma formação de um manguito vascular neoformado, composto por inúmeros pequenos vasos, que são estreitamente entrelaçados, formando uma rede de malhas irregulares e muito apertadas, a qual envolve os vasos e os acompanha de modo sistemático. (SILVA et al., 2003).

De acordo com os dados demonstrados na figura 19 a HDZ parece induzir um aumento do número de vasos presentes no fígado dos animais. Destaca-se aqui o aumento significativo do número de artérias no grupo SM+HDZ+PZQ em relação aos grupos NI e SM. Andrade (2008) descreve que os ramos arteriais que, nos fígados normais aparecem escassos, surgem nos fígados esquistossomóticos em fase crônica como o elemento vascular predominante. As análises histológicas

realizadas neste trabalho foram realizadas em fase aguda, o que leva a supor que o aumento dos vasos artérias observadas seja devido à presença de HDZ. Segundo Knowles e colaboradores (2004) a HDZ induz angiogenese através da produção de HIF- $\alpha$  (Fator induzível por hipóxia) e VEGF (Fator de crescimento endotelial vascular).

Além da angiogênese a HDZ é capaz de realizar o alargamento dos vasos sanguíneos a partir do relaxamento das células musculares lisas que se encontram dentro dos vasos. A principal função da vasodilatação é aumentar o fluxo sanguíneo no corpo, para os tecidos que mais precisam dele, (ELLERSHAW et. al., 2001). Desta maneira a partir da evidenciação do dano do tecido hepático, causado pela infecção pelo *S. mansoni*, o presente trabalho analisou o fluxo de ovos e formação de granulomas no baço e no pulmão.

A presença de numerosos granulomas pode ser constatada principalmente no fígado seguido pelo baço, mas podem ocorrer também em outros órgãos, como o pulmão. Granulomas extra-hepáticos são reações patológicas ligadas à migração do parasito e refluxo de ovos (FERRARI, T. C. A.1999). Couto e colaboradores (2007) descrevem que do ponto de vista patológico, o fígado é o órgão alvo, atingido em vários graus de intensidade, com granulomas epitelióides que surgem nos espaços periportais em resposta à presença dos ovos do parasito. Na forma hepatoesplênica (com acometimento do fígado e do baço) aparece no fígado o espessamento fibroso nos espaços portais, mais acentuado no hilo, cuja consequência é a hipertensão portal. Essa hipertensão portal acarreta comprometimento do baço. Desta forma, estes mesmos autores, através de estudos experimentais demonstraram que apesar do aumento do baço ocorrer em 90% a 100% dos casos, os estudos histopatológicos, confirmaram a presença de granulomas em 50% dos baços dos animais analisados, sendo a reação periovular bem menos acentuada do que aquela observada no fígado e intestino. O presente trabalho constatou a presença de granulomas periovulares no baço (figura 21), sendo estes encontrados na maioria dos animais dos diferentes grupos experimentais (tabela 1).

A esquistossomose pulmonar é uma decorrência da forma hepatoesplênica, com a passagem de ovos do parasito, para a veia cava superior e seguida do episódio de embolização pulmonar, onde os ovos do parasito se alojam nos capilares pré-alveolares, onde se formam os granulomas (BARBOSA, H. F. 2013). A análise histológica do pulmão mostra a presença de granulomas pulmonares (figura

21) em todos os grupos experimentais. Porém, o grupo SM+HDZ apresentou um número maior de granulomas pulmonares. Ao analisar pulmões de camundongos Swiss, em diferentes períodos de infecção, Lenzi (1991) observou granulomas pulmonares somente a partir de cinquenta dias de infecção, sendo sempre do tipo exsudativo, rico em eosinófilos e monócitos/macrófagos. Os achados de Lenzi corroboram com as análises histológicas pulmonares realizadas neste trabalho. O fato do maior número de animais com granulomas nos pulmões ser do grupo SM+HDZ sugere que a hidralazina interfere na migração para o pulmão, porém faz-se necessário a realização da contagem de granulomas no tecido para chegarmos a uma conclusão concreta.

