

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS**

**MARISA DE OLIVEIRA LOPES**

**IMPACTOS DA ASSOCIAÇÃO DE DOXICICLINA E GENTAMICINA COM  
PRAZIQUANTEL NO TRATAMENTO DA ESQUISTOSSOMOSE MURINA AGUDA  
E ANÁLISE COMPARATIVA DE MICROBIOTAS**

**ALFENAS/MG**

**2024**

**MARISA DE OLIVEIRA LOPES**

**IMPACTOS DA ASSOCIAÇÃO DE DOXICICLINA E GENTAMICINA COM  
PRAZIQUANTEL NO TRATAMENTO DA ESQUISTOSSOMOSE MURINA AGUDA  
E ANÁLISE COMPARATIVA DE MICROBIOTAS**

Tese apresentado como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Ciências Farmacêuticas pela Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Marcos José Marques  
Coorientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Raquel Lopes Martins Souza<sup>†</sup>

**ALFENAS/MG**

**2024**

Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas  
Biblioteca Central

Lopes, Marisa de Oliveira.

Impactos da associação de doxiciclina e gentamicina com praziquantel no tratamento da esquistossomose murina aguda e análise comparativa de microbiotas / Marisa de Oliveira Lopes. - Alfenas, MG, 2024.  
158 f. : il. -

Orientador(a): Marcos José Marques.

Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2024.  
Bibliografia.

1. Schistosoma mansoni. 2. Combinação de medicamentos . 3. Histologia . 4. Metagenômica. 5. Microbiota. I. Marques, Marcos José, orient. II. Título.

Ficha gerada automaticamente com dados fornecidos pelo autor.

MARISA DE OLIVEIRA LOPES

**"IMPACTOS DA ASSOCIAÇÃO DE DOXICICLINA E GENTAMICINA COM PRAZIQUANTEL NO TRATAMENTO DA  
ESQUISTOSSOMOSE MURINA AGUDA  
E ANÁLISE COMPARATIVA DE MICROBIOTAS "**

O(A) Presidente da banca examinadora abaixo assina a aprovação da Tese apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Ciências Farmacêuticas

Aprovada em: 30 de agosto de 2024.

Prof. Dr. Marcos José Marques  
Presidente da Banca Examinadora  
Instituição: Universidade Federal de Alfenas

Profa. Dra. Florence Mara Rosa  
Instituição: Universidade Federal de Juiz de Fora

Prof. Dr. Marcell Crispim  
Instituição: Universidade Federal de Alfenas

Profa. Dra. Amanda Latercia Tranches Dias  
Instituição: Universidade Federal de Alfenas

Profa. Dra. Maria Rita Rodrigues  
Instituição: Universidade Federal de Alfenas



Documento assinado eletronicamente por **Marcos José Marques, Professor do Magistério Superior**, em 05/09/2024, às 15:16, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por seu Amor e pela sua infinita Misericórdia, sou apenas um vaso de barro em suas mãos;

À Universidade Federal de Alfenas, na qual obtive a graduação, pós-graduação e da qual eu honro em fazer parte no cargo Técnico-Administrativo em Educação;

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas pela oportunidade de cursar o mestrado e o doutorado nesta instituição;

À Faculdade de Nutrição e seus professores que sempre me incentivaram a seguir o caminho da qualificação;

Ao meu orientador Prof. Dr. Marcos José Marques pela oportunidade, confiança, e principalmente pela amizade e apoio nos momentos mais difíceis;

À Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Raquel Lopes Martins Souza<sup>†</sup>, "*in memoriam*", as memórias são flores que cultivamos no jardim da saudade...as flores que plantou nesta existência serão sempre cultivadas com carinho;

Ao Prof. Dr. Luiz Felipe Leomil Coelho, pela imensa colaboração com as análises de metataxonômica;

Ao Projeto RED-00132-16 Mineração e Análises Sistêmicas de Microbiomas (Min.A.S. Microbiomas) pela parceria com as análises de metataxonômica, que foi imprescindível para a conclusão deste trabalho;

Ao pós-doc Erik van Tilburg Bernardes, pelas análises de bioinformática que contribuíram e enriqueceram este trabalho;

Ao Prof. Dr. Bruno Martins Dala Paula, pela orientação no Estágio Docente I e II, a minha gratidão;

Ao amigo e colega de trabalho Matheus Pereira de Araújo, que me auxiliou desde o início com as técnicas experimentais e na orientação com as técnicas em histologia e, além disso me incentivou sempre a seguir em frente;

Ao amigo de trabalho e de pós-graduação Luis Felipe Cunha dos Reis, a quem recorri inúmeras vezes e que, com paciência, me ajudou e contribuiu enormemente na construção deste trabalho;

À Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Aline Pereira Castro, pela infecção dos animais e auxílio insubstituível na execução da primeira parte experimental deste trabalho;

À Dr.<sup>a</sup> Naiane Silva Cardoso, pelo auxílio na realização das dosagens dos parâmetros bioquímicos;

À mestranda Micaella Sales Pereira, pelo auxílio e companhia na segunda parte experimental deste trabalho;

À Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Juliana Barbosa Nunes e à MSc Amanda Bellini, pela inestimável ajuda com a análise de PCR;

Ao mestrando Sergio Pereira Lima Neto, pela prestatividade ímpar na execução da segunda parte experimental;

Às biomédicas Bárbara Pacheco Pires e Júlia de Jesus Fernandes, alunas do TCC, por toda contribuição;

Ao amigo Cláudio Daniel Cerdeira, pelas discussões, contribuições e questionamentos que me ajudaram sempre a enxergar esta pesquisa de forma mais ampla;

