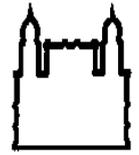




UFBA

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO GONÇALO MONIZ**



FIOCRUZ

Curso de Pós-Graduação em Patologia

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**PARTICIPAÇÃO DE CÉLULAS ENDOTELIAIS NA PROTEÇÃO DO VERME
ADULTO DO *Schistosoma mansoni***

BRUNA SOUZA SANTOS OLIVEIRA

**Salvador – Bahia
2020**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO GONÇALO MONIZ**

Curso de Pós-Graduação em Patologia

**PARTICIPAÇÃO DE CÉLULAS ENDOTELIAIS NA PROTEÇÃO DO VERME
ADULTO DO *Schistosoma mansoni***

BRUNA SOUZA SANTOS OLIVEIRA

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Riccio Oliveira
Coorientadora: Prof. Dra. Thassila N. Pitanga

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Patologia Experimental para a obtenção do grau de Mestre.

**Salvador – Bahia
2020**

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca do
Instituto Gonçalo Moniz / FIOCRUZ - Salvador - Bahia.

O48p Oliveira, Bruna Souza Santos.
Participação de células endoteliais na proteção do verme adulto do
Schistosoma mansoni. / Bruna Souza Santos Oliveira. - 2020.
55 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Riccio Oliveira, Laboratório de Patologia
Experimental.

Dissertação (Mestrado em Patologia) – Universidade Federal da Bahia.
Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, 2020.

1. *Schistosoma mansoni*. 2. Células Endoteliais da Veia Umbilical
Humana. 3. Praziquantel. 4. Estresse oxidativo. I. Título.

CDU 616.995.122

**“PARTICIPAÇÃO DE CÉLULAS ENDOTELIAIS NA PROTEÇÃO DO VERME ADULTO DO
Schistosoma mansoni”.**

Bruna Souza Santos Oliveira

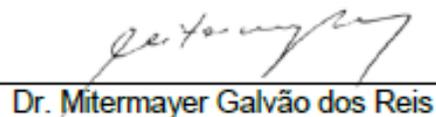
FOLHA DE APROVAÇÃO

Salvador, 10 de junho de 2020.

COMISSÃO EXAMINADORA


Dra. Valéria de Matos Borges

Pesquisadora
IGM/FIOCRUZ


Dr. Mitermayer Galvão dos Reis

Pesquisador
FIOCRUZ



Dr. Ricardo Riccio Oliveira

Pesquisador
FIOCRUZ

FONTES DE FINANCIAMENTO

“O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001”

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq
Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia – FAPESB

AGRADECIMENTOS

Primeiramente quero agradecer a Deus por todas as coisas, todo o caminho que me fez chegar até aqui. Para Ele são todas as coisas! Gostaria de agradecer também aos meus pais, Rarilton e Roseney, que durante toda a minha caminhada investiram e acreditaram em mim, à minha irmã Rebeca Oliveira pela companhia e amizade eterna.

Aos meus amigos e família, minha gratidão por poder contar com vocês nos momentos alegres e tristes, pelas conversas, desabafos, por cada oração, torcida e cada troca de experiências. Vocês são parte do que me tornei hoje. E não me torno somente mestre, me torno também mais madura e mais confiante.

Minha gratidão também ao meu orientador, Dr. Ricardo Riccio pela oportunidade, ensinamentos, credibilidade e paciência. Trabalhar com você me tornou mais humana.

À equipe do LIGHT, em especial à Dra. Marilda Gonçalves pela colaboração, por ceder a linhagem de HUVEC utilizada nesse trabalho. À minha coorientadora Dra. Thassila Pitanga por ter sido essencial nas discussões e realização deste trabalho. Agradeço também ao Dr. Sânzio Silva e sua aluna, Jamile Vieira, por serem sempre muito prestativos. Agradeço também à Dra. Dalila Luciola pela atenção e colaboração durante a realização das reações de qPCR. À Dra. Lângia Colli Montresor, do Instituto René Rachou, pela colaboração na retomada do ciclo do *Schistosoma mansoni* no IGM.

Quero agradecer à equipe do LAPEC pelo auxílio e apoio sempre que necessário. Quero agradecer a toda equipe do LAPEX, em especial aos membros da equipe, Yuri Tabajara, Michael Nascimento, Ane Caroline Casaes, Kelvin Edson, Thainá Fialho, Talia Melo e Camilla Almeida, pela colaboração sempre que necessária. Às estudantes, Andressa Lima, Juliana Dória, Thaís Santos e Jade Moraes, vocês foram essenciais. À Secretária do LAPEX, Valdenice de Oliveira, pela ajuda sempre que solicitada. À Biblioteca do IGM pelo cuidado e orientações na correção desse trabalho.

Aos amigos que fiz durante o mestrado, em especial a Ronald Alves, que não recusa trabalho e tem um coração enorme. Muito obrigada por toda a ajuda durante os experimentos. E à Breno Cardim, minha dupla durante a macrodisciplina, amigo fiel, sempre disposto a ajudar. Você tornou as coisas mais leves. Muito obrigada!

OLIVEIRA, Bruna Souza Santos. Participação de células endoteliais na proteção do verme adulto do *Schistosoma mansoni*. 2020. 55 f. Dissertação (Mestrado em Patologia) – Universidade Federal da Bahia. Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2020.

RESUMO

INTRODUÇÃO: A esquistossomose é uma doença parasitária considerada um problema de saúde prevalente em países tropicais em desenvolvimento, sendo o Praziquantel (PZQ) a droga de primeira escolha para o tratamento. O verme adulto do *S. mansoni* reside no lúmen vascular, apesar disso pouco se sabe sobre a interação das células endoteliais com o verme adulto e a participação dessas células durante a progressão ou proteção na infecção. Além disso, ainda não foi avaliada a expressão de genes antioxidantes por essas células durante a esquistossomose e após o tratamento. **OBJETIVO:** Avaliar a expressão de genes antioxidantes em células HUVEC cultivadas com vermes adultos de *S. mansoni* e expostas ao tratamento, bem como a capacidade de sobrevivência de vermes cultivados com HUVEC e expostas a agentes oxidantes. **METODOLOGIA:** Os nomes dos genes, enzimas e substratos utilizados nesse trabalho foram apresentados de forma codificada para manter sigilo por se tratar de informação sensível para inovação. Células HUVEC foram cultivadas e desafiadas com vermes adultos do *S. mansoni* e submetidas ao tratamento com PZQ nos tempos de 1, 3 e 6 horas. Após o desafio, foi realizada a extração de RNA utilizando trizol. Em seguida, foi realizada a reação de qPCR de genes antioxidantes. Para avaliar a capacidade de sobrevivência dos vermes adultos frente ao estresse oxidativo, foi realizado o cultivo de vermes adultos com o agente oxidante OX e vermes adultos com OX na presença de HUVEC. Os vermes foram avaliados por microscopia óptica. **RESULTADOS:** Células HUVEC apresentaram aumento na expressão dos genes antioxidantes α OX-A e α OX-B quando desafiadas apenas com o PZQ. Além disso, foi interessante notar que os vermes adultos não foram capazes de induzir ou suprimir os genes antioxidantes avaliados, com exceção do α OX-E, o qual teve sua expressão aumentada significativamente em células HUVEC após 6 horas de exposição a um casal de verme adulto. Quando avaliada a capacidade de sobrevivência, os vermes adultos cultivados com células HUVEC e desafiadas com OX apresentaram maior percentual de sobrevivência e resistiram a maiores concentrações de OX quando comparados a vermes adultos desafiados com OX sem a presença das HUVEC. Foi adicionado à cultura de vermes adultos a proteína antioxidante α OX-E juntamente com o agente oxidante OX, sendo demonstrando aumento da sobrevivência dos vermes também nessa condição mesmo em altas concentrações de OX. Assim, vermes adultos cultivados com células HUVEC se comportam semelhante à cultura dos vermes em que a α OX-E foi adicionada. **CONCLUSÃO:** O verme adulto de *S. mansoni* parece induzir as células HUVEC a expressarem mais α OX-E, molécula que está envolvida no controle do estresse oxidativo. Tornando dessa forma, um ambiente propício à sua sobrevivência. Essa informação pode auxiliar novas abordagens de tratamentos adjuvantes ao PZQ.

PALAVRAS CHAVE: *Schistosoma mansoni*; HUVEC; Praziquantel; Estresse oxidativo

OLIVEIRA, Bruna Souza Santos. Participation of endothelial cells in the protection of the adult worm of *Schistosoma mansoni*. 2020. 55 f. Dissertação (Mestrado em Patologia) – Universidade Federal da Bahia. Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2020.

ABSTRACT

INTRODUCTION: Schistosomiasis is a parasitic disease considered a prevalent health problem in tropical developing countries, and the Praziquantel (PZQ) is the drug of choice for treatment. The adult worm of *S. mansoni* resides in the vascular lumen, although little is known about the interaction of endothelial cells with the adult worm and the participation of these cells during progression or protection from infection. In addition, the expression of antioxidant genes by these cells has not yet been evaluated during schistosomiasis and after treatment. **AIM:** To evaluate the expression of antioxidant genes in HUVEC cells grown with adult *S. mansoni* worms and exposed to treatment, as well as the survival capacity of worms with HUVEC and exposed to oxidizing agents. **METHODOLOGY:** The names of the genes, enzymes and substrates used in this work were presented in a coded form to keep confidentiality because it is sensitive information for innovation. HUVEC cells were cultured and challenged with adult *S. mansoni* worms and subjected to PZQ treatment at 1, 3 and 6 hours. After the challenge, RNA extraction was performed using trizol. Then, the qPCR reaction of antioxidant genes was performed. To evaluate the adult worms ability to survive oxidative stress, adult worms were cultivated with the oxidizing agent OX and adult worms with OX in the presence of HUVEC. The worms were evaluated by optical microscopy. **RESULTS:** HUVEC cells showed increased expression of the antioxidant genes α OX-A and α OX-B when challenged only with PZQ. In addition, it was interesting to note that adult worms were not able to induce or suppress the antioxidant genes evaluated, with the exception of α OX-E, which had its expression significantly increased in HUVEC cells after 6 hours of exposure to an adult worm couple. When the survival capacity was evaluated, adult worms grown with HUVEC cells and challenged with OX showed a higher percentage of survival and resisted higher concentrations of OX when compared to adult worms challenged with OX without the presence of HUVEC. The antioxidant protein α OX-E was added to the culture of adult worms together with the oxidizing agent OX, demonstrating an increased survival of worms in this condition even in high concentrations of OX. Thus, adult worms grown with HUVEC cells behave similarly to the culture of the worms in which α OX-E was added. **CONCLUSION:** The adult *S. mansoni* worm seems to induce HUVEC cells to express more α OX-E, a molecule that is involved in the control of oxidative stress. Thus making it an environment conducive to their survival. This information can help new approaches to adjuvant treatments to PZQ.

KEY WORDS: *Schistosoma mansoni*, HUVEC, Praziquantel, Oxidative stress.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Distribuição da esquistossomose no mundo no ano de 2012 (MCMANUS et al., 2018).	15
Figura 2. Distribuição da prevalência da esquistossomose no Brasil. (KATZ, 2018)	16
Figura 3. Visão geral da via do Keap1-Nrf2-ARE. O estresse oxidativo faz com que o Nrf2 se dissocie do Keap1 e se transloque para o núcleo e se liga ao ARE para induzir a expressão de genes antioxidantes. Figura adaptada (BELLEZZA et al., 2018)	21
Figura 4. Esquema das etapas de manutenção de HUVEC.....	30
Figura 5. Esquema das etapas do plaqueamento de HUVEC.....	31
Figura 6. Esquema de placas utilizado para a realização dos experimentos para a extração de qPCR.	32
Figura 7. Representação dos scores de viabilidade dos vermes.....	35
Figura 8. Análise da expressão relativa de mRNA para o gene α Ox-A em HUVEC.	38
Figura 10. Análise da expressão relativa de mRNA para o gene α Ox-C em HUVEC.	39
Figura 11. Análise da expressão relativa de mRNA para o gene α Ox-D em HUVEC.	39
Figura 12. Análise da expressão relativa de mRNA para o gene α Ox-E em HUVEC.	40
Figura 13. Análise da frequência dos scores de viabilidade de vermes de <i>S. mansoni</i> desafiados com OX.	42
Figura 14. Análise da frequência de sobrevivência dos vermes de <i>S. mansoni</i> desafiados com OX e de vermes cultivados com células HUVEC expostos a OX.....	43
Figura 15. Curva de sobrevivência dos vermes de <i>S. mansoni</i> desafiados com OX, de vermes adultos expostos a OX e adição da α OX-E e de vermes cultivados com células HUVEC expostos com OX.....	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Descrição do estado de sobrevivência dos vermes por score.	34
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADCC	Citotoxicidade mediada por células dependente de anticorpos. Do inglês <i>Antibody dependent cellular cytotoxicity</i>
ARE	Elemento de Resposta Antioxidante. Do inglês <i>Responsive Element</i>
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CAT	Catalase
CD4	Grupamento de diferenciação 4. Do inglês <i>cluster of differentiation</i>
cDNA	DNA Complementar
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
Ct	Do inglês <i>Cycle Threshold</i>
DL50	Dose letal média
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra acético. Do inglês <i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>
eNOS	Óxido Nítrico Sintase Endotelial.
EPO	Peroxidase Eosinofílica
FAPESB	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia
GPX	Glutathione Peroxidase
GSH	Glutathione Reduzida
GSR	Glutathione Redutase
HMOX-1	Heme-oxigenase-1
HPRT	Hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase
HUVEC	Células Endoteliais da Veia Umbilical Humana. Do inglês <i>Human Umbilical Vein Endothelial Cells</i>
IgE	Imunoglobulina E
IGM	Instituto Gonçalo Moniz
IL-10	Interleucina 10
IL-13	Interleucina 13
IL-4	Interleucina 4
IL-5	Interleucina 5
Keap1	Do inglês <i>Kelch Like ECH Associated Protein 1</i>

LPS	Lipopolissacarídeo
mRNA	RNA mensageiro. Do inglês <i>Messenger RNA</i>
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo-P
NRF2	Fator 2 relacionado ao fator nuclear E2. Do inglês <i>Nuclear factor erythroid 2-related factor 2</i>
PBS	Tampão fosfato-salino. Do inglês <i>Phosphate Buffered Saline</i>
PZQ	Praziquantel
qPCR	PCR quantitativo em tempo real. Do inglês <i>Reverse transcription polymerase chain reaction quantitative real time</i>
RNA	Ácido Ribonucleico
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio. Do inglês <i>Reactive Oxygen Species</i>
RPMI	Roswell Park Memorial Institute Medium
SEA	Antígeno solúvel do ovo do <i>Schistosoma mansoni</i> . Do inglês <i>Soluble Egg Antigen</i>
SOD1	Superóxido Dismutase 1
Th1	Referente à células T auxiliares 1. Do inglês <i>T helper 1</i>
Th2	Referente à células T auxiliares 2. Do inglês <i>T helper 2</i>
TNF	Fator de Necrose Tumoral. Do inglês <i>Tumor Necrosis Factor</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
1.1	ESQUISTOSSOMOSE.....	14
1.2	MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS E IMUNOPATOGENESE	16
1.3	TRATAMENTO PARA A ESQUISTOSSOMOSE	18
1.4	ESTRESSE OXIDATIVO NA ESQUISTOSSOMOSE	20
1.5	CÉLULAS ENDOTELIAIS NA ESQUISTOSSOMOSE	22
2	JUSTIFICATIVA	25
3	OBJETIVOS	26
3.1	OBJETIVO GERAL	26
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	26
4	METODOLOGIA	27
4.1	MANUTENÇÃO DO CICLO DO <i>S. MANSONI</i>	27
4.2	OBTENÇÃO DE VERMES ADULTOS	28
4.3	MANUTENÇÃO DA CULTURA DE CÉLULAS HUVEC	29
4.4	DESAFIO DE CÉLULAS HUVEC.....	31
4.5	EXPRESSÃO DE GENES ANTIOXIDANTES POR PCR EM TEMPO REAL	32
4.6	AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE SOBREVIVÊNCIA DOS VERMES ADULTOS DE <i>S. MANSONI</i>	33
4.7	ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR (HUVEC)	35
4.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA	36
5	RESULTADOS	37
5.1	EXPRESSÃO DE GENES ANTIOXIDANTES EM CÉLULAS HUVEC DESAFIADAS COM VERME ADULTO DO <i>S. MANSONI</i> E APÓS TRATAMENTO COM O PRAZICUANTEL.....	37
5.2	SOBREVIVÊNCIA DE VERMES ADULTOS DE <i>S. MANSONI</i> APÓS EXPOSIÇÃO AO ESTRESSE OXIDATIVO	40
5.3	PROTEÇÃO DO VERME MEDIADA POR CÉLULAS HUVEC OU AOX-E	43
7	CONCLUSÃO	49
	REFERÊNCIAS	50

1 INTRODUÇÃO

1.1 ESQUISTOSSOMOSE

A esquistossomose é uma doença parasitária considerada um problema de saúde pública presente em países tropicais e subtropicais, relacionada à pobreza e más condições sanitárias. É causada por 6 diferentes espécies de trematódeos do gênero *Schistosoma*: *S. guineensis*, *S. haematobium*, *S. intercalatum*, *S. japonicum*, *S. mekongi* e *S. mansoni* (MCMANUS et al., 2018). No Brasil, a espécie responsável pela infecção é o *Schistosoma mansoni*, sendo o caramujo do gênero *Biomphalaria* seu principal hospedeiro intermediário (PEARCE; MACDONALD, 2002; ROWEL et al., 2015).