Concluindo, é sabido que a reação granulomatosa decorrente da presença de ovos no tecido hepático é importante não apenas por formar uma barreira entre o ovo e o tecido, mas também por sequestrar os produtos antigênicos secretados pelo ovo. Isso é de vital importância, particularmente no fígado, devido à hepatotoxicidade associados aos antígenos de ovos. No entanto, a ativação constante do sistema imunológico ao longo do tempo, em particular ativação de respostas imune do tipo 2, resulta em excessiva “cicatrização da lesão” que invariavelmente leva ao desenvolvimento de lesões fibróticas no local dos granulomas, comprometendo o funcionamento do fígado. Segundo Hams e colaboradores (2013) embora a inflamação e evolução do granuloma para uma lesão fibrótica possa causar danos, como hipertensão portal, a ausência de resposta granulomatosa resulta em uma doença mais aguda e letal. Neste sentido, a HDZ parece desempenhar um papel significativo no processo de cicatrização dos granulomas esquistossomóticos acelerando este processo e diminuindo as áreas de lesão tecidual.

## 7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir dos resultados obtidos conclui-se que:

- a) a HDZ não possui ação esquistossomicida, uma vez que quando administrada isoladamente não inibe a postura de ovos, não havendo diminuição no número de granulomas, indicando infecção ativa.
- b) a associação da HDZ ao tratamento com PZQ não interferiu na ação deste.
- c) a HDZ leva a um aumento da formação de granulomas classificados como organizados.
- d) a HDZ induz uma maior formação de colágeno nos granulomas esquistossomóticos.
- e) acredita-se que a HDZ leva a um processo involutivo precoce dos granulomas, uma vez que o tratamento leva a diminuição da área, volume e diâmetro médio dos granulomas.
- f) a HDZ induz um aumento neoformação de vasos arteriais.

## REFERÊNCIAS

- ALVES, C. A. P. et al. Hepatic artery hypertrophy and sinusoidal hypertension in advanced schistosomiasis. **Gastroenterology**, v.72, p. 126-128, 1977.
- AMARAL, K. B. et al. Histological assessment of granulomas in natural and experimental *Schistosoma mansoni* infections using whole slide imaging. **Plos One**, v. 12, n. 9, p. 1-20, 2017.
- AMARAL, K. B. et al. A infecção natural pelo *Schistosoma mansoni* no reservatório silvestre *Nectomys squamipes* leva ao acúmulo excessivo de gotículas lipídicas nos hepatócitos, na ausência de comprometimento funcional do fígado. **Plos One**, v.11 n.11, 2016.
- ANDRADE, G. et al. Decline in infection-related morbidities following drug-mediated reductions in the intensity of *Schistosoma* infection: A systematic review and meta-analysis. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 2, p. 53-72, Fev., 2017.
- ANDRADE, L. O.; ANDREWS, N. W. Lysosomal fusion is essential for the retention of *Trypanosoma cruzi* inside host cells. **The Journal of experimental medicine**, v. 200, n. 9, p. 1135-1143, Nov. 2004.
- ANDRADE, Z. A.; BAPTISTA, A. P. Remodeling of hepatic vascular changes after specific chemotherapy of schistosomal periportal fibrosis. **MEM. INST. OSWALDO CRUZ**, Rio de Janeiro, v. 101, p. 267-272, 2006.
- ANDRADE, Z. A.; CHEEVER, A. W. Alterations of the intrahepatic vasculature in hepatosplenic *Schistosoma mansoni*. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 20, p. 425-432, 1971.
- ANDRADE, Z. A. A Patologia da esquistossomose humana. In: **Schistosoma mansoni e Esquistossomose: uma visão multidisciplinar**. 20. ed. Rio de Janeiro: Fiocruz. 2008.
- ANDRADE, Z. A.; BAPTISTA, A. P.; SANTANA, T. S. Remodeling of hepatic vascular changes after specific chemotherapy of schistosomal periportal fibrosis. **MEMÓRIAS DO INSTITUTO OSWALDO CRUZ**, Rio de Janeiro, v. 101, n. 1, p. 267-272, 2006.
- ANDRADE, Z. A.; GUERRET, S.; FERNANDES, A. L. M. Myofibroblasts in schistosomal portal fibrosis. **MEMÓRIAS DO INSTITUTO OSWALDO CRUZ**, Rio de Janeiro, v.94, p. 87-93, 1999.
- ANDRADE, Z. A. Schistosomiasis and liver fibrosis. **Parasite Immunology**, v. 31, n. 11, p. 656–663, 2009.
- ARAUJO, M. I. et al. Impaired T helper 2 response to aeroallergen in helminth-infected patients with asthma. **The Journal of Infectious Diseases**, v.190, n.10, p.1797-1803, 2004.