Às colegas e amigas TAEs Maria Ângela Rodrigues e Laiane Corsini Rocha, por transmitir seus conhecimentos quanto às técnicas e análises histológicas;

Ao colega de doutorado Marcos Javier Espino Ureña, que veio de longe e trouxe consigo a Paz dos que conhecem o Cristo;

À Enilda Aparecida Candelori de Carvalho, sempre presente e prestativa para toda ajuda necessária;

À Fabiana Silva, pelo excelente trabalho desenvolvido na secretaria do curso de pós-graduação em Ciências Farmacêuticas;

Aos amigos Roqueline Ametila e Glória Martins de Freitas, Alan Kardec de Souza, Sueli Fernandes e Adriana Galvão, que partilharam comigo os momentos de ansiedade: quem tem amigos nunca está só;

À amiga Ana Flávia da Silva Amorim, compartilhamos ansiedades no mestrado e no doutorado, agora a vitória se aproxima, mas sempre ficará a gratidão pelas partilhas ao longo do caminho;

Ao esposo, Antonio Alfredo, não foram anos fáceis nas nossas jornadas pessoais, mas vencemos cada batalha juntos. A grande lição que fica é que tudo que é mortal é passageiro, só não passa o que é Eterno, como o verdadeiro Amor!

Aos filhos que muito amo, Clara e Rafael, vocês partilharam comigo muitos momentos deste doutorado e, na dúvida, chame os universitários;

Ruy Dias Lopes<sup>†</sup> e Mercedes de Oliveira Lopes. Pai e Mãe, gratidão pela vida e pelos valores recebidos;

Aos Professores(as) que participaram de todas as bancas examinadoras: Defesa de Projeto, Seminários Gerais, Qualificação e Defesa de Tese, e que contribuíram imensamente com sugestões e avaliações para a lapidação deste trabalho;

A todos vocês, Gratidão!!!

E por fim, quero também reconhecer e honrar a vida dos animais que foram eutanasiados para a execução desta pesquisa, que este ato seja para o avanço do conhecimento científico e, eventualmente, para o benefício da saúde e bem-estar de muitas outras vidas.

Não conheço quem tenha se desenvolvido sozinho, gratidão a todas as pessoas que com carinho, trabalho, dedicação e paciência me ajudaram a escrever a minha trajetória. A verdadeira recompensa nunca virá de mãos humanas, que Deus abençoe a todos vocês!

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

**“Tenho a impressão de ter sido uma criança brincando à beira-mar, divertindo-me em descobrir uma pedrinha mais lisa ou uma concha mais bonita que as outras, enquanto o imenso oceano da Verdade continua misterioso diante de meus olhos.”**

**Isaac Newton**



## RESUMO

**Introdução e objetivos:** A esquistossomose ocorre nas formas aguda e crônica, diferindo na patogênese e na resposta imune do hospedeiro, com impactos da microbiota e de medicamentos no desfecho da doença. Este estudo avaliou os efeitos do praziquantel (PZQ) em associação com doxiciclina (DOX) e gentamicina (GEN) no tratamento de camundongos BALB/c infectados com *Schistosoma mansoni* na fase aguda da esquistossomose, além de uma análise metataxonômica de fezes e fígado de camundongos não-infectados e infectados. **Métodos:** Foram avaliados os granulomas hepáticos e intestinais por análises histopatológicas, quantificação da carga parasitária no tecido hepático (PCR em tempo real e contagem de ovos) e parâmetros bioquímicos: ALT, AST, Fosfatase alcalina e albumina por métodos enzimáticos colorimétricos. A análise metataxonômica, utilizando sequenciamento do gene 16S rRNA de fezes e fígado, foi feita em dois grupos experimentais, não-infectados e infectados. **Principais achados:** No grupo infectado e tratado com a associação PZQ+DOX foram observados granulomas com um diâmetro maior e um extenso infiltrado de células inflamatórias ao redor de ovos de *S. mansoni*, característicos do tipo necrótico-exsudativo, além de uma desorganização na estrutura de colagenização. Nos camundongos do grupo infectado e tratados com PZQ+GEN observou-se que os granulomas eram de dimensões reduzidas, apresentando maior quantidade de células gigantes ao redor dos ovos e fibroblastos organizados em camadas concêntricas, embora estas alterações não diferiram estatisticamente. Houve maior expressão percentual de granulomas na fase exsudativa-produtiva com os tratamentos, sendo o grupo tratado com a associação PZQ+GEN o que apresentou a maior porcentagem destes granulomas em relação ao grupo tratado somente com o PZQ. Todos os tratamentos causaram uma diminuição significativa na redução do número de ovos no fígado como também redução de material genético de *S. mansoni* por mg de tecido hepático analisado por PCR-Tempo real. A associação PZQ+DOX potencializou o dano inflamatório associado aos granulomas hepáticos, como também observado em maiores níveis de ALT. Nos animais tratados com PZQ+GEN há um aumento significativo nos níveis de AST. Em relação à composição da microbiota intestinal observa-se que a infecção provocou um aumento na abundância relativa de *Bacteroidia* (filó *Bacteroidetes*) enquanto diminuiu a abundância de *Clostridia* (filó *Firmicutes*) com diferença estatística significativa. **Conclusão:** A associação de PZQ com DOX e GEN foi capaz de alterar a modulação do processo granulomatoso, com DOX agravando a inflamação associada ao processo granulomatoso e GEN acelerando a resolução da esquistossomose em um modelo experimental murino de infecção aguda por *S. mansoni*. Nas análises de sequenciamento do gene 16S rRNA observa-se que, na microbiota fecal, a infecção provocou, já na fase aguda, um aumento estatisticamente diferente de *Bacteroidetes* e diminuição de *Firmicutes*. No fígado dos camundongos BALB/c infectados e não-infectados houve alterações sutis entre a composição microbiana, porém os desvios observados na comunidade microbiana entre as amostras do fígado, neste estudo, não foram impactantes a nível de gerar variações estatisticamente significativas, muito embora por corresponder à fase aguda da esquistossomose.