O ciclo tem início quando ovos viáveis eclodem na água liberando o miracídio, que infecta o caramujo. Após o desenvolvimento no hospedeiro intermediário, o parasita chega à fase de cercária e é liberado na água. A infecção no indivíduo susceptível ocorre quando a cercária penetra na pele durante o contato com água contaminada. As cercárias perdem a cauda e se tornam esquistossômulos que chegam à corrente sanguínea e migram para a região da veia porta hepática, onde amadurecem até vermes adultos e iniciam a ovoposição no lúmen vascular, local onde os vermes adultos permanecem durante todo o período de infecção. Os ovos liberados migram para o intestino para serem eliminados nas fezes, ou podem alcançar o fígado, onde se alojam e desencadeiam uma resposta imunológica prejudicial ao hospedeiro (PEARCE; MACDONALD, 2002; MCMANUS et al., 2018)

Segundo a Organização Mundial de saúde (OMS), a esquistossomose afeta quase 240 milhões de pessoas em todo o mundo e mais de 700 milhões de pessoas vivem em áreas endêmicas. A maior parte dos casos se concentram no continente africano, todavia também são considerados problemas de saúde pública em países da Ásia e América do Sul (Figura 1) (MCMANUS et al., 2018; WHO, 2020a).

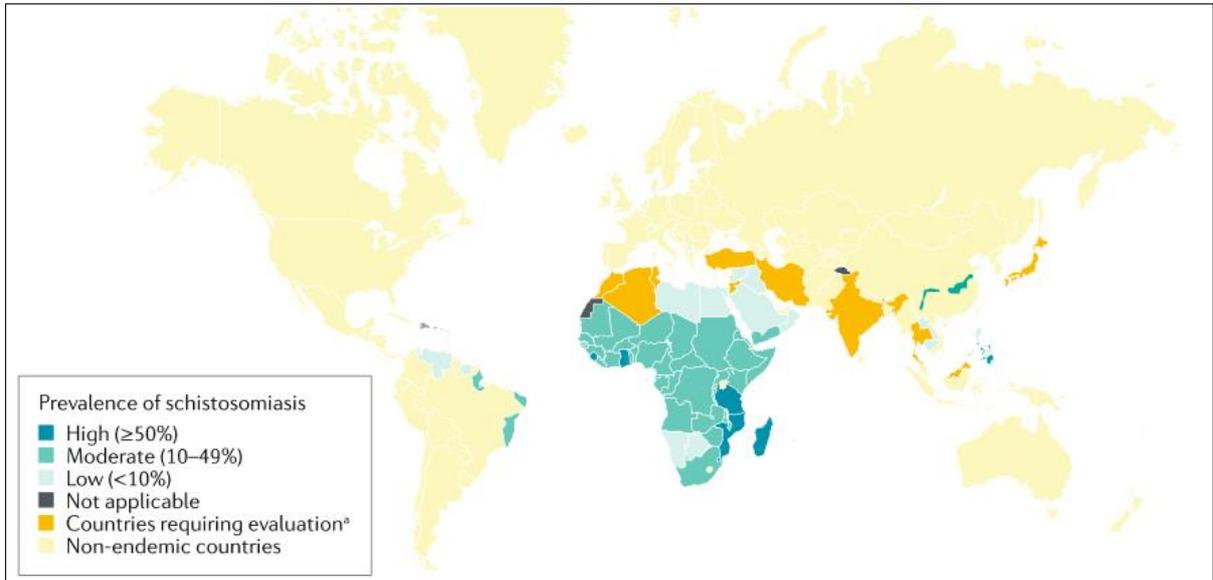


Figura 1. Distribuição da esquistossomose no mundo no ano de 2012 (MCMANUS et al., 2018).

No Brasil, a esquistossomose é frequente nas zonas rurais dos estados do Nordeste e Sudeste, sendo Sergipe, Minas Gerais, Alagoas, Pernambuco e Bahia os estados que apresentam as maiores taxas de prevalência (Figura 2) (BRASIL, 2014; KATZ, 2018).

O Inquérito Nacional da Prevalência da Esquistossomose e Geo-helmintoses (INPEG), publicado no ano de 2018, queria levantar a prevalência da esquistossomose em todo o território nacional, e foram avaliadas as 26 unidades federativas e o Distrito Federal. Entretanto, é de extrema importância considerar a amostragem realizada no INPEG, as cidades avaliadas foram definidas por sorteio, excluindo da análise cidades que poderiam apresentar taxas mais elevadas. O INPEG aponta uma redução na prevalência da esquistossomose no Brasil, e que fatores como a urbanização, melhoria no serviço de abastecimento de água e saneamento básico, além de tratamentos repetidos em massa nas áreas endêmicas, estão associados à redução da prevalência. Entretanto, apesar da importante redução da prevalência geral, ainda existem regiões em que a prevalência é alta e merecem atenção (KATZ, 2018).

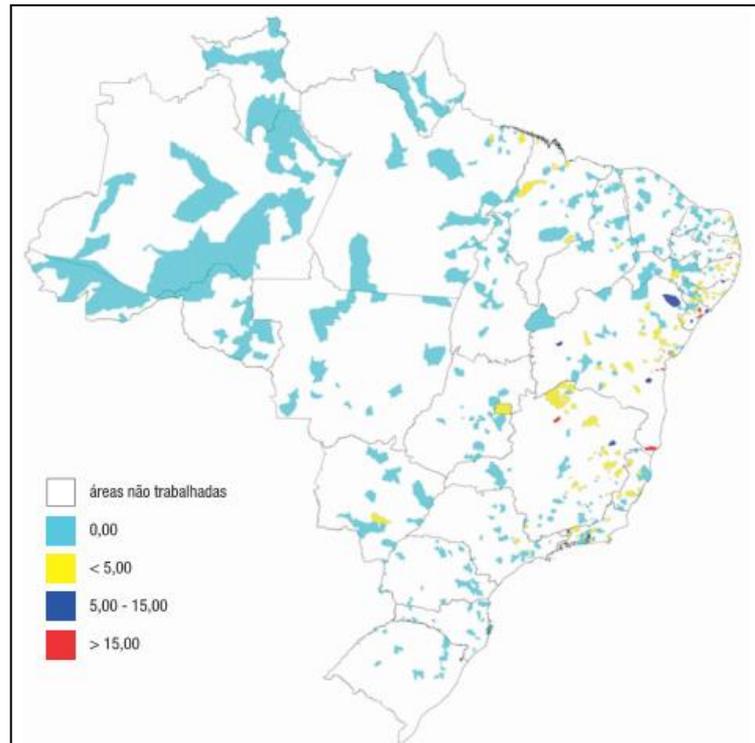


Figura 2. Distribuição da prevalência da esquistossomose no Brasil. (KATZ, 2018)

Uma das principais formas de controle da eliminação da esquistossomose, recomendada pela Organização Mundial de Saúde, consiste no tratamento em massa da população. O Praziquantel tem sido utilizado com sucesso nos últimos 30 anos para controlar a esquistossomose em muitos países (WHO, 2011). Na África Subsaariana, essa estratégia tem mostrado redução na esquistossomose (WANG; WANG; LIANG, 2012). O tratamento em massa com o Praziquantel na China e no Egito também revelaram resultados significativos nos índices de infecção. Além disso, os resultados sugerem que o tratamento repetido durante a infância previne ocorrência de manifestações graves na idade adulta (WHO, 2020b).

1.2 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS E IMUNOPATOGÊNESE

A esquistossomose pode manifestar-se clinicamente logo após a penetração da cercária caracterizando a forma aguda da doença, e após de 6 a 8 semanas da infecção, com aspectos clínicos variados, que representa a forma crônica da doença (MCMANUS et al., 2018). A imunopatogênese da esquistossomose sofre influência

direta dos diferentes estágios do parasito (VERJOVSKI-ALMEIDA et al., 2004; HOKKE; FITZPATRICK; HOFFMANN, 2007).

A esquistossomose aguda é caracterizada por manifestações como a dermatite cercariana e a síndrome toxêmica. A dermatite cercariana é originada a partir da resposta imune inata que desencadeia uma reação de hipersensibilidade em partes do corpo que foram expostas à água contaminada, onde ocorreu a penetração da cercária (MCMANUS et al., 2018). A síndrome toxêmica ocorre entre 2 e 3 semanas após a exposição, em decorrência de reações de hipersensibilidade e formação de complexos imunes com antígenos liberados pelos esquistossomos durante passagem pelos pulmões. Pode ocorrer sintomas como, prostração, febre e também, cerca de um mês depois, dores abdominais e diarreia acompanhada de muco e sangue que coincidem com o começo da eliminação de ovos nas fezes (ANDRADE, 2008). Os sintomas geralmente são acompanhados de eosinofilia e infiltrados pulmonares transitórios (LAMBERTUCCI, 1993; RABELLO et al., 1997; DE JESUS et al., 2002; ROSS et al., 2007). A fase aguda cursa com uma marcante resposta pró-inflamatória, predominando a resposta de células T auxiliares do tipo 1 (Th1) (DE JESUS et al., 2002).

As manifestações agudas normalmente não são observadas em residentes de áreas endêmicas, podendo ser graves e evoluir a óbito em uma exposição acidental. Isso pode ocorrer devido à dessensibilização intrauterina, resultando em menor resposta imunológica a antígenos do *S. mansoni* em bebês nascidos de mães infectadas ou devido à constante reexposição que pode induzir a produção de IL-10 por células T CD4, resultando em uma resposta imune regulatória (KING et al., 1998; SANIN et al., 2015)

Após a ovoposição ocorre a evolução para a forma crônica da doença, podendo manifestar-se na forma intestinal, hepato-intestinal e hepato-esplênica (ANDRADE, 2008). Os principais danos ocorridos durante a fase crônica da esquistossomose são a formação de granuloma e fibrose hepática induzida pelos ovos, que resultam da resposta imune do hospedeiro ao antígeno solúvel do ovo (SEA). A fase crônica tem início com a transição da resposta Th1 para a resposta Th2, que coincide com a ovoposição (COLLEY; SECOR, 2014).

O papel da resposta Th2 na imunopatogênese da esquistossomose ainda não foi totalmente elucidado. Enquanto alguns estudos têm associado a resposta Th2 à resistência adquirida contra a reinfecção com níveis elevados de citocinas Th2,

eosinofilia e níveis aumentados de IgE específicos, outros trabalhos associam a resposta Th2 ao desenvolvimento de patologia grave (BRUNET; KOPF; PEARCE, 1999; OLIVEIRA et al., 2012). Em modelo murino foi demonstrado papel protetor da IL-4 para o hospedeiro, onde camundongos deficientes em IL-4 e em IgE apresentaram maior carga parasitária (BRUNET; KOPF; PEARCE, 1999; LA FLAMME et al., 2001). Por outro lado, estudos também sugerem que IL-4 e IL-13 estão associadas com o desenvolvimento do granuloma e fibrose hepática (CHIARAMONTE et al., 1999; DE JESUS et al., 2004; DE SOUZA RDA et al., 2012).

Existem evidências de que nas helmintíases crônicas, principalmente na esquistossomose, a resposta do tipo Th2 é dita 'modificada', sendo um misto de resposta Th2 e regulatória (VAN DEN BIGGELAAR et al., 2000). A IL-10, citocina com propriedades regulatórias, está envolvida no equilíbrio entre Th1 e Th2. Durante a infecção crônica, a produção de IL-10 reduz os danos colaterais nos tecidos e a fibrose induzida pela resposta Th2 no fígado em resposta à deposição de ovos de *S. mansoni* (GRANT et al., 2011). Entretanto, alguns estudos apontam que a IL-10 e baixos níveis de IgE contribuem para a susceptibilidade à infecção por *S. mansoni* (WILSON et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2012).

A IgE é um importante isotipo na proteção contra a esquistossomose, uma vez que ela participa da citotoxicidade celular dependente de anticorpos (ADCC) (GRANT et al., 2011) que ocorrem especificamente quando eosinófilos reconhecem vermes opsonizados por IgE. Eosinófilos humanos são capazes de degradar esquistossômulos *in vitro* pela ação de ânion superóxido e da atividade da Peroxidase Eosinofílica (EPO) (KAZURA et al., 1981).

Dessa forma, a produção de radicais livre de oxigênio é importante na resposta do hospedeiro contra a esquistossomose. Apesar da resposta imune ter papel importante na defesa contra o parasito, ainda não há relato de cura espontânea em humanos não submetidos a tratamento medicamentoso específico.

1.3 TRATAMENTO PARA A ESQUISTOSSOMOSE

A droga de primeira escolha para o tratamento da esquistossomose é o Praziquantel (PZQ), um derivado da pirazioisoquinolona, que tem se mostrado clinicamente eficaz contra um amplo espectro de infecções por cestódeos e

trematódeos. O PZQ é eficaz contra todas as espécies de *Schistosoma* e tem sido utilizado em tratamentos individuais e em massa (NIH, 2017).

Após a administração o fármaco é rapidamente absorvido, sendo necessário ocorrer metabolização hepática para exercer seu efeito sobre o verme. A taxa de cura varia entre 67 a 83% dos pacientes com esquistossomose mansônica, sofrendo a influência da idade do paciente e do nível de infecção (LIU et al., 2011; ZWANG; OLLIARO, 2014).

O PZQ atua sobre o verme adulto, especificamente no influxo de cálcio no parasita, através dos canais de cálcio operados por voltagem, levando a contração muscular e modificações na superfície do tegumento. Porém, alguns estudos mostraram que o acúmulo de cálcio por si só, medido em parasitas mantidos *in vitro*, pode não explicar a atividade esquistossomicida do PZQ (PICA-MATTOCCIA et al., 2008; NOGI et al., 2009). Modificações de superfície desregulando os mecanismos que controlam o fluxo de cátions das membranas celulares dos vermes, estimula a entrada de sódio e inibe a de potássio, ocasionando despolarização nas células do parasita. Em concentrações terapêuticas mais elevadas, o PZQ provoca vacuolização e vesiculação do tegumento de parasitas suscetíveis. Esse efeito resulta em liberação do conteúdo do parasita e ativação do mecanismo de defesa do hospedeiro para a destruição dos vermes (DOENHOFF; CIOLI; UTZINGER, 2008).

O paciente em tratamento costuma apresentar muitas reações adversas, sendo as mais comuns: inapetência, cefaleia, tonturas, dor abdominal, náusea, vômito, urticária, erupções cutâneas pruriginosas, fraqueza, cansaço e febre. É provável que algumas reações sejam devidas à morte dos parasitos, mais frequentes em pacientes com alta carga parasitária (NIH, 2017).