ARAÚJO, N. et al, Association of oxamniquine praziquantel and clonazepam in experimental *Schistosomiasis mansoni*. **MEMÓRIAS DO INSTITUTO OSWALDO CRUZ**, Rio de Janeiro, v. 103, n. 8, p. 781-785, 2008.

BARBOSA, H. F. **Avaliação da fibrose periportal da esquistossomose mansônica, em área de média e alta endemicidade no estado de Minas Gerais, utilizando o método qualitativo das pranchas propostas pela Organização Mundial de Saúde**. Tese (Doutorado): Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, 2013.

BATALLER, R.; BRENNE, D. A. Fibrose hepática. **J. Clin. Invest**, v.115, p. 209-218, 2005.

BERGQUIST, R.; UTZINGER, J.; KEISER, J. Controlling schistosomiasis with praziquantel: How much longer without a viable alternative? **Infectious Diseases of Poverty**, v. 6, n. 1, p. 74, Dez. 2017.

BHATNAGAR, R. S. et al. Hydralazine-induced disturbances in collagen biosynthesis. **Laboratory of Connective Tissue Biochemistry**, San Francisco, 1972.

BONESSO-SABADINI, P. I. P.; DE SOUZA D. L. C.; DIAS, L. C. S. Altered response of strain of *Schistosoma mansoni* to oxamniquine and praziquantel. **MEMÓRIAS DO INSTITUTO OSWALDO CRUZ**, Rio de Janeiro, v. 97, n. 3, p. 381-5, 2002.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Guia de vigilância epidemiológica**. 6. ed., Brasília, 2008.

BRASIL. Situação epidemiológica da esquistossomose no Brasil. **Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde**. Brasília, 2018, p. 18. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/porta>, 2010. Acesso em 16 maio 2018.

BUGSSA, G. A Survey of intestinal parasitic infections among Dega Ochollo Primary School Children, Ochollo, South Ethiopia. **Science Journal of Public Health**, v. 3, n. 1, p. 56, 2015.

BURKE, M. L. et al. Immunopathogenesis of human schistosomiasis. **Parasite Immunology**, v. 31, n. 4, p. 163–176, 2009.

CALIXTO, N. M. et al. In silico repositioning of approved drugs against *Schistosoma mansoni* energy metabolism targets. **Plos One**, v. 13, n. 12, Dez. 2018.

CAMPANA, E. M. et al. Interações e associações medicamentosas no tratamento da hipertensão – Bloqueadores alfa-adrenérgicos e vasodilatadores diretos. Universidade do Estado do Rio de Janeiro: **Rev. Bras. Hipertens** v. 16, n.4, p. 231-236, 2009.

CAMPOS, R. et al., Tratamento da esquistossomose mansônica por meio da associação de oxamniquine com praziquatel. II - Observações experimentais

relativas à fase patente. **Rev. Hosp. Clin. Fac. Med.**, São Paulo, v. 44, n. 3, p. 111-14, 1989.

CARVALHO, E. M.; ANDRADE, Z. A. Imunopatologia da Esquistossomose. In: COURA, J. R. **Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias**. 1. ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005.