Palavras-chave: *Schistosoma mansoni*; combinação de medicamentos; histologia; metagenômica; microbiota.

## ABSTRACT

**Introduction and objectives:** Schistosomiasis occurs in acute and chronic forms, differing in pathogenesis and host immune response, with impacts of microbiota and drugs on disease outcome. This study evaluated the effects of praziquantel (PZQ) in combination with doxycycline (DOX) and gentamicin (GEN) in the treatment of BALB/c mice infected with *Schistosoma mansoni* in the acute phase of schistosomiasis, in addition to a metataxonomic analysis of feces and liver of uninfected and infected mice.

**Methods:** Hepatic and intestinal granulomas were evaluated by histopathological analysis, quantification of parasite load in liver tissue (real-time PCR and egg count) and biochemical parameters: ALT, AST, alkaline phosphatase and albumin by enzymatic colorimetric methods. Metataxonomic analysis using 16S rRNA gene sequencing of feces and liver was performed in two experimental groups, uninfected and infected. **Main findings:** In the infected group treated with the PZQ+DOX combination, granulomas with a larger diameter and an extensive infiltration of inflammatory cells around *S. mansoni* eggs, characteristic of the necrotic-exudative type, were observed, in addition to a disorganization in the collagenization structure. In the mice in the infected group treated with PZQ+GEN, it was observed that the granulomas were of reduced dimensions, presenting a greater quantity of giant cells around the eggs and fibroblasts organized in concentric layers, although these changes did not differ statistically. There was a higher percentage of granulomas in the exudative-productive phase with the treatments, with the group treated with the PZQ+GEN combination presenting the highest percentage of these granulomas in relation to the group treated only with PZQ. All treatments caused a significant decrease in the number of eggs in the liver as well as a reduction in the genetic material of *S. mansoni* per mg of liver tissue analyzed by real-time PCR. The PZQ+DOX combination potentiated the inflammatory damage associated with hepatic granulomas, as also observed in higher ALT levels. In animals treated with PZQ+GEN there was a significant increase in AST levels. Regarding the composition of the intestinal microbiota, it was observed that the infection caused an increase in the relative abundance of *Bacteroidia* (phylum *Bacteroidetes*) while decreasing the abundance of *Clostridia* (phylum *Firmicutes*) with a statistically significant difference. **Conclusion:** The combination of PZQ with DOX and GEN was able to alter the modulation of the granulomatous process, with DOX aggravating the inflammation associated with the granulomatous process and GEN accelerating the resolution of schistosomiasis in an experimental murine model of acute infection by *S. mansoni*. In the sequencing analyses of the 16S rRNA gene, it was observed that, in the fecal microbiota, the infection caused, already in the acute phase, a statistically different increase in *Bacteroidetes* and a decrease in *Firmicutes*. In the liver of infected and uninfected BALB/c mice, there were subtle changes in the microbial composition, but the deviations observed in the microbial community between the liver samples in this study were not impactful enough to generate statistically significant variations, although they correspond to the acute phase of schistosomiasis.

**Keywords:** *Schistosoma mansoni*; drug combination; histology; metagenomics; microbiota.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Distribuição mundial das espécies do gênero <i>Schistosoma</i> .....	22
Figura 2 -	Distribuição de casos de esquistossomose notificados no Brasil no período de 2007-2017.....	23
Figura 3 -	Ciclo biológico do <i>Schistosoma mansoni</i> .....	25
Figura 4 -	Caminho dos ovos de <i>Schistosoma mansoni</i> no intestino delgado.....	27
Figura 5 -	Desenvolvimento da resposta imune na esquistomose.....	28
Figura 6 -	Fases na formação do granuloma durante o desenvolvimento da esquistossomose nas fases aguda e crônica no fígado de camundongos.....	33
Figura 7 -	Curva padrão de DNA de ovos de <i>Schistosoma mansoni</i> .....	49
Figura 8 -	Ovo viável de <i>Schistosoma mansoni</i> no tecido hepático.....	51
Figura 9 -	Fotomicrografias de fígado de camundongos infectados com <i>Schistosoma mansoni</i> e necropsiados com 8 semanas após a infecção (Objetiva 5x).....	52
Figura 10 -	Fotomicrografias de fígado de camundongos infectados com <i>Schistosoma mansoni</i> e necropsiados com 8 semanas após a infecção (Objetiva 10x).....	54
Figura 11 -	Fotomicrografias de intestino de camundongos infectados com <i>Schistosoma mansoni</i> e necropsiados com 8 semanas após a infecção.....	57
Figura 12 -	Fotomicrografias de fígado de camundongos infectados com <i>Schistosoma mansoni</i> na fase aguda da infecção (8 semanas após a infecção) corados com Picrosirius Red.....	62
Figura 13 -	Fases da formação do granuloma durante o desenvolvimento da esquistossomose na fase aguda no fígado.....	66
Figura 14 -	Resultados dos parâmetros bioquímicos (ALT, AST, Fosfatase alcalina e Albumina).....	80
Figura 15 -	Fotomicrografias de intestino de camundongos infectados com <i>Schistosoma mansoni</i> e necropsiados com 8 semanas após a infecção.....	109