Já existem alguns relatos de resistência ao tratamento, apesar das informações ainda serem controversas (FALLON, 1998; WANG; WANG; LIANG, 2012; VALE et al., 2017). Embora poucos isolados resistentes ao Praziquantel tenham sido descritos, foram encontrados em muitos focos endêmicos, especialmente em países africanos como o Egito e Senegal, uma susceptibilidade reduzida à droga em indivíduos com esquistossomose mansônica (WANG; WANG; LIANG, 2012). Além disso, em casos de reinfecção, o Praziquantel não é efetivo contra esquistossômulos, levando ao surgimento de casos refratários à terapia (PICA-MATTOCCIA; CIOLI, 2004).

Assim, a busca de novos fármacos que possam substituir ou complementar a ação do Praziquantel é fundamental na tentativa de controle e eliminação da esquistossomose. Os novos fármacos para a esquistossomose devem, além de apresentar propriedades esquistossomicidas, serem capazes de estimular o sistema imune a agir contra diversas formas evolutivas do parasito, como por exemplo, a produção e liberação de espécies reativas de oxigênio no local da infecção, tóxico para diferentes formas evolutivas do verme.

1.4 ESTRESSE OXIDATIVO NA ESQUISTOSSOMOSE

O estresse oxidativo ocorre em decorrência do desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio e a sua remoção através de sistemas antioxidantes (NITURE; KHATRI; JAISWAL, 2014). As espécies reativas de oxigênio (ROS) são radicais livres e metabólitos reativos que contém moléculas de oxigênio com elétrons que não foram pareados, como por exemplo, moléculas únicas de oxigênio ($1O_2$), radicais livres de oxigênio (O_2 , $\cdot OH$, $HO\cdot$) e peroxidases (H_2O_2 $\cdot ROOH$) e óxido nítrico (NO) (CHEN et al., 2015).

O excesso de ROS é prejudicial e afeta o metabolismo e estrutura das células, podendo causar morte celular e desequilíbrio entre agentes pró- e antioxidantes, resultando no envelhecimento e em inúmeras doenças, dentre elas, as disfunções vasculares (CHEN et al., 2015). No entanto, sistemas antioxidantes são capazes de eliminar o excesso de ROS, desenvolvendo um papel importante no equilíbrio redox, prevenindo o dano oxidativo.

Uma das vias mais importantes para manter esse equilíbrio e combater os ROS, através de sua capacidade de aumentar a expressão de genes antioxidantes, é a via do fator 2 relacionado ao fator nuclear E2 (Nrf2) (ALMEER et al., 2018). O Nrf2 é um fator de transcrição com alta sensibilidade ao estresse oxidativo. O Nrf2 está localizado no citoesqueleto, adjacente à proteína 1 associada Keap1. Em condições de estresse oxidativo, o Nrf2 se dissocia do Keap1 e se transloca para o núcleo, resultando em sua ligação ao elemento de resposta antioxidante (ARE) e na transcrição de genes que codificam elementos antioxidantes, enzimas desintoxicantes, proteínas antiapoptóticas e proteassomas (Figura 3) (NITURE; KHATRI; JAISWAL, 2014).

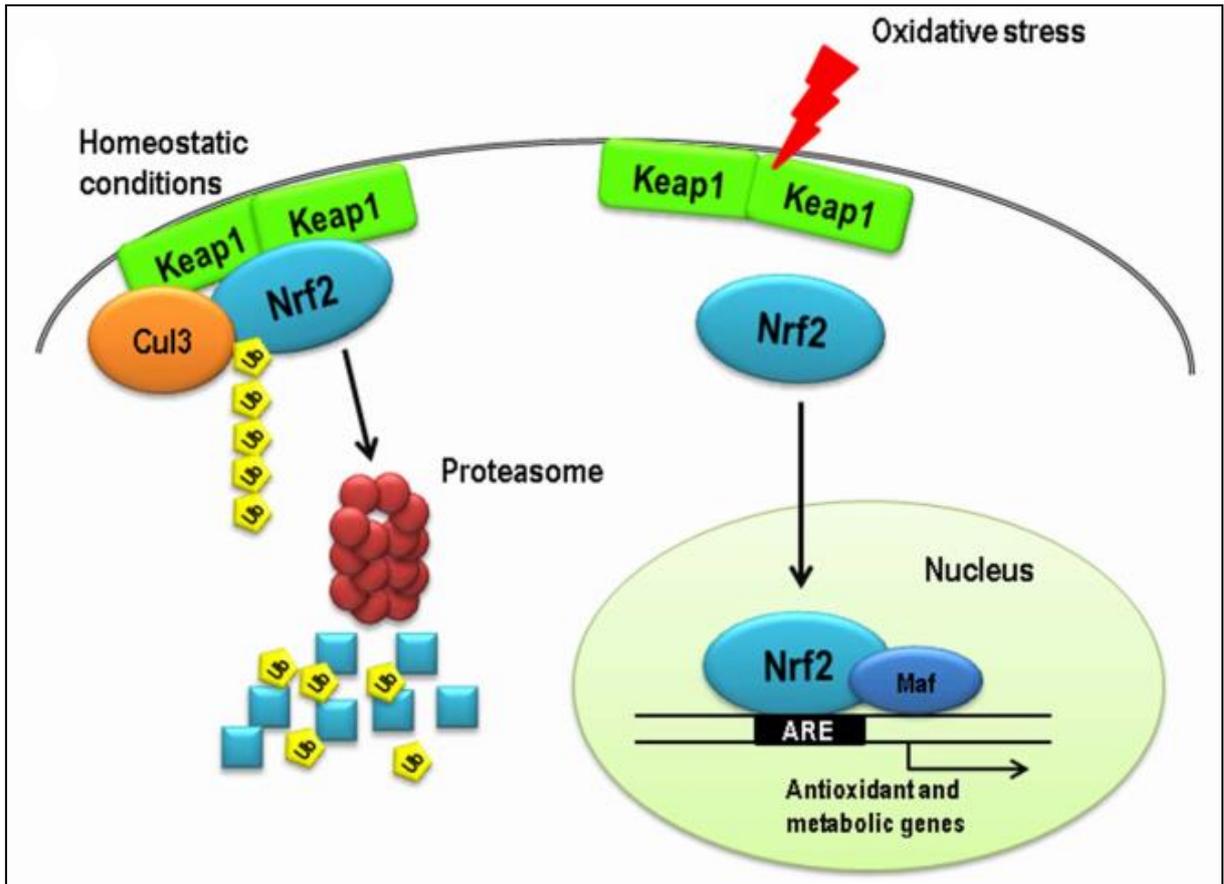


Figura 3. Visão geral da via do Keap1-Nrf2-ARE. O estresse oxidativo faz com que o Nrf2 se dissocie do Keap1 e se transloque para o núcleo e se ligue ao ARE para induzir a expressão de genes antioxidantes. Figura adaptada (BELLEZZA et al., 2018)

A via Keap1-Nrf2-ARE regula a expressão de NADPH, NAD(P)H quinona oxidoreductase, Glutathione Peroxidase (GPx), Glutathione Redutase (GSR), catalase (CAT), Superóxido Dismutase 1 (SOD1), Heme-oxigenase-1 (HMOX-1) e Tioredoxina Redutase (TRX). Todas essas moléculas envolvidas em respostas frente a ROS, sendo responsáveis por detoxificar, convertendo ROS em produtos menos danosos à célula. (AL-SAWAF et al., 2015; CHEN et al., 2015; AHMED et al., 2017).

A molécula SOD1 é capaz de transformar superóxido, espécie altamente deletéria, em uma forma menos agressiva à célula, o peróxido de hidrogênio (TSANG et al., 2014). O GPx e a CAT são responsáveis pela conversão do peróxido de hidrogênio em água e oxigênio. A GSR não age diretamente na remoção de ROS, mas é responsável pela regeneração da glutathione à sua forma reduzida (GSH) na presença de NADPH, tendo como objetivo impedir a paralisação do ciclo metabólico da glutathione, mantendo a homeostase redox (MKOJI; SMITH;

PRICHARD, 1988a; ROVER JUNIOR, 2001; LI et al., 2015). A H-MOX1 tem a função de catabolizar heme em biliverdina, monóxido de carbono (CO) e Fe (ferro) (GOZZELINO; JENEY; SOARES, 2010). A tiorredoxina redutase compõe o sistema da Tiorredoxina juntamente com o NADPH e a tiorredoxina e tem como principal função a redução da tiorredoxina, mantendo o ambiente celular reduzido a fim de impedir o estresse oxidativo. O sistema Trx tem mostrado papel importante também no reparo de DNA e proteínas (LU; HOLMGREN, 2014).

Especificamente durante a infecção pelo *S. mansoni*, ocorre a produção de ROS por parte dos eosinófilos formando um ambiente desfavorável a fim de destruir os vermes adultos (LOVERDE; CARVALHO-QUEIROZ; COOK, 2004). Após a infecção ocorre a produção de ânion superóxido pela NADPH oxidase associada à membrana de fagócitos ativados. A enzima SOD, pela dismutação do ânion superóxido, dá origem ao peróxido de hidrogênio (H₂O₂) o qual é utilizado pela peroxidase eosinofílica (EPO) para oxidar halogenetos (I-, Br-) (ABDALLAHI et al., 1999; GHARIB et al., 1999).

O *S. mansoni* é um verme muito bem adaptado ao seu hospedeiro, sendo a susceptibilidade à morte por estresse oxidativo dependente do estágio do ciclo de vida do parasita. Enquanto os esquistossômulos apresentam maior susceptibilidade, os vermes adultos apresentam resistência à morte por ROS (MKOJI; SMITH; PRICHARD, 1988a). Para garantir a sua sobrevivência no ambiente intravascular, o verme adulto possui um sistema antioxidante composto por enzimas que reduzem a atividade de espécies reativas de oxigênio (MKOJI; SMITH; PRICHARD, 1988b). Essas enzimas também são secretadas por diversas células do hospedeiro, dentre elas destacam-se as células endoteliais, as quais apresentam íntimo contato com os vermes adultos durante a infecção.

1.5 CÉLULAS ENDOTELIAIS NA ESQUISTOSSOMOSE

As células endoteliais compõem uma parte constitutiva do coração e das paredes dos vasos sanguíneos. Essas células formam um elo importante com o sistema imunológico (STURTZEL, 2017). No contexto da esquistossomose, as células endoteliais merecem especial atenção, uma vez que os vermes adultos ficam localizados e realizam ovoposição no lúmen vascular, em contato íntimo com essas células. Um bom modelo experimental para estudar a participação das células

endoteliais na patogênese de diversas doenças é o uso de células endoteliais da veia umbilical humana (HUVECs) (PARK et al., 2006; LOPES et al., 2014).

As células endoteliais desempenham uma variedade de papéis importantes no controle da função vascular. São fundamentais para a homeostase vascular e para regular eventos fisiológicos ou patológicos tais como, trombose, angiogênese e eventos inflamatórios relacionados com permeabilidade dos vasos, rolamento e adesão de leucócitos ao endotélio (SHIREMAN; PEARCE, 1996; MICHIELS, 2003; POBER; SESSA, 2007).

Várias doenças cardiovasculares têm como início a disfunção endotelial em consequência do estresse oxidativo presente no ambiente vascular. A via do Nrf2 desempenha um papel crucial na proteção de células endoteliais contra os danos causados por ROS. A via do Nrf2 é uma das mais estudadas em células endoteliais e há evidências de que essa via é um dos mecanismos homeostáticos endógenos importantes para a proteção do endotélio no contexto de disfunção endotelial (CHEN et al., 2015).

Na esquistossomose, alguns estudos mostram a interação dessas células diretamente com ovos depositados pelas fêmeas de *S. mansoni in vitro*, ou que ovos podem se ligar a plaquetas ou a proteínas plasmáticas do hospedeiro, como, o fator de von-Willebrand que podem auxiliar na ligação ao endotélio e ativação de células endoteliais (FILE, 1995; WU et al., 2007; DEWALICK et al., 2014). Além disso, ovos e antígenos de ovos são capazes de induzir a proliferação de células endoteliais *in vitro* (FREEDMAN; OTTESEN, 1988). A interação do ovo com as células endoteliais está envolvida também na formação granuloma (SCHWARTZ; FALLON, 2018), induzindo a angiogênese durante o desenvolvimento de granuloma hepático (BAPTISTA; ANDRADE, 2005; LEMOS; ANDRADE, 2010). Apesar de haver uma boa quantidade de estudos mostrando a participação das células endoteliais na esquistossomose, a maior parte deles foca a interação dessas células especificamente com o ovo, e não em sua relação com o verme adulto.

Durante a infecção pelo *Schistosoma mansoni* pode haver um desequilíbrio dos fatores oxidativos por diversos mecanismos, como a deposição de ovos, alterações no tônus vascular e intermediários imunológicos solúveis (DE OLIVEIRA et al., 2013). Além disso, tem sido bem estabelecido que ocorre o estresse oxidativo pela produção de ROS na esquistossomose por células do sistema imunológico na

tentativa de destruição dos vermes (DE OLIVEIRA et al., 2013) e durante o processo granulomatoso no fígado (ABDALLAHI et al., 1999; GHARIB et al., 1999).

Desta forma, nossa hipótese é que as células endoteliais através da produção de substâncias antioxidantes relacionados a via Nrf2 frente ao estresse oxidativo possam favorecer a sobrevivência do verme adulto no meio intravascular.

2 JUSTIFICATIVA

O verme adulto do *S. mansoni* é bem adaptado ao hospedeiro humano. Até então, a hipótese sobre a capacidade de sobrevivência do verme era sustentada por diversos mecanismos, como, a evasão do sistema imune, capacidade de adesão de proteínas do hospedeiro, ou pela indução de uma resposta imune mais regulatória. Mais recentemente, tem sido estudada a capacidade do verme adulto regular a expressão de alguns genes relacionados aos mecanismos de desintoxicação, o que parece ser essencial para a proteção do verme contra o estresse oxidativo

Considerando o habitat intravascular do verme adulto do *Schistosoma mansoni*, é de fundamental importância entender a participação das células endoteliais durante a infecção. Apesar da existência de investigações sobre a interação parasito-hospedeiro envolvendo células endoteliais, ainda não há estudos sobre a interação do verme adulto com o endotélio. Além disso, ainda não foi avaliada a expressão de genes antioxidantes por essas células durante a esquistossomose. Dessa forma, o conhecimento gerado com esse estudo pode contribuir com o entendimento da participação dessas células no balanço oxidativo e atuação das células endoteliais na proteção ou progressão da doença.

Apesar de haver tratamento para a esquistossomose, e o Praziquantel apresentar considerável eficácia, deve-se levar em consideração o aspecto endêmico e a constante reexposição ao verme após o tratamento, o que requer tratamentos repetidos em indivíduos residentes em áreas endêmicas. Além disso, alguns estudos apontam para falha terapêutica do PZQ. Diante disso, o conhecimento gerado com esse estudo pode auxiliar na busca novos fármacos para o tratamento desta doença, como também a combinação de quimioterápicos com o intuito de aumentar a eficácia do tratamento, como também diminuir a dose, visando reduzir efeitos colaterais.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a expressão de genes antioxidantes em células HUVEC expostas a verme adulto do *S. mansoni* e sua capacidade de proteger o parasita da morte em meio com ROS.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar a expressão gênica de agentes antioxidantes em células HUVEC expostas ao verme adulto do *S. mansoni*;
2. Avaliar a capacidade de sobrevivência do verme adulto do *S. mansoni* junto às células endoteliais após estresse oxidativo;

Nota de Esclarecimento

Por tratar-se de informação sensível em que o conhecimento obtido através da realização desse estudo pode gerar um produto ou proposta para a reformulação de fármaco, as informações referentes aos genes, enzimas e substratos avaliados serão apresentadas de forma codificada.

Os genes dos agentes antioxidante avaliados nesse estudo serão representados da seguinte forma nesse documento:

- Gene do agente antioxidante A – α OX-A
- Gene do agente antioxidante B – α OX-B
- Gene do agente antioxidante C – α OX-C
- Gene do agente antioxidante D – α OX-D
- Gene do agente antioxidante E – α OX-E

A enzima codificada pelo gene α OX-E será representada como α OX-E.