CHONG, C. R. et al. Inhibition of angiogenesis by the antifungal drug itraconazole. **ACS Chemical Biology**, v.2, n.4, p. 263-270, 2007.

COLLEY, D. G. et al. Human schistosomiasis. **Lancet**, v. 383, n. 9936, p. 2253-2264, 2014.

COLLEY, D. G. Schistosomal egg antigen-induced lymphocyte blastogenesis in experimental murine *Schistosoma mansoni* infection. **The Journal of Immunology**, v. 107, p. 1.477-1.480, 1971.

COSTA-SILVA M, R. et al. Infecção natural pelo *Schistosoma mansoni* em *Nectomys squamipes*: análise histopatológica e morfométrica em comparação ao *N* experimentalmente infectado *squamipes* e camundongos C3H/He. **MEM. INST. OSWALDO CRUZ**, Rio de Janeiro, v.97, n.1, p. 129-42, 2002.

CREASEY, A. M.; TAYLOR, P.; THOMAS, J. E. P. Dosage trial of a combination of oxamniquine and praziquantel in the treatment of schistosomiasis in Zimbabwean schoolchildren. **The Central African Journal of Medicine**, v.32, p.165-167, 1986.

CRELLEN, T. et al. Reduced efficacy of praziquantel against *Schistosoma mansoni* is associated with multiple rounds of mass drug administration. **Clinical Infectious Diseases**, 2016.

COUTO, J. L. A. et al. Esquistossomose murina associada à desnutrição: alterações histopatológicas no fígado, baço e jejuno. **Revista de patologia tropical**, 2007.

DAVIS, G. M. Evolution of prosobranch snails transmitting Asian *Schistosoma*; coevolution with *Schistosoma*: a review. **Progress in clinical parasitology**, v. 3, p. 145-204, 1993.

DE MELO, A. L.; COELHO, P. M. Z. *Schistosoma mansoni* e a Doença. **Parasitologia Humana**. 11. ed., São Paulo: Atheneu, 2005.

DIAS, M. V. et al. Doxycycline hyclate: A schistosomicidal agent in vitro with immunomodulatory potential on granulomatous inflammation in vivo. **International Immunopharmacology**, 2019.

DOLLERY, C. T. Praziquantel. **Therapeutic Drugs**. 2. ed. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1999.

EI-FALAM, M, H. et al. Treatment of *Schistosoma mansoni* with milefosine in vitro enchanges serological recognition of defined worn surface antigens. **Plos Neglected Tropical Disease**, v. 11, n.8, 2017.

ELLERSHAW, D. C.; GURNEY, A. M. Mechanisms of hydralazine induced vasodilation in rabbit aorta and pulmonary artery. **Br. J. Pharmacol.** v.134, n.3, p.621-631, 2001.

FALLON, P. G.; DOENHOFF, M. J. Drug-resistant schistosomiasis: resistance to praziquantel and oxamniquine induced in *Schistosoma mansoni* in mice is drug specific. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 51, n. 1, p. 83-8, 1994.

FERRARI, T. C. A. Spinal cord schistosomiasis: a report of 2 cases and review emphasizing clinical aspects. **Medicine**, v. 78, p. 176-190, 1999.

FLORES-VILLANUEVA, P. O. et al. Role of IL-10 on antigen-presenting cell function for schistosomal egg specific monoclonal T helper cell responses in vitro and in vivo. **Journal of Immunology**, v.151, n. 3, p.192-198, 1993.

FRANCO, A.; LOCKSLEY, R.; ANDROBERTSON, M. Immunity: The Immune Response in Infectious and Inflammatory Disease. Northants. **UK: New Sciences**, 2007.

FREEDMAN, D. O.; OTTESEN, E. A. Eggs of *Schistosoma mansoni* stimulate endothelial cell proliferation in vitro. **The Journal of Infectious Diseases**, v.158, p. 556-562, 1988.

FREITAS, V. Anatomia – Conceitos e Fundamentos. **Artmed**, São Paulo, 2004.