Figura 16 - Análise de diversidade alfa microbacteriana de fezes e fígado de camundongos não-infectados e infectados com <i>S. mansoni</i> pelo índice de Shannon.....	118
Figura 17 - Análise de diversidade alfa microbacteriana de fezes e fígado de camundongos não-infectados e infectados com <i>S. mansoni</i> pelo índice de Chao1.....	119
Figura 18 - Análise de diversidade alfa microbacteriana de fezes e fígado de camundongos não-infectados e infectados com <i>S. mansoni</i> pelo índice Evenness.....	121
Figura 19 - Análises de ordenação de amostras de fezes e fígado de camundongos não-infectados e infectados com <i>S. mansoni</i> .....	122
Figura 20 - Análises de abundância relativa por grupo de amostras de fezes e fígado de camundongos não-infectados e infectados com <i>S. mansoni</i> .....	123
Figura 21 - Análises de abundância relativa da classe <i>Bacilli</i> de amostras de fezes e fígado de camundongos não-infectados e infectados com <i>S. mansoni</i> .....	124
Figura 22 - Análises de abundância relativa da classe <i>Bacteroidia</i> de amostras de fezes e fígado de camundongos não-infectados e infectados com <i>S. mansoni</i> .....	125
Figura 23 - Análises de abundância relativa da classe <i>Clostridia</i> de amostras de fezes e fígado de camundongos não-infectados e infectados com <i>S. mansoni</i> .....	126
Figura 24 - Análises de abundância relativa da classe <i>Gammaproteobacteria</i> de amostras de fezes e fígado de camundongos não-infectados e infectados com <i>S. mansoni</i> .....	127

## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 -	Número de granulomas/mm <sup>2</sup> no intestino de camundongos infectados com <i>S. mansoni</i> .....	59
Gráfico 2 -	Número de granulomas/mm <sup>2</sup> no fígado de camundongos infectados com <i>S. mansoni</i> .....	60
Gráfico 3 -	Área percentual dos granulomas no fígado de camundongos infectados com <i>S. mansoni</i> .....	60
Gráfico 4 -	Contagem de leucócitos polimorfonucleares/mm <sup>2</sup> no fígado de camundongos infectados.....	69
Gráfico 5 -	Contagem de leucócitos mononucleares/mm <sup>2</sup> no fígado de camundongos infectados.....	69
Gráfico 6 -	Área de hepatócitos.....	73
Gráfico 7 -	Percentual de Hepatócitos Binucleados.....	74
Gráfico 8 -	Relação Núcleo/Citoplasma.....	75
Gráfico 9 -	Percentual de Parênquima Hepático.....	76
Gráfico 10 -	Percentual de Sinusoides Hepáticos.....	77
Gráfico 11 -	Análise do Conteúdo de Glicogênio Hepático pelo Percentual de Hepatócitos PAS+.....	78
Gráfico 12 -	Contagem de ovos por mm <sup>2</sup> .....	83
Gráfico 13 -	Quantificação hepática de material genético de <i>S. mansoni</i> por q-PCR.....	84
Gráfico 14 -	Número de granulomas/mm <sup>2</sup> no intestino de camundongos infectados com <i>S. mansoni</i> .....	111
Gráfico 15 -	Área percentual dos granulomas no intestino de camundongos infectados com <i>S. mansoni</i> .....	112
Gráfico 16 -	Contagem de leucócitos polimorfonucleares/mm <sup>2</sup> no intestino de camundongos infectados com <i>S. mansoni</i> .....	113
Gráfico 17 -	Contagem de leucócitos mononucleares/mm <sup>2</sup> no intestino de camundongos infectados com <i>S. mansoni</i> .....	114

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALP	Fosfatase alcalina
ALT	Alanina aminotransferase
AST	Aspartato aminotransferase
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
CIM	Concentração Inibitória Mínima
DII	Doença inflamatória intestinal
DSS	Sulfato de dextrana sódica
DTN	Doenças tropicais negligenciadas
HE	Hematoxilina-Eosina
IgA	Imunoglobulina A
IgE	Imunoglobulina E
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
IL	Interleucina
ITS	<i>Internal Transcribed Spacer</i>
INF- $\gamma$	Interferon gama
LPS	Lipopolissacarídeo
MN	Mononucleares
mRNA	RNA mensageiro
NIH	<i>National Institutes of Health</i>
NO	Óxido nítrico
OMS	Organização Mundial de Saúde
PAS	Método do Ácido periódico de Schiff
PMN	Polimorfonucleares
rRNA	RNA ribossômico
q-PCR	PCR em Tempo Real
SEA	Antígeno ovular solúvel
TGI	Trato gastrointestinal
TGO	Transaminase glutâmica oxalacética
TGP	Transaminase glutâmico pirúvica
TH1	<i>T Helper 1</i>
TH2	<i>T Helper 2</i>
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral
TLR-2	<i>Toll-like receptor-2</i>
TLR-4	<i>Toll-like receptor-4</i>
TREGS	Células T reguladoras
tRNA	RNA transportador
TTD	<i>Therapeutic Target Database</i>

## SUMÁRIO

### CAPÍTULO 1 - IMPACTOS DA ASSOCIAÇÃO DE DOXICICLINA E GENTAMICINA AO PRAZIQUANTEL NO TRATAMENTO DE CAMUNDONGOS BALB/c INFECTADOS POR *Schistosoma mansoni* NA FASE AGUDA DA DOENÇA