O substrato da enzima α OX-E será representado apenas como OX, por ser este o substrato também de outras enzimas avaliadas nesse estudo.

4 METODOLOGIA

4.1 MANUTENÇÃO DO CICLO DO *S. MANSONI*

A manutenção do ciclo do *S. mansoni* no moluscário do Instituto Gonçalo Moniz (IGM) é gerenciada pela equipe do Laboratório de Patologia Experimental (LAPEX), hoje coordenada pelo pesquisador Dr. Ricardo Riccio Oliveira (Protocolo CEUA 010/2019). Para a manutenção do ciclo do *S. mansoni*, além de um biotério com disponibilidade de roedores susceptíveis, é necessário também um moluscário onde são mantidos caramujos do gênero *Biomphalaria*, hospedeiro intermediário do *S. mansoni*.

No início do desenvolvimento desse projeto, o ciclo tinha sido interrompido, sendo então essa a primeira etapa antes da realização dos experimentos subsequentes. Inicialmente foi realizada a reorganização do espaço do moluscário e tentativas de obtenção de espécimes de parasito viáveis para a retomada do ciclo do *Schistosoma*, assim como viagens a campo para coletas de caramujos. Foi realizada coletas de caramujos no município de Salvador, junto com a equipe do Centro de Controle de Zoonoses (CCZ), e viagens à área endêmica, no município do Conde (SISGEN-AE75ADF), em busca de caramujos infectados, ambas tentativas sem sucesso. Assim, foi iniciada uma colaboração com o Instituto René Rachou (Fiocruz, MG), que cederam gentilmente fígados de hamsters contendo ovos viáveis do *S. mansoni* e 300 caramujos susceptíveis, livres de infecção, para a retomada do ciclo no IGM. No moluscário do IGM, metade dos caramujos foi destinada a reprodução e a outra metade para infecção pelo *S. mansoni*.

Os fígados de hamsters recebidos foram triturados em liquidificador com solução salina 0,9%, em seguida, foi filtrado com auxílio de gaze dobrada e transferido para um cálice opaco de 1L. Após a transferência, completou-se o volume para 1L com solução salina 0,9% e o material foi mantido em repouso por 30 minutos para sedimentação. Em seguida, foi realizada uma lavagem com salina, e mais duas lavagens com água filtrada, com repouso de 20 minutos entre elas. Após a última lavagem, o sedimento foi transferido para um balão volumétrico opaco (translúcido na ponta), completado com água filtrada e expostos a luz artificial por 15 minutos para induzir eclosão dos ovos e liberação dos miracídios. Após 15 minutos de exposição à luz, foi coletada a parte mais superficial da solução, onde estariam

concentrados os miracídios. A contagem de miracídios foi realizada em placas de vidro escavadas com auxílio de lugol.

Para a infecção dos caramujos, 150 moluscos foram submetidos à infecção em massa. Para isso, foram divididos em 3 béqueres, e após a contagem, a solução contendo os miracídios foi igualmente distribuída em cada béquer, mantendo a proporção de 10 miracídios por caramujo. Em seguida, os caramujos foram expostos à luz por 4 horas, e então foram acondicionados em um aquário.

Após 6 semanas de infecção, foi realizada a eliminação de cercárias. Os caramujos foram distribuídos em poços da placa de 12 poços contendo 2 ml de água filtrada, e expostos à luz por aproximadamente 1 hora. Em seguida, os caramujos foram devolvidos aos aquários e os poços foram examinados com o auxílio de uma lupa. A solução contida nos poços, positivas para a presença de cercárias foram transferidas para um recipiente. Em seguida, a fim de concentrar as cercárias, utilizando o fototropismo característico, a solução contendo as cercárias foi transferida para uma proveta opaca com a parte superior exposta à luz por aproximadamente 15 minutos. Decorrido o tempo, foi coletada a parte mais superficial da solução, onde concentrava-se a maior parte das cercárias. Então, foi realizada a contagem de cercárias, seguindo o mesmo procedimento para contagem de miracídios. Para dar continuidade ao ciclo, foram utilizadas fêmeas de camundongos Swiss Webster, pesando entre 18 a 30g. A infecção foi realizada com uma injeção subcutânea contendo 100 cercárias.

4.2 OBTENÇÃO DE VERMES ADULTOS

Após 6 a 8 semanas de infecção, os camundongos foram eutanasiados por uso de dose letal do anestésico Thiopental, cedido pelo biotério do IGM, na concentração de 833 mg/kg administrado intraperitonealmente. Os vermes adultos do *S. mansoni* foram obtidos a partir do processo de perfusão pelo sistema porta com solução salina 0,9% com 3% de citrato de sódio (PELLEGRINO, 1956; SMITHERS; TERRY, 1965).

Para isso, foi realizada uma incisão no abdome do camundongo, cortando assim a pele, peritônio e caixa torácica, expondo as vísceras e o coração. Durante a perfusão os camundongos ficaram suspensos sobre uma placa de petri e o processo se deu pela exposição da veia porta com uma pinça e o rompimento dela, realizada

perfusão do coração aplicando no ventrículo a solução salina. Após isso, os vermes que ficaram depositados na placa de petri foram transferidos para outra placa contendo meio RPMI 1640 (Gibco, Life Technologies Australia Pty Ltd, Mulgrave, VIC, Australia).

Em seguida, foi realizada nova passagem dos vermes para outra placa de RPMI, e então, os vermes foram transferidos para placa de 96 poços de fundo chato, e foram avaliados utilizando um microscópio invertido e classificados quanto à viabilidade e ao sexo, sendo selecionados para os experimentos subsequentes apenas vermes viáveis, de ambos os sexos.

4.3 MANUTENÇÃO DA CULTURA DE CÉLULAS HUVEC

As células HUVEC de linhagem imortalizada foram cedidas pela pesquisadora Dra. Marilda Gonçalves, do Laboratório de Investigação em Genética e Hematologia Translacional (LIGHT) do IGM.

As células foram obtidas congeladas, na concentração de 1×10^6 células/ml em solução de congelamento DMSO (10%) e Soro Fetal Bovino (40%) e meio RPMI (50%). O criotubo contendo as células foi descongelado com auxílio de água destilada aquecida a 37°C, até que restasse um mínimo da fase sólida, e levado para o fluxo laminar, onde o conteúdo foi transferido para tubo cônico de 15ml contendo meio RPMI preparado com 1% de PenStrep (10.000U/ml de penicilina e 10.000µg/ml de estreptomicina; Gibco, Nova York, NY, USA). Em seguida, o tubo foi centrifugado a 800 rpm por 4 minutos a 21°C, e o pellet de células foi ressuscitado em 1ml de soro fetal bovino (Gibco, Nova York, NY, USA), e transferido para uma garrafa de cultura contendo meio RPMI 1640, preparado com 1% de PenStrep, suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de Glutamina e Hapes (GH). As garrafas foram mantidas em estufa úmida a 37°C, em atmosfera de 5% de CO₂, e o meio de cultura foi trocado a cada três dias.

Quando as células já tinham atingido confluência, foi realizado o processo de expansão. Resumidamente, a garrafa foi lavada três vezes consecutivas, com tampão PBS 1X (estéril e em temperatura ambiente). Após a realização da última lavagem, foi adicionado 1ml de tripsina 0,25% EDTA 1X (Gibco, Nova York, NY, USA), seguido de incubação durante 5 minutos a 37°C em estufa com 5% de CO₂. Após este período, o dobro do volume de meio suplementado foi adicionado para

inativar a tripsina. Em seguida, todo o conteúdo foi transferido para o tubo cônico contendo 7ml de PBS 1X e centrifugado a 800 rpm por 4 minutos a 21°C. O pellet das células foi ressuspensionado em meio RPMI completo e as células foram então redistribuídas em até 4 garrafas novas para a manutenção da cultura (Figura 4). Para a realização dos ensaios, as células foram utilizadas entre a 3^a e 5^a expansão.

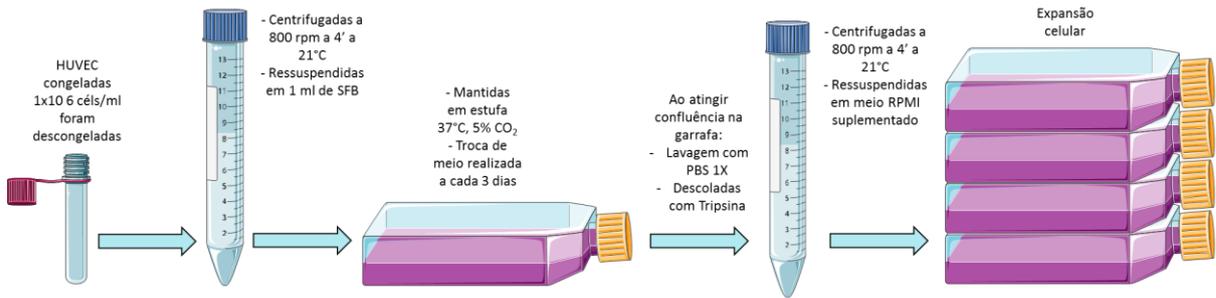


Figura 4. Esquema das etapas de manutenção de HUVEC.

As células previamente cultivadas em garrafas foram removidas utilizando 1ml de tripsina 0,25% EDTA 1X (Gibco, Nova York, NY, USA). A tripsina foi inativada utilizando o meio RPMI completo e a suspensão de células foi coletada e transferida para um tubo cônico de 15ml contendo 7ml de PBS 1X e centrifugadas a 800 rpm por 4 minutos a 21°C. Após a centrifugação o sobrenadante foi descartado e o pellet de células ressuspensionado em 1ml de RPMI suplementado, seguido de contagem de células em câmara de Neubauer. A contagem foi realizada usando azul de Tripán 0,2% (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) para excluir da contagem as células não viáveis. As células foram então redistribuídas para os poços da placa de fundo chato de 12 poços na concentração de 1x10⁵ células/ml com 800µL de meio RPMI completo, e foram acondicionadas em estufa a 37°C e 5% de CO₂, até que as células aderissem e a placa apresentasse confluência de 80% nos poços (Figura 5). Após 24 horas de cultivo, os desafios foram adicionados.

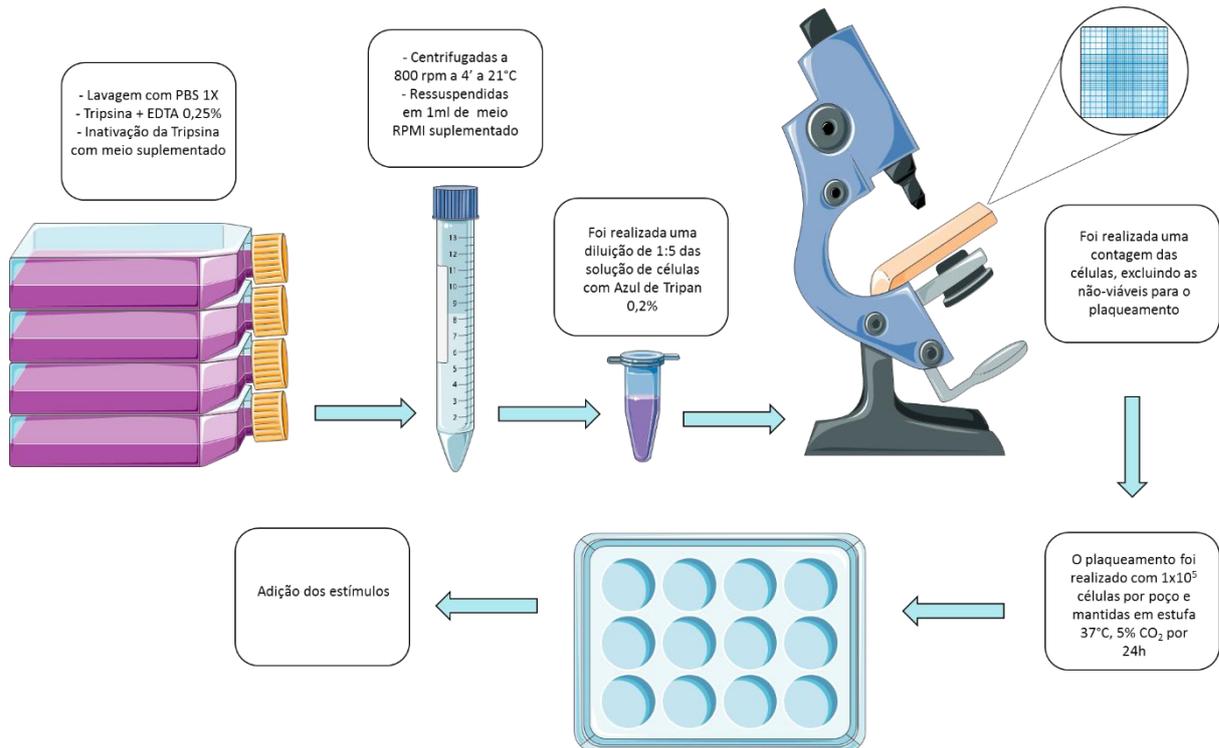


Figura 5. Esquema das etapas do plaqueamento de HUVEC.

4.4 DESAFIO DE CÉLULAS HUVEC

Os experimentos foram realizados em 5 condições diferentes. A primeira condição foi uma cultura apenas com HUVEC, utilizada como controle negativo. Na segunda condição, células HUVEC foram desafiadas com um casal de vermes adultos. A terceira condição foi a adição de 5,15 μM de Praziquantel (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) (PICA-MATTOCCIA; CIOLI, 2004) diretamente sobre as células HUVEC. A quarta condição foi a cultura de HUVEC com o casal de verme adulto na presença de Praziquantel. A quinta condição foi a cultura de HUVEC desafiada com LPS, como controle positivo. Todas essas condições foram realizadas em poços da placa de 12 poços, em triplicata, sendo repetido cada experimento pelo menos por três vezes (Figura 6).

Cada uma dessas condições foi mantida em cultura por diferentes tempos, a saber: 1h, 3h, 6h e 24h. Em todos esses pontos foi coletado o sobrenadante. E para o qPCR, o RNA foi extraído nos tempos de 1h, 3h e 6h.

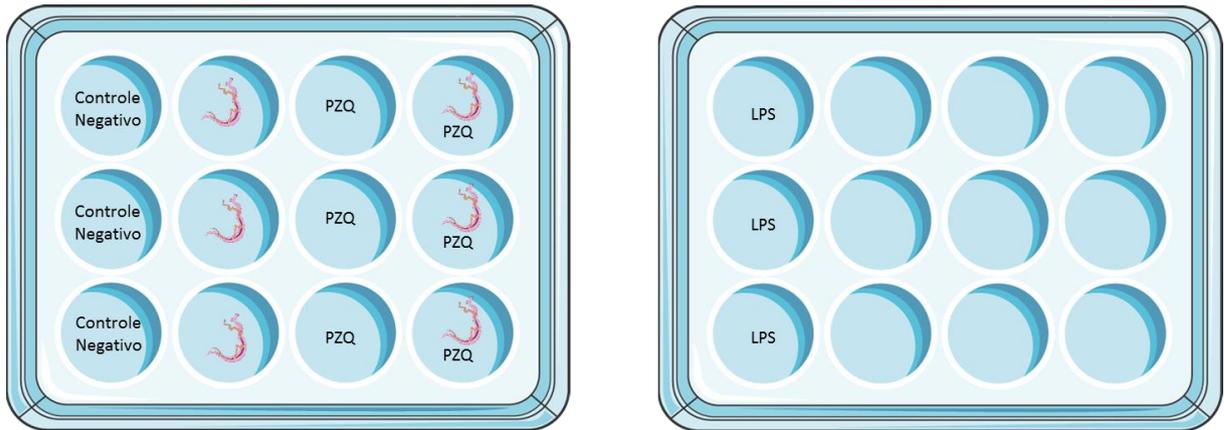


Figura 6. Esquema de placas utilizado para a realização dos experimentos para a extração de qPCR.