GALINIER, R. et al. First characterization of viruses from freshwater snails of the genus *Biomphalaria*, the intermediate host of the parasite *Schistosoma mansoni*. **Acta Tropica**, v. 167, p. 196-203, 2017.

GOMES, E.; DIAS, L. C. S.; TAKAKU, L. S. G. Biological and morphological characteristics of *Schistosoma mansoni* from the Paranapanema Valley Ourinhos. In: IV International Symposium on Schistosomiasis, 51, 1993, São Paulo, **Anais**, São Paulo, p. 51, 1993.

GRYSEELS, B. Schistosomiasis. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 26, n. 2, p. 383–397, 2012.

GRYSEELS, B. et al. Esquistossomose humana. **Lanceta**, v. 368, n. 9541, p. 1106-1118, 2006.

GUIMARÃES, R. J. P. S. et al. Use of indicator kriging to investigate schistosomiasis in Minas Gerais state, Brazil. **Journal of tropical medicine**, v. 2012, n. 837428, 2012.

HAMS, E. et al. The *Schistosoma* granuloma: friend or foe. **Friends in immunology**, v.4, p.89, 2013.

- HARVIE, M. C. G. et al. Live imaging of collagen deposition during experimental hepatic schistosomiasis and recovery: a view on a dynamic process. **United States & Canadian Academy of Pathology**, 2018.
- HERLIHY, B.; MAEBIUS, N. K. Anatomia e Fisiologia do Corpo Humano Saudável e Enfermo. 1ed. São Paulo: **Manole**, 2002.
- HURST, M. H.; WILLINGHAM, A. L.; LINDBERG, R. Tissue responses in experimental schistosomiasis japonica in the pig: a histopathologic study of different stages of single low – or high- dose infections. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. v.24, p.151-159, 2000.
- JESUS, A. R. et al. Clinical and immunologic evaluation of 31 patients with acute *Schistosomiasis mansoni*. **Journal of Infectious Diseases**, v. 185, p. 98-105, 2002.
- KARNA, E.; SZOKA, L.; PALKA, J. A. The mechanism of hydralazine-induced collagen biosynthesis in cultured fibroblasts. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v.386, n.4, p.303–309, 2013.
- KATZ, N. et al. Efficacy of alternating therapy with oxamniquine and praziquantel to treat *Schistosoma mansoni* in children following failure of first treatment. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 44, n. 5, p. 509–12, 1991.
- KATZ, N.; COELHO, P. M. Z. Clinical therapy of schistosomiasis mansoni: the Brazilian contribution. **Acta tropica**, v. 108, n. 2–3, p. 72-78, 2008.
- KING, C. H.; DICKMAN, K.; TISCH, D. J. Reassessment of the cost of chronic helminthic infection: a meta-analysis of disability-related outcomes in endemic schistosomiasis. **Lancet**, v. 365, n. 9470, p. 1561–9, 2005.
- KNOWLES, H. J. et al. Novel Mechanism of Action for Hydralazine: induction of hypoxia-inducible factor-1, vascular endothelial growth factor, and angiogenesis by inhibition of prolyl hydroxylases. **American Heart Association**, v. 95, p.162-169, 2004.
- LAMBERTUCCI, J. R. Acute *Schistosomiasis mansoni*: revisited and reconsidered. **MEMÓRIAS DO INSTITUTO OSWALDO CRUZ**, Rio de Janeiro, v. 105, n. 4, p. 422–35, jul. 2010.
- LENZI, H. L. et al. Extracellular matrix in parasitic and infectious diseases. **MEMÓRIAS DO INSTITUTO OSWALDO CRUZ**, Rio de Janeiro, 1991.
- LENZI, H. L. et al. Histoarchitecture of schistosomal granuloma development and involution: morphogenetic and biomechanical approaches. **MEMÓRIAS DO INSTITUTO OSWALDO CRUZ**, Rio de Janeiro, v.93, p.141-151, 1998.
- LENZI, H. L. ***Schistosoma mansoni* e Esquistossomose: uma visão multidisciplinar**. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 2008

LENZI, H. L.; SOBRAL, A. C. L.; LENZI, J. A. Participation of endothelial cells in murine schistosomiasis. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 21, p. 999-1003, 1988.