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>17</b>
<b>2</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO.....</b>	<b>21</b>
2.1	ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS.....	21
2.2	CICLO DE VIDA E PATOLOGIA.....	24
2.3	MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS.....	30
2.4	FORMAÇÃO DOS GRANULOMAS HEPÁTICOS E INTESTINAIS.....	31
2.5	QUIMIOTERAPIA DA ESQUISTOSSOMOSE MANSÔNICA.....	34
2.6	MICROBIOTA, ANTIBIÓTICOS E DISBIOSE.....	35
2.7	ANTIBIÓTICOS.....	39
<b>2.7.1</b>	<b>Gentamicina.....</b>	<b>39</b>
<b>2.7.2</b>	<b>Doxiciclina.....</b>	<b>41</b>
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>43</b>
3.1	OBJETIVO GERAL.....	43
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	43
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>44</b>
4.1	ASPECTOS ÉTICOS.....	44
4.2	ANIMAIS.....	44
4.3	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	44
<b>4.3.1</b>	<b>Tratamento com antibióticos.....</b>	<b>45</b>
<b>4.3.2</b>	<b>Tratamento com Praziquantel.....</b>	<b>45</b>
<b>4.3.3</b>	<b>Eutanásia dos animais e coleta de material.....</b>	<b>46</b>

4.3.4	Histopatologia e análise morfológica.....	46
4.3.5	Dosagem de parâmetros bioquímicos ALT, AST, Fosfatase alcalina e Albumina .....	47
4.3.6	Análise de amostras de fígado por PCR em tempo real.....	48
4.3.6.1	Extração de DNA.....	48
4.3.6.2	Construção da curva-padrão de DNA de ovos de <i>S. mansoni</i> .....	48
4.3.6.3	PCR em Tempo Real.....	49
4.3.7	Análise estatística.....	50
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	51
6	CONCLUSÕES.....	89
 <b>CAPÍTULO 2 - ANÁLISE COMPARATIVA DAS MICROBIOTAS HEPÁTICA E INTESTINAL DE CAMUNDONGOS BALB/c NA ESQUISTOSSOMOSE AGUDA</b>		
1	INTRODUÇÃO.....	90
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	93
2.1	MICROBIOTA INTESTINAL E ESQUISTOSSOMOSE.....	93
2.2	TRANSLOCAÇÃO BACTERIANA.....	94
2.3	<i>Escherichia coli</i> .....	98
2.4	Metataxonômica.....	100
3	OBJETIVOS.....	102
3.1	OBJETIVO GERAL.....	102
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	102
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	103
4.1	ASPECTOS ÉTICOS.....	103
4.2	ANIMAIS.....	103
4.3	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	103
4.3.1	Inoculação com a bactéria <i>Escherichia coli</i> .....	104
4.3.2	Eutanásia dos animais e coleta de material.....	105



4.3.3	Extração de DNA de fezes e fígado.....	105
4.3.4	Histopatologia e Análise Morfológica.....	105
4.3.5	Metataxonômica.....	106
4.3.6	Análise estatística.....	107
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	108
6	CONCLUSÕES.....	136
	REFERÊNCIAS.....	137
	ANEXOS.....	157

# CAPÍTULO 1 - IMPACTOS DA ASSOCIAÇÃO DE DOXICICLINA E GENTAMICINA AO PRAZIQUANTEL NO TRATAMENTO DE CAMUNDONGOS BALB/c INFECTADOS POR *Schistosoma mansoni* NA FASE AGUDA DA DOENÇA

## 1 INTRODUÇÃO

A esquistossomose é uma doença parasitária que ocorre na forma aguda e crônica e é causada por helmintos trematódeos do gênero *Schistosoma*, sendo mais comum seis espécies do parasito capazes de infectar o ser humano: *S. mansoni*, *S. guineensis*, *S. intercalatum*, *S. haematobium*, *S. japonicum* e *S. mekongi* (Davis, 2009). Esta doença afeta em torno de 264 milhões de pessoas no mundo, sendo que a sua transmissão ocorre em 78 países. Em relação ao *S. mansoni*, a sua ocorrência é registrada na África, Oriente Médio, Caribe, Brasil, Suriname e Venezuela (WHO, 2023).

O homem se infecta através do contato com água contendo cercárias. Após a penetração, as larvas, denominadas esquistossômulos, migram pelo tecido subcutâneo e adaptam-se às condições do meio interno. Após penetrarem em um capilar ou vaso linfático, são conduzidas passivamente ao sistema porta-hepático, onde ocorre a maturação sexual. Entre 30 e 60 dias após a infecção ocorre a transformação dos esquistossômulos em vermes adultos. Acasalados, os vermes migram via sistema porta até o território da artéria mesentérica, onde vivem até 10 anos ou mais, colocando centenas de ovos por dia (Souza *et al.*, 2011; Thétiot-Laurent *et al.*, 2013). Este período coincide com o início das manifestações clínicas da esquistossomose aguda, no qual os pacientes podem apresentar dores abdominais, sangue nas fezes, perda de apetite e diarreia (Souza *et al.*, 2011).

A gravidade da esquistossomose crônica está associada à intensidade e extensão da reação celular denominada de granuloma, induzida por antígenos secretados pela deposição de ovos do verme, principalmente no fígado e intestino do hospedeiro. Tais granulomas que circundam os ovos de *S. mansoni* revelam uma interação dinâmica e intrincada entre célula-célula e célula-matriz do tecido afetado e aquelas recrutadas da circulação, tais como os linfócitos T CD4+ e B, macrófagos e eosinófilos, resultando na deposição de uma matriz extracelular heterogênea e na

formação de uma estrutura esférica compacta que se organiza ao redor do ovo do verme (Lenzi *et al.*, 2008a).