4.5 EXPRESSÃO DE GENES ANTIOXIDANTES POR PCR EM TEMPO REAL

Para a avaliação do estresse oxidativo foi extraído mRNA utilizando reagente Trizol (Life Technologies TM, Carlsbad, CA, EUA). Após o tempo de cultura, foi realizada a retirada do sobrenadante e armazenado em freezer -20°C . Em seguida, foi adicionado aos poços da placa $500\mu\text{l}$ de Trizol, e o conteúdo de cada poço foi transferido para um microtubo identificado e armazenado no freezer -80°C . No dia da extração, após o descongelamento, foi adicionado a cada tubo, $100\mu\text{l}$ de Clorofórmio e os tubos foram homogeneizados por inversão 10 vezes e foram deixados em repouso durante 5 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, os tubos foram levados para a microcentrífuga por 15 minutos a 12.000 RPM a 4°C . Após isso, o sobrenadante foi coletado e transferido para outro tubo identificado, cada tubo foi então homogeneizado por inversão. Em seguida, os tubos foram então levados ao freezer -80°C por no mínimo uma hora. Decorrido o tempo, as amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 12.000 RPM a 4°C . Em seguida, o sobrenadante foi descartado e então foi adicionado a cada tubo $500\mu\text{l}$ de etanol 70%. As amostras foram novamente centrifugadas por 5 minutos a 7.500 RPM a 4°C . Em seguida, o sobrenadante foi descartado e o tubo foi deixado invertido por aproximadamente 10 minutos até que secar o pellet. Então, o pellet foi ressuscitado em $20\mu\text{l}$ de água ultrapura e as amostras foram armazenadas em freezer -80°C . A quantidade e a pureza do RNA extraído foram examinadas pelo NanoDrop.

A síntese de DNA complementar (cDNA) foi realizada com 250 ng de RNA total usando o Kit de Transcrição Reversa de cDNA de Alta Capacidade (Applied Biosystems TM, Foster City, CA, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. As condições utilizadas foram 25° C por 10 minutos, 37° C durante 120 minutos, 85° C durante 5 minutos, finalizando com 4°C. O cDNA obtido foi ressuspendido em água livre de RNase, aliquoteado e estocado em freezer a -20° C.

A análise da expressão gênica foi avaliada por meio de PCR em tempo real (qPCR) em placas óticas de 96 poços, com duplicatas para as amostras, em um equipamento de PCR em Tempo Real ABI 7500 (Applied Biosystems TM, Foster City, CA, EUA) para genes antioxidantes avaliados nesse estudo e o gene endógeno HPRT, com a utilização do reagente SYBR-Green PCR Master MIX (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), de acordo com as instruções do fabricante.

As condições padrão de qPCR foram as seguintes: 10 min a 95° C, seguido por 40 ciclos a 95° C por 15 s e 60° C por 60 s. Após a amplificação e curva de dissociação, os valores do ciclo limiar (Ct) foram obtidos com o auxílio do programa operacional do sistema 7500™ (Applied Biosystems, EUA). Os níveis de expressão foram normalizados com o controle endógeno, o gene, HPRT, e os valores de expressão relativa ddCt, foram calculados utilizando como amostra calibradora a mediana dos controles não-tratados.

4.6 AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE SOBREVIVÊNCIA DOS VERMES ADULTOS DE *S. MANSONI*

Para os ensaios utilizando o PZQ foi realizado um teste para a determinação da DL50. Um casal de vermes adultos foi desafiado com diferentes concentrações do PZQ (1,287µM, 2,575µM, 5,15µM, 10,3µM) e colocado na estufa a 37°C e 5% de CO₂ por 24h. Após o tempo de incubação, os casais foram observados com o auxílio de um microscópio invertido para avaliação de viabilidade. Esse experimento foi realizado em quadruplicata, sendo repetido por duas vezes. Os critérios utilizados foram a motilidade e integridade do tegumento, sendo classificados em scores que variaram de 0 a 3 (LOMBARDO et al., 2019). O score 0 significa morte e foi determinado quando o tegumento estava completamente enegrecido e os vermes com ausência de motilidade. O score 1 foi determinado quando o tegumento estava enegrecido, mas os vermes apresentavam baixa motilidade e comprometimento de

ventosa oral e ventral, geralmente apresentam-se destacados do fundo do poço. O score 2 determinava tegumento pouco íntegro e alguma motilidade. O score 3 determinavam vermes totalmente viáveis, com tegumento íntegro e bastante motilidade. A presença de ovos nos poços também é um sinal de boa viabilidade (Tabela 1). A determinação dos scores foi feita por 2 observadores de forma independente, e quando havia discordância era realizada uma nova observação até chegar a um consenso. Foi determinada a concentração de 5,15µM de PZQ como a DL50.

Foi avaliada também a capacidade de sobrevivência dos vermes adultos após exposição a estresse oxidativo em três modelos. O primeiro modelo foi a cultura de um casal de verme adulto do *S. mansoni*, sem a presença de HUVEC, em meio RPMI suplementado com a adição de 5 diferentes concentrações do agente oxidante OX (100µM, 200µM, 400µM, 800µM e 1600µM). O segundo modelo utilizado foi a cultura de células HUVEC com um casal de verme e diferentes concentrações de OX (100µM, 200µM, 400µM, 800µM e 1600µM). O terceiro modelo foi a cultura de um casal de vermes em meio RPMI suplementado com a adição das 5 diferentes concentrações de OX e a adição do agente antioxidante αOX-E. Todos os modelos testados foram incubados em uma estufa a 37°C e 5% de CO₂ por 24h e foram realizados em quadruplicata sendo o experimento repetido por duas vezes.

Após a incubação, os vermes foram avaliados quanto ao score utilizando os mesmos critérios do ensaio com o PZQ.

Tabela 1. Descrição do estado de sobrevivência dos vermes por score.

Score	Descrição
0	Vermes mortos, apresentando tegumento escurecidos e a motilidade das ventosas ventral e oral está ausente.
1	Vermes apresentando tegumento enegrecido, mas apresentavam baixa motilidade e comprometimento de ventosa oral e ventral.
2	Vermes apresentando tegumento pouco íntegro e alguma motilidade.
3	Vermes que apresentam motilidade, sem alterações na morfologia, transparência e tegumento intacto, ventosas ventral e oral ativas. A presença de ovos nos poços também é considerada bom critério para viabilidade.



Figura 7. Representação dos scores de viabilidade dos vermes.

A. Vermes classificados com score de viabilidade 0 apresentando tegumento enegrecido e ausência de motilidade. **B.** Vermes classificados com score 1 apresentando comprometimento de ventosa oral e ventral, tegumento enegrecido e baixa motilidade. **C.** Verme classificado como score 2 apresentando tegumento prejudicado, mas com alguma motilidade e ventosa oral ativa. **D.** Casal de vermes classificados com score 3 apresentando boa motilidade, ventosas ativas e presença de ovo no poço (circulado).

4.7 ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR (HUVEC)

A resazurina tem sido amplamente utilizada como indicador de viabilidade celular. A viabilidade celular determinada pela resazurina configura um ensaio metabólico, pois envolve a atividade de enzimas mitocondriais, como a NADH desidrogenase, e são provavelmente responsáveis pela transferência de elétrons de NADH para a resazurina, reduzindo então a resorufina. Essa reação sofre uma mudança na coloração do composto de azul para rosa (BORRA et al., 2009).

Foi realizado um ensaio utilizando o sal de resazurina de sódio (Sigma-Aldrich, San Louis, MO, EUA) para avaliar a viabilidade das células HUVEC após o desafio com o agente oxidante OX nas diferentes concentrações utilizadas nos experimentos, com o agente antioxidante α OX-E e com o PZQ.

Para os ensaios de viabilidade, foram utilizadas 2×10^4 células/poço em placa de 96 poços de fundo chato. Após o plaqueamento, as células foram mantidas em estufa até atingirem confluência de pelo menos 80%. Após isso, foram adicionados

os desafios, em triplicata. Em seguida a placa foi acondicionada em estufa a 37°C e 5% de CO₂ por 24h. O sobrenadante de cultura foi então cuidadosamente removido e as células foram lavadas duas vezes com PBS 1X. A lavagem foi realizada com cautela a fim de manter as células aderidas. Por fim foi acrescentada a cada poço 200 µl de resazurina 1x. Células não desafiadas foram utilizadas como controle positivo de viabilidade. Como controle de morte foram utilizados poços somente com a resazurina, enquanto poços contendo apenas o meio RPMI foram utilizados como o branco da reação.

Após a adição da resazurina, a placa foi transferida para estufa umidificada (37 °C, 5% de CO₂) e a mudança de coloração de azul ciano para rosa foi monitorada a cada hora. Aproximadamente 4h após a adição da resazurina, a conversão estava próxima aos 100% e a reação foi parada. A leitura foi realizada utilizando leitor de microplacas de 96 poços em comprimentos de onda de 570 e 600 nm.

4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para as reações de PCR, a comparação dos resultados obtidos para cada gene entre os grupos foi realizada pelo teste ANOVA e foi realizado o pós-teste de Dunns. Os dados definidos matematicamente como “*outliers*” foram excluídos. Os resultados foram representados em mediana e desvio interquartilico (IQR), assim representado [mediana (IQR)]. Para a análise da capacidade de sobrevivência dos vermes adultos de *S. mansoni*, a comparação entre os grupos foi realizada pelo teste exato de Fisher. Para a análise das curvas de sobrevivência entre os grupos foi utilizado o teste de Log-rank (Mantel-Cox). Foi considerada diferença significativa valores de $p < 0,05$. A análise estatística foi realizada com o programa *Graph Pad Prism 5.0* (San Diego, CA, EUA).

5 RESULTADOS

5.1 EXPRESSÃO DE GENES ANTIOXIDANTES EM CÉLULAS HUVEC DESAFIADAS COM VERME ADULTO DO *S. MANSONI* E APÓS TRATAMENTO COM O PRAZICUANTEL

O *Schistosoma mansoni* é um parasita intravascular mantendo contato íntimo com células endoteliais durante todas as fases de seu ciclo no hospedeiro humano. Além disso, o verme adulto do *S. mansoni* pode viver longos períodos no ambiente vascular, mostrando ser bem adaptado ao hospedeiro humano. Dessa forma, é importante entender o papel das células endoteliais durante a esquistossomose, bem como fatores que possam promover a sobrevivência dos vermes. A ação de radicais livres de oxigênio é um mecanismo importante de defesa contra o verme. Nesse trabalho foi avaliada, a expressão de cinco genes relacionados a resposta antioxidante em células HUVEC na presença do verme adulto e após o tratamento com o Praziquantel, nos tempos de 1, 3 e 6 horas. Por se tratar de resultados que podem gerar patente, os genes antioxidantes avaliados aqui serão apresentados de forma mascarada, com as seguintes denominações: α OX-A, α OX-B, α OX-C, α OX-D e α OX-E.

A expressão relativa de mRNA de α OX-A em HUVEC desafiadas com um casal de vermes adultos não variou ao longo dos três tempos de cultura (1, 3 e 6 horas). Da mesma forma, quando foi adicionado Praziquantel à cultura contendo o verme e HUVEC também não houve variação na sua expressão. Entretanto, ao expor HUVEC apenas a Praziquantel, foi observado aumento significativo na expressão relativa de α OX-A entre a cultura desafiada por 1 [(0,6 (0,527))] e 6 horas [1,519 (0,539); $p < 0,05$] (Figura 8).

Da mesma forma, a expressão de mRNA de α OX-B não variou ao longo dos três tempos de cultura (1, 3 e 6 horas) de HUVEC expostas ao casal de vermes adultos e ao casal de vermes tratados com o Praziquantel. Foi observado um aumento significativo na expressão relativa de mRNA de α OX-B quando as células HUVEC foram expostas ao PZQ entre as culturas de 1 [0,514 (0,224)] e 6 horas [1,571 (2,878); $p < 0,05$] (Figura 9).

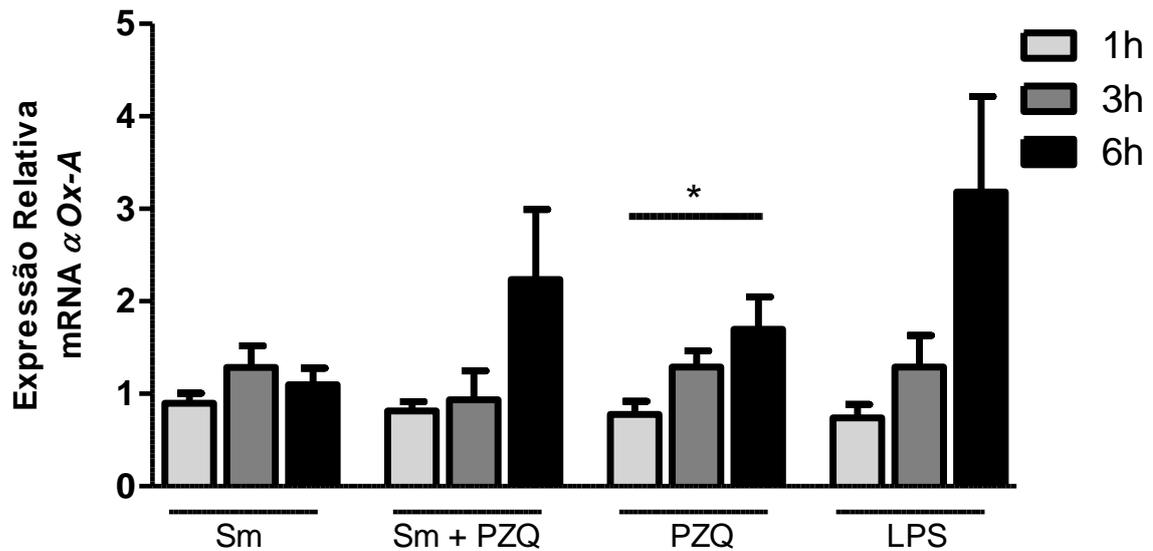


Figura 8. Análise da expressão relativa de mRNA para o gene α OX-A em HUVEC. Culturas de 1, 3 e 6 horas de HUVEC em contato com um casal de verme adulto do *S. mansoni*, um casal após tratamento com PZQ, células desafiadas com o PZQ e LPS. Diferenças estatísticas entre os desafios foram calculadas utilizando ANOVA. * $p < 0,05$

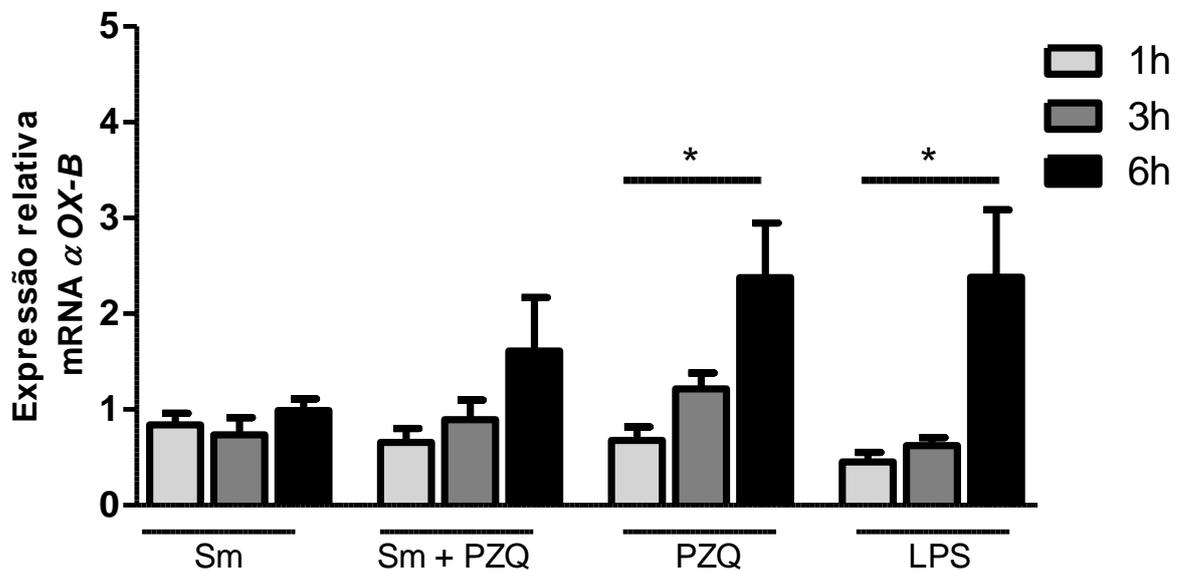


Figura 9. Análise da expressão relativa de mRNA para o gene α OX-B em HUVEC. Culturas de 1, 3 e 6 horas de HUVEC em contato com um casal de verme adulto do *S. mansoni*, um casal após tratamento com PZQ, células desafiadas com o PZQ e LPS. Diferenças estatísticas entre os desafios foram calculadas utilizando ANOVA. * $p < 0,05$

A expressão de mRNA de α OX-C em HUVEC desafiadas com um casal de vermes adultos mostrou uma diminuição significativa entre 1 e 3 horas de cultura [1,181 (0,539); 0,883 (0,3348); $p < 0,05$], seguida de um aumento na expressão relativa no tempo de 6 horas [1,268 (0,382); $p < 0,05$]. Entretanto o mesmo não é

observado nas culturas de HUVEC desafiadas com o casal de vermes adultos expostas a Praziquantel e com HUVEC expostas apenas a Praziquantel (Figura 10).