LIU, Y. X.; et al. New Uses for Old Drugs: The Tale of Artemisinin Derivatives in the Elimination of Schistosomiasis Japonica in China. **Molecules**, v. 19, n. 9, p. 15058-15074, 2014.

LINS, R. A. B. et al. Distribution of eosinophils at different stages of hepatic granuloma evolution in mice infected with *Schistosoma mansoni*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, n. 2, p. 173-178, 2008.

LOEFFLER, D. A. et al. Soluble egg antigens from *Schistosoma mansoni* induce angiogenesis-related processes by up-regulating vascular endothelial growth factor in human endothelial cells. **J. Infect Dis**, v.185, p. 1650-1656, 2002.

LOMBARDINO, J. G.; LOWE, J. A. The role of the medicinal chemist in drug discovery-- then and now. **Nature Reviews. Drug Discovery**, v. 3, n. 10, p.853–862, 2004.

MANDARIM-DE-LACERDA, C. A., FERNANDES-SANTOS, C.; AGUILA, M. B. Image analysis and quantitative morphology. In Histology Protocols: Methods in Molecular Biology, Hewitson T.D. and Darby J.A. **New Jersey: Humana Press**, v.1, p.211-225, 2010.

MEILMAN, E. et al. The effect of hydralazine (apresoline) in the synthesis of collagens in carrageenine granulomas, **Arthritis Rheum**, v. 8, p. 69-75, 1965.

MELO, A. L.; COELHO, P. M. Z. *Schistosoma mansoni* e a doença. In: **NEVES, D. P. Parasitologia Humana**. 11. ed.: Atheneu, Rio de Janeiro, 2010.

MENDONÇA, A. M. B. et al. The susceptibility of recent isolates of *Schistosoma mansoni* to praziquantel. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 58, 2016.

MONTES, G. S.; JUNQUEIRA, L. C. U. The use of the Picrosirius-polarization method for the study of the biopathology of collagen. **MEMORIAS DO INSTITUTO OSWALDO CRUZ**, Rio de Janeiro, v. 86, n. 3, p. 1-11, 1991.

MUHLFELD, C.; PAPADAKIS, T.; KRASTEVA, G. et al. An unbiased stereological method for efficiently quantifying the innervation of the heart and other organs based on total length estimations, **J. Appl Physiol**, v. 108, p.1402–1409, 2010.

BRASIL – Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde – **Vigilância da Esquistossomose Mansonii, Diretrizes Técnicas**, 4ª Edição, 2014.

NEVES, B. J. et al. In Silico Repositioning-Chemogenomics Strategy Identifies New Drugs with Potential Activity against Multiple Life Stages of *Schistosoma mansoni*. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 1, p. 3435, 2015.

NEVES, R. H. et al. A new description of the reproductive system of *Schistosoma mansoni* (Trematoda: Schistosomatidae) analyzed by confocal laser scanning microscopy. **Parasitology Research**, v. 95, p. 43-49, 2005.

NOVAES, R. D. et al. Time-dependent resolution of collagen deposition during skin repair in rats: a correlative morphological and biochemical study. **Microsc. Microanal**, v.21, p. 1482-1490, 2015.

NYOLCZAS, N. et al. Combination of Hydralazine and Isosorbide-Dinitrate in the Treatment of Patients with Heart Failure with Reduced Ejection Fraction. Hungary: **Springer International Publishing**, v.1, 2017.

PELLEGRINO, J.; KATZ, N. Experimental Chemotherapy of *Schistosoma mansoni*. **Advances in Parasitology**, v. 6, p. 233-291, 1968.

PEREIRA, T. A. et al. Osteopontin Is Upregulated in Human and Murine Acute Schistosomiasis Mansoni. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 10, p.18, 2016.