A quimioterapia preventiva para a esquistossomose é necessária apenas em 51 países endêmicos com transmissão moderada a alta (WHO, 2023). Na década de 1970, a Oxamniquina foi bastante utilizada no tratamento individual e em massa da esquistossomose mansônica, no entanto, este medicamento é ativo somente contra infecções por *S. mansoni* (Katz, 1980), além de exigir grandes tanques de fermentação para a síntese biológica em seu processo de fabricação, resultando em um custo mais elevado, quando comparado ao Praziquantel (Rocha *et al.*, 2017). Em 1977, o Praziquantel foi descrito como um fármaco de amplo espectro anti-helmíntico, com boa atividade terapêutica e poucos efeitos colaterais (Doenhoff *et al.* 2002), sendo atualmente o tratamento recomendado pela Organização Mundial de Saúde para tratar todas as formas de esquistossomose. Embora haja a possibilidade de reinfeção após o tratamento, o risco de desenvolver uma forma grave da doença é reduzido e pode até ser revertido quando o tratamento é iniciado e repetido na infância (WHO, 2023).

Entretanto, os dois fármacos apresentam limitações como a baixa atividade sobre os vermes imaturos do *S. mansoni* e a falha em tratamentos devido à ocorrência de resistência, apesar de apresentar baixa toxicidade e ser bem tolerado pelos pacientes (Silva *et al.*, 2012). Em algumas regiões, principalmente da África, está cada vez mais frequente a notificação de casos de resistência ao Praziquantel. Considerando estes fatos, como a possibilidade do aparecimento de resistência do verme ao fármaco e falhas terapêuticas, fica claro o risco de depender de apenas dois fármacos para o tratamento da esquistossomose (Salih *et al.*, 2023).

Apesar do alto risco de exposição em áreas onde a esquistossomose é endêmica, observa-se que, nestas comunidades, somente 6 a 10% dos indivíduos infectados desenvolvem a forma hepatoesplênica da doença. Estudos mostraram que a carga parasitária é um fator relacionado à gravidade da doença em indivíduos infectados, apresentando maior probabilidade de desenvolver complicações e sintomas mais graves da esquistossomose (WHO, 1993). No entanto, as razões pelas quais este fato acontece ainda não estão bem esclarecidas, sendo que outros fatores como a idade, a resposta imunológica do hospedeiro, a carga genética do hospedeiro e a exposição prévia ao parasito podem também estar envolvidos na progressão da doença para a forma grave (Wiegand *et al.*, 2021). Adicionalmente, pessoas que

nascerem em áreas de risco podem ter adquirido memória imunológica ou terem sofrido mudanças no sistema imunológico devido a estímulos recebidos da mãe infectada, e esta sensibilização pré-natal pode ter consequências, como o desenvolvimento de resistência (King *et al.* 1998).

Atualmente, reconhece-se a importância de considerar as mudanças no estilo de vida e nos fatores ambientais ao avaliar o impacto das doenças na população humana. Isso inclui a análise dos efeitos decorrentes do uso generalizado de antibióticos e outras práticas adotadas pelas sociedades. Compreender como esses elementos influenciam a propagação e a gravidade das doenças é essencial para uma abordagem abrangente na gestão da saúde pública (Stark *et al.*, 2023). Yang *et al.* (2021) ressaltam que as interações entre os medicamentos e a microbiota são bidirecionais. Os antibióticos podem perturbar a microbiota intestinal e os microrganismos também podem modular a ação/efeito dos medicamentos, modificando assim a composição química e levando à resistência antimicrobiana.

Cortés *et al.* (2020) indicam, em um trabalho recente, que a suscetibilidade à infecção por *S. mansoni* em camundongos é parcialmente dependente da composição da microbiota basal do hospedeiro. Destaca-se assim a importância de estudos que visem o conhecimento desta intrincada relação microbiota, hospedeiro e parasito.

Neste contexto, é notório que a microbiota do intestino humano pode determinar o perfil de colonização e o estabelecimento de doenças por outros microrganismos, modulando a intensidade da infecção e o desfecho da doença, como visto em infecções por *S. japonicum* (Zhang *et al.*, 2020) e *S. mansoni* (Cortés *et al.*, 2020). A infecção por *Schistosoma mansoni* está associada a profundas mudanças abrangentes na composição global da microbiota intestinal do hospedeiro e estas mudanças são indicativas de disbiose que acompanha a migração do ovo através da parede intestinal e a formação do granuloma. Muitas das alterações específicas da microbiota relacionadas à infecção envolvem a composição bacteriana que está ligada à imunorregulação ou inflamação do hospedeiro, sugerindo que o equilíbrio entre as comunidades bacterianas imunorregulatória e pró-inflamatória durante a esquistossomose desempenha um papel fundamental na determinação do estabelecimento efetivo da infecção e/ou gravidade da doença resultante das respostas imunes do hospedeiro à infecção (Jenkins *et al.*, 2018).