A expressão relativa de mRNA de α Ox-D em células HUVEC não variou ao longo dos três tempos de cultura (1, 3 e 6 horas) em nenhuma das condições (Figura 11).

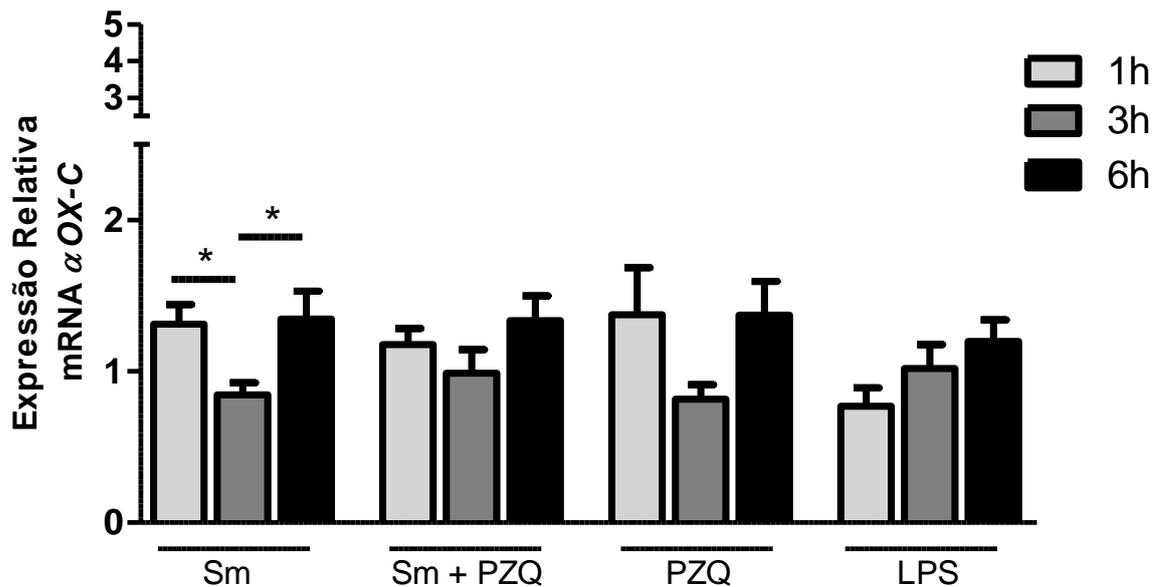


Figura 10. Análise da expressão relativa de mRNA para o gene α Ox-C em HUVEC. Culturas de 1, 3 e 6 horas de HUVEC em contato com um casal de verme adulto do *S. mansoni*, um casal após tratamento com PZQ, células desafiadas com o PZQ e LPS. Diferenças estatísticas entre os desafios foram calculadas utilizando ANOVA. * $p < 0,05$

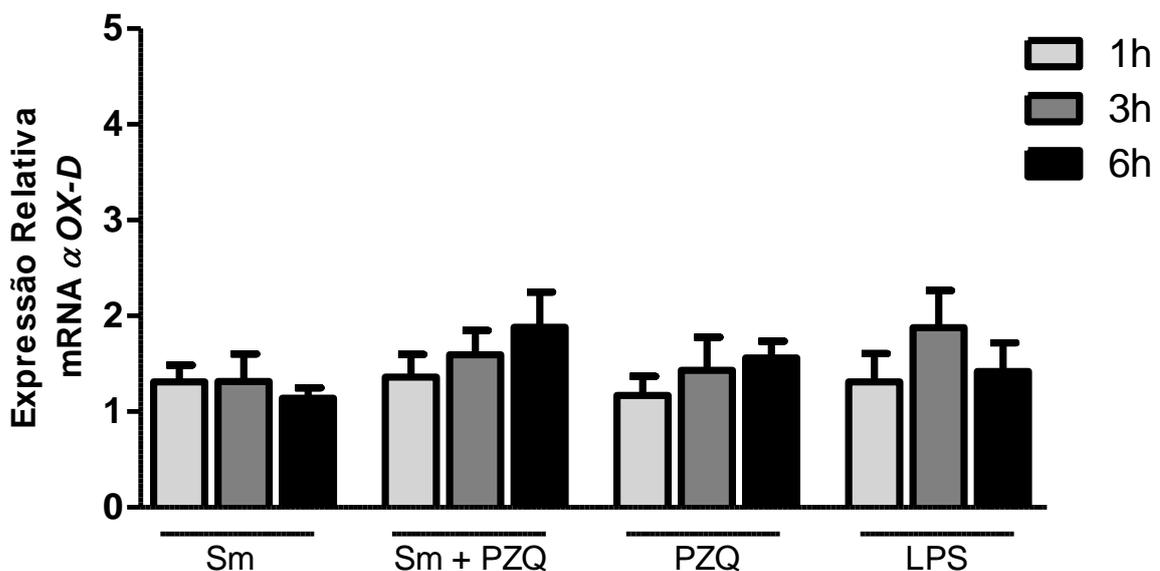


Figura 11. Análise da expressão relativa de mRNA para o gene α Ox-D em HUVEC.

Culturas de 1, 3 e 6 horas de HUVEC em contato com um casal de verme adulto do *S. mansoni*, um casal após tratamento com PZQ, células desafiadas com o PZQ e LPS. Diferenças estatísticas entre os desafios foram calculadas utilizando ANOVA. * $p < 0,05$

A expressão relativa de mRNA de α OX-E em HUVEC desafiadas com um casal de vermes adultos de *S. mansoni* mostrou aumento significativo entre os tempos de 1 [0,925 (0,590)] e 6 horas [1,547 (0,718); $p < 0,05$]. A expressão relativa de mRNA de α Ox-E em HUVEC desafiadas com um casal de vermes adultos tratados com Praziquantel não variou ao longo dos três tempos de cultura (1, 3 e 6 horas). Da mesma forma, quando foi adicionado Praziquantel à cultura de HUVEC também não houve variação na sua expressão (Figura 12).

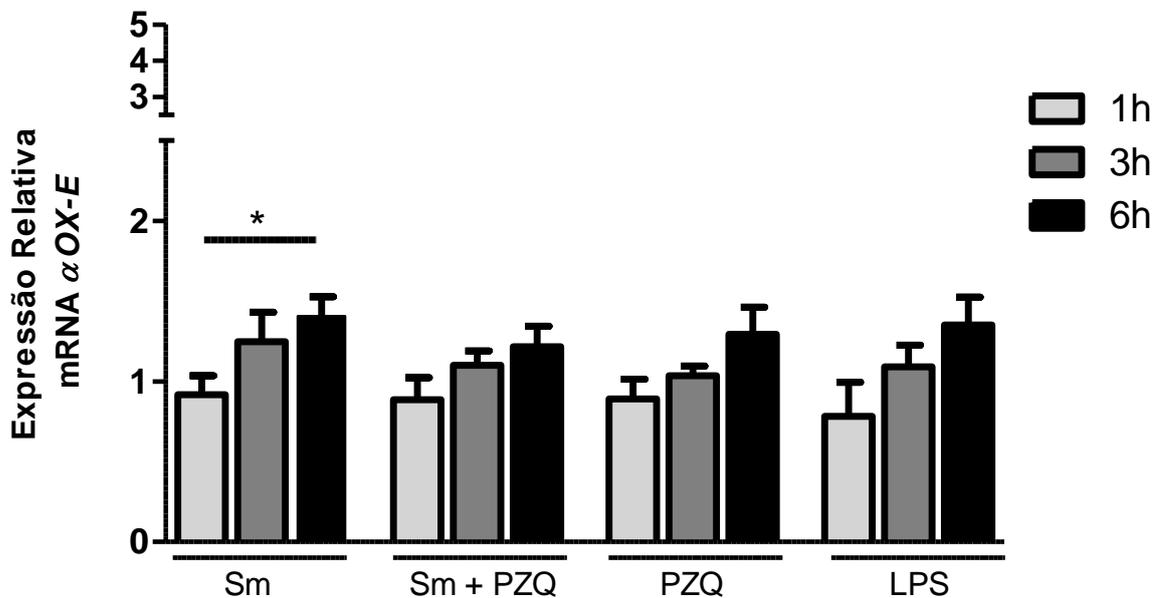


Figura 12. Análise da expressão relativa de mRNA para o gene α OX-E em HUVEC. Culturas de 1, 3 e 6 horas de HUVEC em contato com um casal de verme adulto do *S. mansoni*, um casal após tratamento com PZQ, células desafiadas com o PZQ e LPS. Diferenças estatísticas entre os desafios foram calculadas utilizando ANOVA. * $p < 0,05$

5.2 SOBREVIVÊNCIA DE VERMES ADULTOS DE *S. MANSONI* APÓS EXPOSIÇÃO AO ESTRESSE OXIDATIVO

Os vermes adultos do *S. mansoni* possuem um sistema antioxidante que favorecem sua sobrevivência frente ao estresse oxidativo. Dessa maneira, foi avaliada a capacidade de sobrevivência dos vermes adultos após exposição a um agente oxidante, chamado a partir desse momento de OX. O agente OX foi

escolhido por ser este um substrato da enzima codificada pelo gene α OX-E, além de ser substrato também de enzimas codificadas por outros genes avaliados nesse estudo.

A avaliação da sobrevivência do verme adulto na presença de OX foi realizada a avaliação em dois modelos. O primeiro modelo foi a cultura de verme em meio RPMI suplementado com a adição de 5 diferentes concentrações de OX. O segundo modelo consistiu na exposição de HUVEC a um casal de vermes desafiados com diferentes concentrações de OX. Após 24 horas de cultura foi determinado o score de viabilidade dos vermes em cada um dos modelos.

A distribuição dos scores de viabilidade foi diferente entre as culturas com diferentes concentrações de OX. A morte do verme (score 0) só é observada em culturas com concentração de OX a partir de 400 μ M. Há um aumento progressivo na frequência do score 0 nas concentrações de OX mais altas, sendo 56,3% de score 0 observado na concentração de 400 μ M, 75% em 800 μ M de OX, e chegando a 100% de morte dos vermes na concentração de OX de 1.600 μ M (Figura 13A). Quando os vermes são cultivados juntamente com as HUVEC em diferentes concentrações de OX encontramos resultados diferentes na sobrevivência dos vermes. É possível observar que o score 3, que representa total integridade e motilidade e conseqüentemente melhor condição de viabilidade, aparece até mesmo em concentrações mais altas de OX. A concentração de 400 μ M apresenta 50% de vermes com score 3, enquanto que 33,3% em 800 μ M e 22,2% na concentração de 1.600 μ M de OX. Por outro lado, quando os vermes são desafiados com 800 μ M não foi observada nenhuma morte (score 0), já na concentração de 1.600 μ M 61,1% dos vermes estavam mortos (Figura 13B).

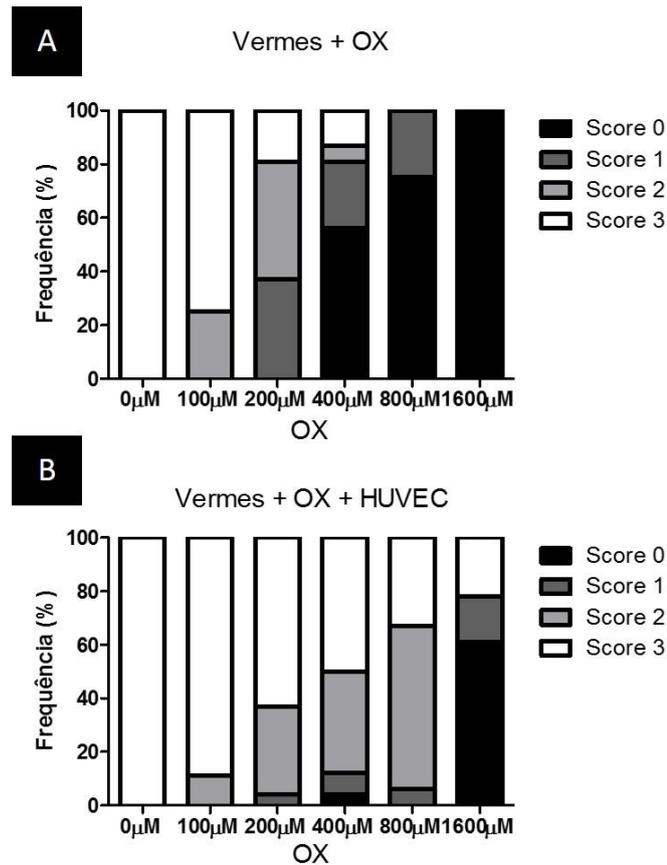


Figura 13. Análise da frequência dos scores de viabilidade de vermes de *S. mansoni* desafiados com OX.

A. Vermes adultos de *S. mansoni* desafiados com OX. B. Vermes adultos de *S. mansoni* cultivados com células HUVEC e desafiados com OX.

Avaliamos também a frequência de sobrevivência entre os modelos, e para isso, foram considerados vermes vivos aqueles que foram classificados com score 1,2 e 3, e os vermes não-vivos aqueles que apresentaram score 0. Quando comparamos a frequência de sobrevivência entre os modelos, foi possível observar que nas concentrações de 400µM e 800µM há um aumento significativo na frequência de sobrevivência quando os vermes são cultivados com OX e células HUVEC em comparação à cultura apenas dos vermes com OX, na ausência de HUVEC (Figura 14).

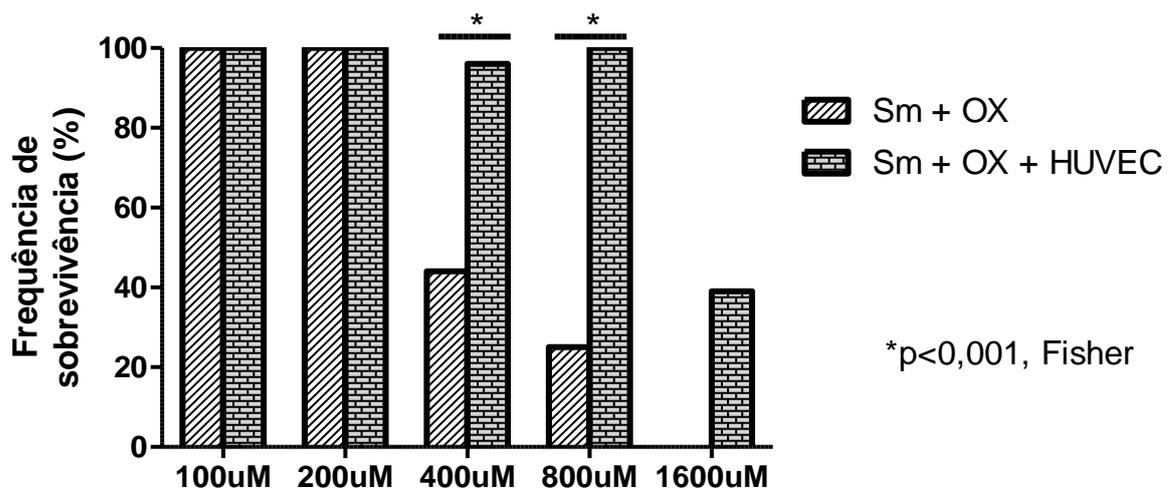


Figura 14. Análise da frequência de sobrevivência dos vermes de *S. mansoni* desafiados com OX e de vermes cultivados com células HUVEC expostos a OX. Diferenças estatísticas entre os desafios foram calculadas utilizando o teste exato de Fisher. *p<0,05.