RAMARDUC, O. et al. Hepatocellular hypoxia-induced vascular endothelial growth factor expression and angiogenesis in experimental biliary cirrhosis. **Am.J. Pathol.** v.155, p. 1065-1073, 2003.

RASO, P.; BOGLIOLO, L. Patologia. In **CUNHA, A. S. (Ed.) Esquistossomose Mansônica**. 1. ed., São Paulo: Sarvier Edusp, 1970.

REY, L. **Bases da Parasitologia Médica**. 13. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2016.

RICHTER, J. et al. Severe liver fibrosis caused by *Schistosoma mansoni*: management and treatment with a transjugular intrahepatic portosystemic shunt. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 15, n. 6, p. 731–737, 2015.

RODRIGUES, J. P. F. et al. *S. mansoni-T. cruzi* co-infection modulates arginase-1/iNOS expression, liver and heart disease in mice. **Nitric Oxide**, v. 66, p. 43-52, 2017.

ROSS, A. G. et al. Schistosomiasis. **N Engl J Med**, v.346, n. 16, p. 1212-20, 2002.

SAEED, M. E. M.; et al. Antischistosomal activity of artemisinin derivatives in vivo and in patients. **Pharmacological Research**, v. 110, p. 216–226, 2016.

SECOR, W. E. et al. Schistosomiasis and its treatment. **Future Medicinal Chemistry**, v. 7, n. 6, p. 681-684, 2015.

SHAW, J. R.; BRAMMER, K. W. The treatment of experimental schistosomiasis with a combination of oxamniquine and praziquantel. **Transactions of the royal society of tropical medicine and hygiene**, v. 77, n. 1, 1983.

SILVA, V. A.; MIRANDA, J. S.; BRITO, M. V. H. Técnica para preparo angioarquitetônico hepático de ratos. **Acta Cir Bras**, v.15, n.3, 2003.

TAMIMI, N.; ELLIS, P.; Drug development: from concept to marketing! **Nephron. Clinical practice**, v. 113, n. 3, p.125–31, 2009.

THEISE, N. D. Células-tronco do fígado: a queda e a ascensão da biologia tecidual **Hepatology**, v. 38, p. 804-806; 2003.

VALE, N. et al. Praziquantel for schistosomiasis: Single-drug metabolism revisited, mode of action, and resistance. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 61, n. 5, p.16, 2017.

WEGLARZ, L. et al. Antioxidant enzymatic activity in culture of fibroblasts in vitro in the presence of hydralazine. **Biomed Biochim Acta**, v. 48, n. 8, p. 489-493, 1989.

WHO. Schistosomiasis, Geneva, 2014. Disponível em: <http://www.who.int/schistosomiasis/en/>. Acesso em: 20 de julho 2017.

WYNN, T. A.; CHEEVER, A. W. Cytokine regulation of granuloma formation in schistosomiasis. **Current Opinion in Immunology**, v. 7, p. 505-511, 1995.

WARREN, K. S. The pathogenesis of “clay-pipe stem cirrhosis” in mice with chronic *Schistosoma mansoni*, with a note on the longevity of the schistosomes. **Am. J. Pathol.**, v. 49, p. 477-489, 1966.

ZILTON, A. A.; BAPTISTA, A. P.; SANTANA, T. S. Remodeling of hepatic vascular changes after specific chemotherapy of schistosomal periportal fibrosis. **MEM. INST. OSWALDO CRUZ**, Rio de Janeiro, v. 101, p. 267-272, 2006.

GÖNNERT, R.; ANDREWS, P. Praziquantel, a new broad-spectrum antischistosomal agent. **Zeitschrift für Parasitenkunde**, v. 52, p. 129-150, 1977.

WARREN, K. S. Pathophysiology and pathogenesis of hepatosplenic *Schistosomiasis mansoni*. **Bulletin of the New York Academy of Medicine**, v. 44, p. 280-294, 1968.