Diante destas evidências, este estudo propõe-se a avaliar os efeitos, *in vivo*, na fase aguda da esquistossomose, da associação de antibioticoterapia (Doxiciclina

e Gentamicina) ao Praziquantel no tratamento em camundongos machos BALB/c infectados por *S. mansoni*. Para isto, foram objetos de análise: a formação dos granulomas hepáticos e intestinais por meio de técnicas histopatológicas, histomorfometria de tecidos hepáticos, dosagens de parâmetros bioquímicos ALT, AST, Fosfatase alcalina e Albumina e a quantificação da carga parasitária no tecido hepático dos grupos experimentais por PCR em Tempo Real.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS

As primeiras observações sobre o agente etiológico da esquistossomose foram descritas pela primeira vez pelo patologista alemão Theodor Bilharz no Egito em 1851, relatando ter encontrado um helminto na veia porta ao realizar a necropsia em um jovem no Cairo. Patrick Manson, em 1902, descreve ovos com espículo lateral encontrados nas fezes de um paciente inglês que havia residido em várias ilhas do Caribe. No Brasil, Pirajá da Silva descreve ovos com espículo lateral encontrados nas fezes de um paciente na Bahia em 1908 (Paraense, 2008).

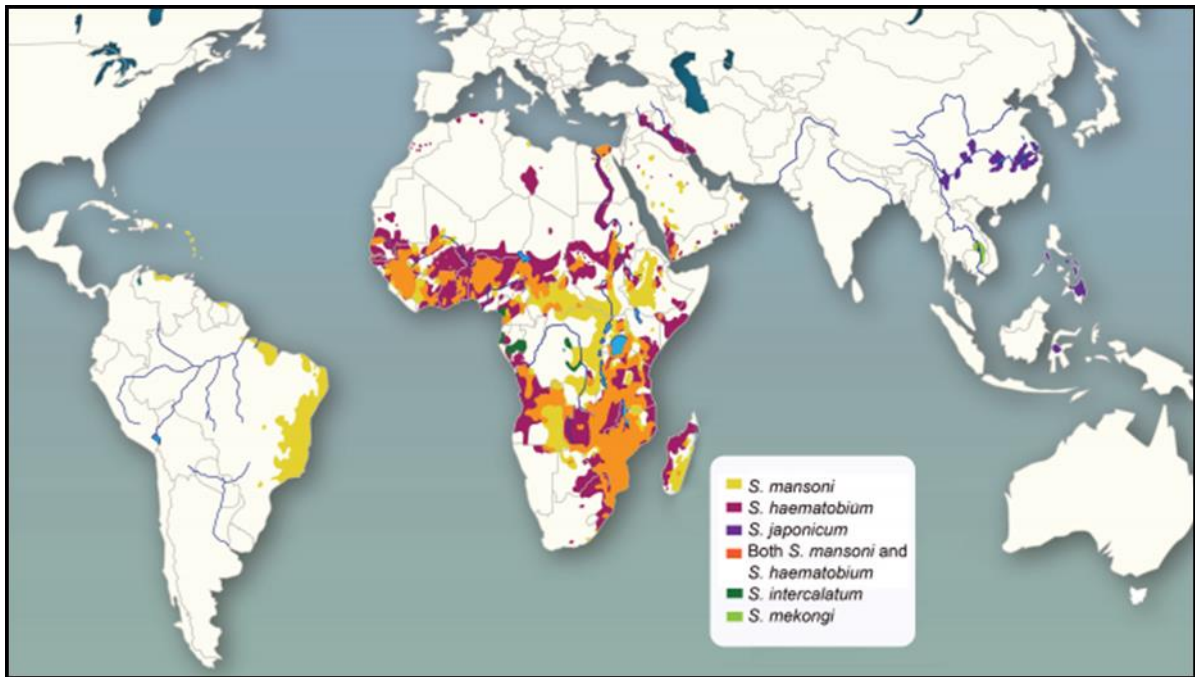
As estimativas mostram que em torno de 240 milhões de pessoas sejam acometidas por esta helmintose em todo mundo e outras 700 milhões de pessoas residam em áreas de risco de transmissão. Além disso, pelo menos 251,4 milhões de pessoas precisaram de tratamento preventivo em 2021 (WHO, 2023). O tratamento preventivo, que deve ser repetido ao longo de vários anos, reduz e evita a morbidade. A transmissão da esquistossomose foi relatada em 78 países. No entanto, a quimioterapia preventiva para a esquistossomose, onde pessoas e comunidades são direcionadas para tratamento em larga escala, é necessária apenas em 51 países endêmicos com transmissão moderada a alta (WHO, 2023).

Segundo WHO (2023), foi observado que em 2021, a pandemia de COVID-19 e o trabalho para mitigar seus impactos diminuíram a provisão de intervenções para doenças tropicais negligenciadas (DTN) e a cobertura do tratamento para esquistossomose, o que poderá afetar ainda mais a disseminação desta doença já negligenciada.

A esquistossomose é uma doença que pode ser causada por seis espécies de *Schistosoma*, capazes de infectar o ser humano: *S. mansoni*, *S. guineensis*, *S. intercalatum*, *S. haematobium*, *S. japonicum* e *S. mekongi* (Davis, 2009). *Schistosoma mansoni* é a única espécie transmitida nas Américas (FIGURA 1), sendo endêmica no Brasil, Venezuela, Suriname e Caribe, onde se estima que cerca de 6 milhões de pessoas estejam infectadas, sendo a maioria residente no Brasil, e 25 milhões estão sob risco de infecção (WHO, 2005).

O Brasil é o país mais afetado pela esquistossomose nas Américas, com 42,9 milhões de pessoas expostas ao risco de infecção e aproximadamente 1,5 milhão de indivíduos infectados.