5.3 PROTEÇÃO DO VERME MEDIADA POR CÉLULAS HUVEC OU AOX-E

Na tentativa de avaliar se o agente antioxidante α OX-E é capaz de anular os efeitos danosos ao verme provocados pelo OX, de forma semelhante ao observado nas culturas com HUVEC, foi proposta uma curva de sobrevivência dos vermes em três modelos diferentes. O primeiro modelo consiste em vermes adultos do *S. mansoni* desafiados com diferentes concentrações de OX, o segundo modelo apresenta vermes desafiados com OX com a adição de 400 unidades de α OX-E e o terceiro modelo mostra a curva de sobrevivência dos vermes que foram cultivados juntamente com células HUVEC e desafiados com OX.

É possível observar que o primeiro modelo mostra redução na sobrevivência a partir de 400 μ M de OX, enquanto que com os vermes cultivados com as células HUVEC só morreram na concentração mais alta de OX (1.600 μ M). Quando os vermes foram desafiados com OX na presença de α OX-E foi observada uma curva de sobrevivência semelhante à cultura com HUVEC, sendo observados vermes vivos até mesmo em concentrações de OX mais altas. Isso sugere que a α OX-E neutralizou o estresse oxidativo mediado pelo OX. O PZQ (5,15 μ M) foi utilizado como controle positivo e apresentou 100% de morte.

Vermes adultos cultivados com células HUVEC, mesmo após a adição de até 800 μ M de OX se comportam semelhante aos vermes cultivados com α OX-E e OX. A

diferença entre as curvas de sobrevivência foi estatisticamente significativa ($p < 0,0001$).

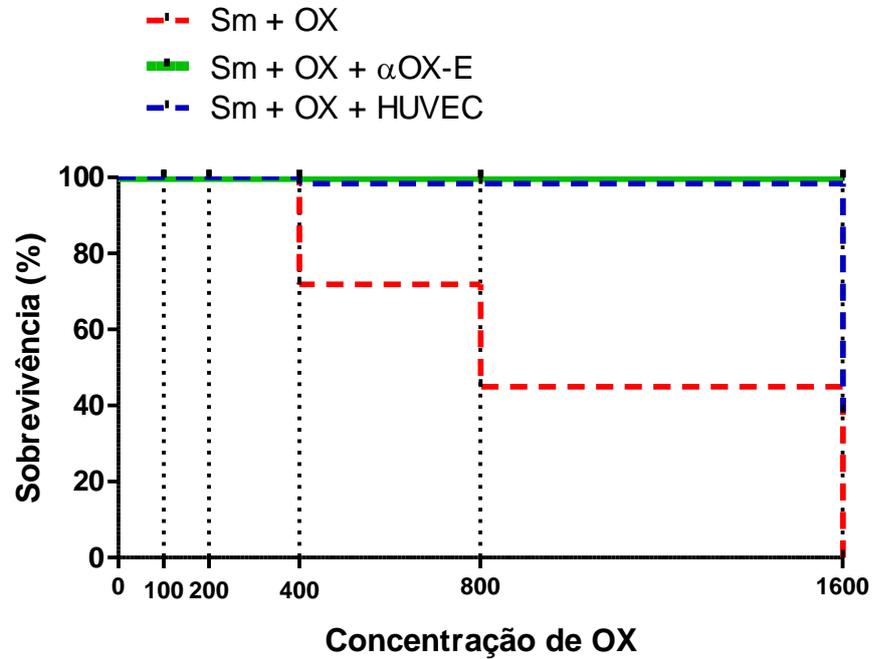


Figura 15. Curva de sobrevivência dos vermes de *S. mansoni* desafiados com OX, de vermes adultos expostos a OX e adição da α OX-E e de vermes cultivados com células HUVEC expostos com OX.

Diferenças estatísticas entre os desafios foram calculadas utilizando o teste de *Log-rank* (*Mantel-Cox*). * $p < 0,05$

6 DISCUSSÃO

Nesse trabalho demonstramos que a expressão em HUVEC de cinco genes envolvidos no controle do estresse oxidativo podem sofrer influência de vermes adultos de *S. mansoni* ou do Praziquantel nas primeiras seis horas de exposição. Os genes α OX-A e α OX-B aumentaram significativamente sua expressão quando células HUVEC foram expostas apenas a Praziquantel, e aumentaram também, apesar de discretamente, quando estas células foram expostas a Praziquantel e vermes adultos. O gene α OX-C demonstrou uma variação na sua expressão quando HUVEC foram expostas a vermes adultos entre a primeira e terceira hora de cultura, retornando, entretanto, aos valores basais após seis horas da cultura. Enquanto que o α OX-D não sofreu qualquer influência da presença do verme ou do Praziquantel. Interessantemente, apenas o gene α OX-E apresentou aumento gradual e significativo durante as seis horas de cultura de HUVEC expostas a *S. mansoni*, sugerindo que os vermes adultos devem apresentar algum mecanismo de indução da expressão desse gene, provavelmente como mecanismo de proteção e escape do estresse oxidativo mediado por células do sistema imune.

O estresse oxidativo participa da patogênese na esquistossomose, principalmente pela ativação de leucócitos em resposta à presença do parasita ou de seus produtos no fígado e em outros órgãos, como, baço e rins. Esses órgãos passam para um estado pró-oxidante pela atividade aumentada da peroxidase eosinofílica (EPO) e desequilíbrio nos mecanismos de defesa antioxidante (ABDALLAHI et al., 1999; GHARIB et al., 1999). Apesar de o estresse oxidativo ser prejudicial para os órgãos onde ocorre a patogênese, principalmente por conta da presença dos ovos, contribuindo significativamente para o dano tecidual, ela é fundamental para a tentativa de eliminação do verme adulto. Dessa forma, sistemas antioxidantes, enzimáticos ou não, são importantes tanto para o hospedeiro evitando assim dano hepático e nos outros tecidos, mas também parece promover uma proteção para o verme do *S. mansoni*.

O verme adulto do *S. mansoni* é capaz de expressar uma série de enzimas com propriedades antioxidantes (MKOJI; SMITH; PRICHARD, 1988b), e nossos resultados sugerem que o verme adulto também seja capaz de induzir células endoteliais a expressarem a α OX-E. Isso pode ser encarado como uma forma de

proteção do verme adulto contra o estresse oxidativo, tornando o ambiente vascular mais propício à sua sobrevivência.

Nesse estudo demonstramos que o agente oxidante OX apresenta boa capacidade esquistossomicida quando em cultura pura com vermes adultos, e que um de seus inibidores, a proteína α OX-E, é capaz de reverter totalmente esse efeito. Para nossa surpresa, a cultura de vermes adultos com HUVEC, na presença de OX, também demonstrou uma reversão do efeito esquistossomicida desse composto, apresentando uma curva de sobrevivência semelhante à observada com seu inibidor. Assim, é possível que as células endoteliais estejam protegendo o verme adulto em seu habitat natural no hospedeiro humano, contribuindo assim para a manutenção e longevidade da infecção.

Até então acreditava-se que a manutenção dos vermes adultos no lúmen vascular era mediada por mecanismos de evasão da resposta imune do hospedeiro como, a aquisição de antígenos hospedeiros ou o desenvolvimento de membranas resistentes ao ataque imune (DESSEIN et al., 1981), pela participação de proteínas no tegumento do parasito (WILSON, 2012), ou pela indução de uma resposta imune do hospedeiro mais regulatória (COLLEY; SECOR, 2014). Mais recentemente tem sido demonstrada que a regulação de alguns genes relacionados aos mecanismos de desintoxicação é essencial para a proteção do verme contra o estresse oxidativo (AVELAR et al., 2019).

Nossos resultados sugerem, de forma inédita, que além dos mecanismos de escape do próprio verme descritos anteriormente, as células endoteliais devem exercer um papel importante na sobrevivência do parasita nesse ambiente. Nesse sentido, o aumento da produção de ROS ou a diminuição do sistema antioxidante em vermes adultos tem sido considerado uma nova abordagem de tratamento (DE PAULA AGUIAR et al., 2016; ALMEER et al., 2018). Um estudo mostrando a associação entre a artemisinina com a hemina *in vivo* demonstrou um efeito nocivo nos esquistossômulos e vermes adultos através da inibição da capacidade antioxidante dos parasitas (EL-LAKKANY; SEIF EL-DIN, 2013).

Nesse estudo mostramos que o Praziquantel é capaz de aumentar a expressão de genes com propriedades antioxidantes em células endoteliais. Isso mostra uma possibilidade de efeito benéfico do Praziquantel não apenas na morte do parasita, como também nos órgãos afetados pelos ovos do *S. mansoni*. O efeito antioxidante do Praziquantel pode atenuar a ação dos radicais livres, contribuindo

para proteger o tecido hepático contra danos oxidativos (JATSA et al., 2019). Entretanto, esse efeito benéfico não é duradouro haja vista o caráter de dose única de Praziquantel para o tratamento da esquistossomose. Alguns estudos têm avaliado a combinação de outros fármacos, ou mesmo extratos naturais, para auxiliar o Praziquantel. O óleo de semente de *Cucurbita pepo* demonstrou um efeito antifibrótico e antioxidante quando combinado com Praziquantel (BESHAY et al., 2019). O extrato de *Ceratonia siliqua* também mostrou efeito antioxidante e melhora da lesão oxidativa induzida por *S. mansoni* no fígado (AL-OLAYAN et al., 2016).

A curcumina, por sua vez tem demonstrado a capacidade de matar os vermes adultos, principalmente por promover um ambiente oxidativo, através da inibição das enzimas antioxidantes do verme GST, GPX e GR (DE PAULA AGUIAR et al., 2016). Outro estudo utilizando 7-epiclusianona (7-epi), uma benzofenona obtida de 'bacupari', um fruto da árvore *Garcinia brasiliensis*, mostrou que a inibição parcial de SOD, enzima antioxidante do verme, causa danos no tegumento. Assim, o parasita fica mais suscetível ao reconhecimento de antígenos, formação de complemento e aderência de granulócitos, ampliando a eficácia da resposta imune do hospedeiro (SILVA et al., 2018).

Dessa forma, se faz necessário a busca por novas estratégias terapêuticas que possam ser associadas ao PZQ. Apesar do PZQ apresentar considerável eficácia, alguns estudos mostram taxas de cura reduzidas e falha terapêutica. Um estudo em modelo experimental, por exemplo, mostrou que o tratamento de camundongos infectados com *S. mansoni* e tratados com múltiplas doses subcurativas desenvolveu resistência a PZQ (VALE et al., 2017). Outros estudos em focos endêmicos mostram que um dos fatores que deve ser observado é que as baixas taxas de cura podem ser devido à presença de vermes imaturos, que são menos susceptíveis ao PZQ, no momento do tratamento, realizado em dose única (RENGANATHAN; CIOLI, 1998). Além disso, o PZQ isoladamente não é capaz de proteger contra reinfecções, um dos principais problemas relacionados à tentativa de eliminação da esquistossomose em áreas endêmicas (ISMAIL et al., 1999).

Esse foi o primeiro estudo a mostrar o possível efeito protetor das células endoteliais sobre o verme adulto de *S. mansoni*. Esse novo conhecimento contribui para o entendimento sobre a manutenção dos vermes adultos no lúmen vascular e gera hipóteses que devem ser investigadas. Esse estudo foi realizado utilizando células de linhagem e pode não representar exatamente o que ocorre *in vivo*.

Entretanto, as células HUVEC são consideradas bons modelos utilizados nos estudos com células endoteliais (PARK et al., 2006; LOPES et al., 2014). Além disso, a partir dos resultados obtidos com esse trabalho, outras abordagens utilizando outros modelos podem ser investigados. Além disso, apesar de ser constatado o aumento na expressão de α OX-E, é necessário dosar a concentração da enzima no sobrenadante das culturas.

A partir desse conhecimento novas estratégias terapêuticas podem ser propostas na tentativa de eliminar a esquistossomose como um problema de saúde pública. No Brasil está disponível comercialmente e aprovado pela ANVISA um medicamento (FARM-X), utilizado atualmente para tratar outra infecção, mas que é capaz de bloquear seletivamente o agente antioxidante α OX-E. Assim, é possível que o uso desse medicamento, associado ao Praziquantel, seja capaz de melhorar o desempenho do Praziquantel. Além disso, é possível também que, em áreas endêmicas, a possibilidade de uso prolongado do FARM-X seja capaz de reduzir a taxa de reinfecção. É fundamental que sejam realizados estudos *in vitro* e em modelos experimentais para responder essas perguntas científicas, para que seja gerada evidência científica que dê respaldo à proposição do uso de FARM-X como adjuvante à terapêutica da esquistossomose.

A associação entre o Praziquantel e o FARM-X pode ser utilizado no tratamento de casos que apresentam falha terapêutica. A OMS recomenda como medida profilática para a esquistossomose que seja realizado o tratamento em massa em regiões endêmicas (WHO, 2006). Apesar de ter estudos que mostrem a eficiência do Praziquantel do tratamento em massa de escolares na prevenção do desenvolvimento da esquistossomose na vida adulta, alguns estudos mostram que o tratamento não protege contra a reinfecção (PICA-MATTOCCIA; CIOLI, 2004). Dessa forma, residentes de área endêmica em constante reinfecção são expostos a tratamentos repetidos, que podem ocasionar casos refratários à terapia. Considerando que, o tratamento com o Praziquantel é recomendado como medida não apenas curativa, mas também preventiva, o tratamento do PZQ associado com FARM-X pode ser proposto no esquema de tratamento em massa realizado aqui no Brasil visando principalmente falha terapêutica ou casos refratários ao tratamento.

7 CONCLUSÃO

Nossos achados contribuem para o entendimento da participação das células endoteliais durante a esquistossomose. Utilizando o modelo de células HUVEC demonstramos que essas células desafiadas com o verme adulto aumentam a expressão do gene antioxidante α OX-E, sugerindo que esse seja um mecanismo de proteção do verme para escape do estresse oxidativo. Além disso, mostramos que o Praziquantel é capaz de aumentar a expressão de genes com propriedades antioxidantes em células endoteliais. Isso mostra uma possibilidade de efeito benéfico não apenas na morte do parasita, como também nos órgãos afetados pelos ovos do *S. mansoni*.

Nesse estudo demonstramos também que culturas de vermes adultos com células HUVEC, na presença do agente oxidante OX, demonstrou uma reversão do efeito esquistossomicida desse composto, sugerindo um efeito protetor das células endoteliais sobre o verme adulto de *S. mansoni*.

Os novos conhecimentos que foram gerados com este estudo poderão auxiliar novas abordagens de tratamentos adjuvantes ao Praziquantel, para que, em áreas endêmicas, seja capaz de reduzir a taxa de reinfeção.

REFERÊNCIAS

- ABDALLAHI, O. M. *et al.* Visualization of oxygen radical production in mouse liver in response to infection with schistosoma mansoni. **Liver**, v. 19, n. 6, p. 495-500, 1999.
- AHMED, S. M. *et al.* Nrf2 signaling pathway: Pivotal roles in inflammation. **Biochim. Biophys Acta Mol. Basis Dis.**, v. 1863, n. 2, p. 585-597, 2017.
- AL-OLAYAN, E. M. *et al.* Ceratonia siliqua pod extract ameliorates schistosoma mansoni-induced liver fibrosis and oxidative stress. **BMC Complement Altern. Med.**, v. 16, n. 1, p. 434, 2016.
- AL-SAWAF, O. *et al.* Nrf2 in health and disease: Current and future clinical implications. **Clin. Sci.**, v. 129, n. 12, p. 989-999, 2015.
- ALMEER, R. S. *et al.* Ziziphus spina-christi leaf extract ameliorates schistosomiasis liver granuloma, fibrosis, and oxidative stress through downregulation of fibrinogenic signaling in mice. **PLoS One**, v. 13, n. 10, p. e0204923, 2018.
- ANDRADE, Z. A patologia da esquistossomose humana. In: FIOCRUZ (ed.). **Schistosoma mansoni e esquistossomose: Uma visão multidisciplinar**. 2008. p. 546-568.
- AVELAR, L. *et al.* Smp38 map kinase regulation in schistosoma mansoni: Roles in survival, oviposition, and protection against oxidative stress. **Front. Immunol.**, v. 10, p. 21, 2019.
- BAPTISTA, A. P.; ANDRADE, Z. A. Angiogenesis and schistosomal granuloma formation. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 100, n. 2, p. 183-185, 2005.
- BELLEZZA, I. *et al.* Nrf2-keap1 signaling in oxidative and reductive stress. **Biochim. Biophys Acta Mol. Cell Res.**, v. 1865, n. 5, p. 721-733, 2018.
- BESHAY, E. V. N. *et al.* Schistosomicidal, antifibrotic and antioxidant effects of cucurbita pepo l. Seed oil and praziquantel combined treatment for schistosoma mansoni infection in a mouse model. **J. Helminthol.**, v. 93, n. 3, p. 286-294, 2019.
- BORRA, R. C. *et al.* A simple method to measure cell viability in proliferation and cytotoxicity assays. **Braz. Oral Res.**, v. 23, n. 3, p. 255-262, 2009.
- BRASIL. **Vigilância da esquistossomose mansoni**. 4, 2014. 144 p.
- BRUNET, L. R.; KOPF, M. A.; PEARCE, E. J. Schistosoma mansoni: Il-4 is necessary for concomitant immunity in mice. **J. Parasitol.**, v. 85, n. 4, p. 734-736, 1999.
- CHEN, B. *et al.* The role of nrf2 in oxidative stress-induced endothelial injuries. **J. Endocrinol.**, v. 225, n. 3, p. R83-99, 2015.

CHIARAMONTE, M. G. *et al.* An il-13 inhibitor blocks the development of hepatic fibrosis during a t-helper type 2-dominated inflammatory response. **J. Clin. Invest.**, v. 104, n. 6, p. 777-785, 1999.

COLLEY, D. G.; SECOR, W. E. Immunology of human schistosomiasis. **Parasite Immunol.**, v. 36, n. 8, p. 347-357, 2014.

DE JESUS, A. R. *et al.* Association of type 2 cytokines with hepatic fibrosis in human schistosoma mansoni infection. **Infect. Immun.**, v. 72, n. 6, p. 3391-3397, 2004.

DE JESUS, A. R. *et al.* Clinical and immunologic evaluation of 31 patients with acute schistosomiasis mansoni. **J. Infect. Dis.**, v. 185, n. 1, p. 98-105, 2002.

DE OLIVEIRA, R. B. *et al.* Schistosoma mansoni infection causes oxidative stress and alters receptor for advanced glycation endproduct (rage) and tau levels in multiple organs in mice. **Int. J. Parasitol.**, v. 43, n. 5, p. 371-379, 2013.

DE PAULA AGUIAR, D. *et al.* Curcumin generates oxidative stress and induces apoptosis in adult schistosoma mansoni worms. **PLoS One**, v. 11, n. 11, p. e0167135, 2016.

DE SOUZA RDA, P. *et al.* Cytokine and chemokine profile in individuals with different degrees of periportal fibrosis due to schistosoma mansoni infection. **J. Parasitol. Res.**, v. 2012, n., p. 394981, 2012.

DESSEIN, A. *et al.* Immune evasion by schistosoma mansoni: Loss of susceptibility to antibody or complement-dependent eosinophil attack by schistosomula cultured in medium free of macromolecules. **Parasitology**, v. 82, n. Pt 3, p. 357-374, 1981.

DEWALICK, S. *et al.* Binding of von willebrand factor and plasma proteins to the eggshell of schistosoma mansoni. **Int. J. Parasitol.**, v. 44, n. 5, p. 263-268, 2014.

DOENHOFF, M. J.; CIOLI, D.; UTZINGER, J. Praziquantel: Mechanisms of action, resistance and new derivatives for schistosomiasis. **Curr. Opin. Infect. Dis.**, v. 21, n. 6, p. 659-667, 2008.

EL-LAKKANY, N. M.; SEIF EL-DIN, S. H. Haemin enhances the in vivo efficacy of artemether against juvenile and adult schistosoma mansoni in mice. **Parasitol. Res.**, v. 112, n. 5, p. 2005-2015, 2013.

FALLON, P. G. Schistosome resistance to praziquantel. **Drug Resist. Updat.**, v. 1, n. 4, p. 236-241, 1998.

FILE, S. Interaction of schistosome eggs with vascular endothelium. **J. Parasitol.**, v. 81, n. 2, p. 234-238, 1995.

FREEDMAN, D. O.; OTTESEN, E. A. Eggs of schistosoma mansoni stimulate endothelial cell proliferation in vitro. **J. Infect. Dis.**, v. 158, n. 3, p. 556-562, 1988.

GHARIB, B. *et al.* Development of eosinophil peroxidase activity and concomitant alteration of the antioxidant defenses in the liver of mice infected with schistosoma mansoni. **J. Hepatol.**, v. 30, n. 4, p. 594-602, 1999.

GOZZELINO, R.; JENEY, V.; SOARES, M. P. Mechanisms of cell protection by heme oxygenase-1. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, v. 50, n., p. 323-354, 2010.

GRANT, A. V. *et al.* Polymorphisms in il10 are associated with total immunoglobulin e levels and schistosoma mansoni infection intensity in a brazilian population. **Genes Immun.**, v. 12, n. 1, p. 46-50, 2011.

HOKKE, C. H.; FITZPATRICK, J. M.; HOFFMANN, K. F. Integrating transcriptome, proteome and glycome analyses of schistosoma biology. **Trends Parasitol.**, v. 23, n. 4, p. 165-174, 2007.

ISMAIL, M. *et al.* Resistance to praziquantel: Direct evidence from schistosoma mansoni isolated from egyptian villagers. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 60, n. 6, p. 932-935, 1999.

JATSA, H. B. *et al.* Evaluation of the schistosomicidal, antioxidant and anti-inflammatory activities of the ethyl acetate fraction from ozoroa pulcherrima schweinf. Roots on schistosoma mansoni-induced liver pathology in mice and its phytochemical characterization. **J. Ethnopharmacol.**, v. 238, n., p. 111883, 2019.

KATZ, N. **Inquérito nacional de prevalência da esquistossomose mansoni e geo-helmintoses.** 2018. 76 p.

KAZURA, J. W. *et al.* Role of cell-generated hydrogen peroxide in granulocyte-mediated killing of schistosomula of schistosoma mansoni in vitro. **J. Clin. Invest.**, v. 67, n. 1, p. 93-102, 1981.

KING, C. L. *et al.* B cell sensitization to helminthic infection develops in utero in humans. **J. Immunol.**, v. 160, n. 7, p. 3578-3584, 1998.

LA FLAMME, A. C. *et al.* Il-4 plays a crucial role in regulating oxidative damage in the liver during schistosomiasis. **J. Immunol.**, v. 166, n. 3, p. 1903-1911, 2001.

LAMBERTUCCI, J. R. Acute schistosomiasis: Clinical, diagnostic and therapeutic features. **Rev. Inst. Med. Trop Sao Paulo**, v. 35, n. 5, p. 399-404, 1993.

LEMOS, Q. T.; ANDRADE, Z. A. Angiogenesis and experimental hepatic fibrosis. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 105, n. 5, p. 611-614, 2010.

LI, C. *et al.* Functional analysis of the role of glutathione peroxidase (gpx) in the ros signaling pathway, hyphal branching and the regulation of ganoderic acid biosynthesis in ganoderma lucidum. **Fungal Genet. Biol.**, v. 82, n., p. 168-180, 2015.

LIU, R. *et al.* Efficacy of praziquantel and artemisinin derivatives for the treatment and prevention of human schistosomiasis: A systematic review and meta-analysis. **Parasit. Vectors**, v. 4, n., p. 201, 2011.

LOMBARDO, F. C. *et al.* Life cycle maintenance and drug-sensitivity assays for early drug discovery in schistosoma mansoni. **Nat. Protoc.**, v. 14, n. 2, p. 461-481, 2019.

LOPES, R. *et al.* Schizophrenia and cancer: Is angiogenesis a missed link? **Life Sci.**, v. 97, n. 2, p. 91-95, 2014.

LOVERDE, P. T.; CARVALHO-QUEIROZ, C.; COOK, R. Vaccination with antioxidant enzymes confers protective immunity against challenge infection with schistosoma mansoni. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 99, n. 5 Suppl 1, p. 37-43, 2004.

LU, J.; HOLMGREN, A. The thioredoxin antioxidant system. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 66, n., p. 75-87, 2014.

MCMANUS, D. P. *et al.* Schistosomiasis. **Nat. Rev. Dis. Primers**, v. 4, n. 1, p. 13, 2018.

MICHIELS, C. Endothelial cell functions. **J. Cell Physiol.**, v. 196, n. 3, p. 430-443, 2003.

MKOJI, G. M.; SMITH, J. M.; PRICHARD, R. K. Antioxidant systems in schistosoma mansoni: Correlation between susceptibility to oxidant killing and the levels of scavengers of hydrogen peroxide and oxygen free radicals. **Int. J. Parasitol.**, v. 18, n. 5, p. 661-666, 1988a.

MKOJI, G. M.; SMITH, J. M.; PRICHARD, R. K. Antioxidant systems in schistosoma mansoni: Evidence for their role in protection of the adult worms against oxidant killing. **Int. J. Parasitol.**, v. 18, n. 5, p. 667-673, 1988b.

NIH. Livertox: Clinical and research information on drug-induced liver injury. Disponível em: <https://livertox.nih.gov>, 2017.

NITURE, S. K.; KHATRI, R.; JAISWAL, A. K. Regulation of nrf2-an update. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 66, n., p. 36-44, 2014.

NOGI, T. *et al.* A novel biological activity of praziquantel requiring voltage-operated ca²⁺ channel beta subunits: Subversion of flatworm regenerative polarity. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 3, n. 6, p. e464, 2009.

OLIVEIRA, R. R. *et al.* Factors associated with resistance to schistosoma mansoni infection in an endemic area of bahia, brazil. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 86, n. 2, p. 296-305, 2012.

PARK, H. J. *et al.* Human umbilical vein endothelial cells and human dermal microvascular endothelial cells offer new insights into the relationship between lipid metabolism and angiogenesis. **Stem Cell Rev.**, v. 2, n. 2, p. 93-102, 2006.

PEARCE, E. J.; MACDONALD, A. S. The immunobiology of schistosomiasis. **Nat. Ver. Immunol.**, v. 2, n. 7, p. 499-511, 2002.

PELLEGRINO, J., SIQUEIRA, A. F. Técnica de perfusão para colheita de schistosoma mansoni em cobaias experimentalmente infestadas. **Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais**, v., n., p. 589-587, 1956.

PICA-MATTOCCIA, L.; CIOLI, D. Sex- and stage-related sensitivity of schistosoma mansoni to in vivo and in vitro praziquantel treatment. **Int. J. Parasitol.**, v. 34, n. 4, p. 527-533, 2004.

PICA-MATTOCCIA, L. *et al.* Schistosoma mansoni: Lack of correlation between praziquantel-induced intra-worm calcium influx and parasite death. **Exp. Parasitol.**, v. 119, n. 3, p. 332-335, 2008.

POBER, J. S.; SESSA, W. C. Evolving functions of endothelial cells in inflammation. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 7, n. 10, p. 803-815, 2007.

RABELLO, A. L. *et al.* Humoral immune responses in patients with acute schistosoma mansoni infection who were followed up for two years after treatment. **Clin. Infect. Dis.**, v. 24, n. 3, p. 304-308, 1997.

ROSS, A. G. *et al.* Katayama syndrome. **Lancet Infect. Dis.**, v. 7, n. 3, p. 218-224, 2007.

RENGANATHAN; CIOLI. An International Initiative on Praziquantel Use. **Parasitology Today**, v. 14, n. 10, p. 390-391, 1998.

ROVER JUNIOR, L. H. *et al.* **Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutatona associado a métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo.** 2001

ROWEL, C. *et al.* Environmental epidemiology of intestinal schistosomiasis in uganda: Population dynamics of biomphalaria (gastropoda: Planorbidae) in lake albert and lake victoria with observations on natural infections with digenetic trematodes. **Biomed. Res. Int.**, v. 2015, n., p. 717261, 2015.

SANIN, D. E. *et al.* Helminth infection and commensal microbiota drive early il-10 production in the skin by cd4+ t cells that are functionally suppressive. **PLoS Pathog.**, v. 11, n. 5, p. e1004841, 2015.

SCHWARTZ, C.; FALLON, P. G. Schistosoma "eggs-iting" the host: Granuloma formation and egg excretion. **Front. Immunol.**, v. 9, n., p. 2492, 2018.

SHIREMAN, P. K.; PEARCE, W. H. Endothelial cell function: Biologic and physiologic functions in health and disease. **AJR Am. J. Roentgenol.**, v. 166, n. 1, p. 7-13, 1996.

SILVA, M. S. *et al.* The natural compound 7-epiclusianone inhibits superoxide dismutase activity in schistosoma mansoni. **J. Helminthol.**, v. 92, n. 5, p. 535-543, 2018.

SMITHERS, S. R.; TERRY, R. J. The infection of laboratory hosts with cercariae of schistosoma mansoni and the recovery of the adult worms. **Parasitology**, v. 55, n. 4, p. 695-700, 1965.

STURTZEL, C. Endothelial cells. **Adv. Exp. Med. Biol.**, v. 1003, n., p. 71-91, 2017.

TSANG, C. K. *et al.* Superoxide dismutase 1 acts as a nuclear transcription factor to regulate oxidative stress resistance. **Nat. Commun.**, v. 5, n., p. 3446, 2014.

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

VAN DEN BIGGELAAR, A. H. *et al.* Decreased atopy in children infected with schistosoma haematobium: A role for parasite-induced interleukin-10. **Lancet**, v. 356, n. 9243, p. 1723-1727, 2000.

VERJOVSKI-ALMEIDA, S. *et al.* Schistosome transcriptome: Insights and perspectives for functional genomics. **Trends Parasitol.**, v. 20, n. 7, p. 304-308, 2004.

WANG, W.; WANG, L.; LIANG, Y. S. Susceptibility or resistance of praziquantel in human schistosomiasis: A review. **Parasitol. Res.**, v. 111, n. 5, p. 1871-1877, 2012.

WHO. Epidemiological situation Disponível em: <https://www.who.int/schistosomiasis/epidemiology/en/>. Acesso em: Date Accessed

WHO. **Preventive chemotherapy in human helminthiasis : Coordinated use of anthelmintic drugs in control interventions : A manual for health professionals and programme managers.** 2006

WHO. Strategy Disponível em: <https://www.who.int/schistosomiasis/strategy/en/>. Acesso em: Date Accessed

WHO. Weekly epidemiological record. **World Health Organization**, v. 9, n., p. 73-80, 2011.

WILSON, M. S. *et al.* IL-10 blocks the development of resistance to re-infection with schistosoma mansoni. **PLoS Pathog.**, v. 7, n. 8, p. e1002171, 2011.

WILSON, R. A. Virulence factors of schistosomes. **Microbes Infect.**, v. 14, n. 15, p. 1442-1450, 2012.

WU, Y. P. *et al.* Differential platelet adhesion to distinct life-cycle stages of the parasitic helminth schistosoma mansoni. **J. Thromb. Haemost.**, v. 5, n. 10, p. 2146-2148, 2007.

ZWANG, J.; OLLIARO, P. L. Clinical efficacy and tolerability of praziquantel for intestinal and urinary schistosomiasis-a meta-analysis of comparative and non-comparative clinical trials. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 8, n. 11, p. e3286, 2014.