Figura 1 – Distribuição mundial das espécies do gênero *Schistosoma*



Fonte: Weerakon *et al.* (2015)

Legenda: *S. mansoni*: África, Oriente Médio, América do Sul, Índias Ocidentais.

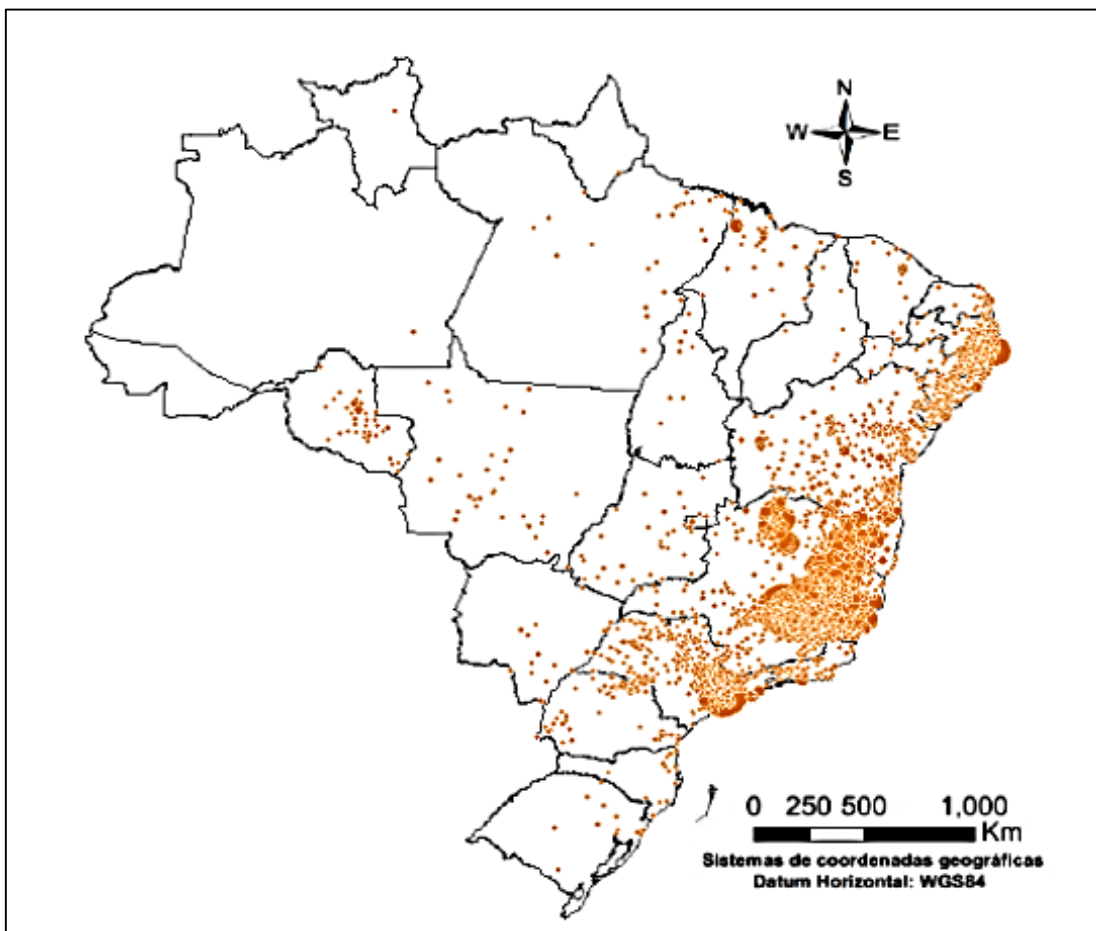
*S. japonicum*: China, Indonésia e Filipinas. *S. mekongi*: Sudeste da África e rio Mekongi.

*S. haematobium*: África, Oriente Médio. *S. guineensis* (não representado no mapa) Áreas de floresta tropical da África central e *S. intercalatum*: Oeste da África, África Oriental.

No Brasil, acredita-se que a esquistossomose foi introduzida pelo tráfico de povos escravizados africanos que entraram pelos portos de Recife e Salvador para trabalhar nas lavouras de cana-de-açúcar. Em virtude da grande diversidade geográfica, climática, econômica e social que se reflete na imensa variedade de vermes encontrados no Brasil, a esquistossomose mansônica é uma das endemias parasitárias mais significativas, ocupando o segundo lugar depois da malária (BRASIL, 2019). A doença tem distribuição heterogênea e a transmissão ocorre em uma vasta área endêmica (FIGURA 2). No total, a transmissão da doença é observada em 19 dos 27 estados brasileiros, com a maioria dos casos ocorrendo nos estados das regiões Nordeste e Sudeste. As regiões endêmicas e focais da esquistossomose incluem os estados de Alagoas, Bahia, Pernambuco, Rio Grande do Norte, Paraíba, Sergipe, Espírito Santo e Minas Gerais, com uma maior concentração no norte e

nordeste desses estados. Em estados como Pará, Maranhão, Piauí, Ceará, Rio de Janeiro, São Paulo, Santa Catarina, Paraná, Rio Grande do Sul, Goiás e no Distrito Federal, a transmissão é localizada e não afeta grandes extensões territoriais (Katz, 2018).

Figura 2 – Distribuição de casos de esquistossomose notificados no Brasil no período de 2007-2017



Fonte: SINAN/SVS/MS

Com base em um recente levantamento nacional sobre a esquistossomose (Katz, 2018) e utilizando dados referentes ao período de 2010 a 2015, estima-se que o índice de infecção na população brasileira seja aproximadamente 1%. No âmbito desse estudo abrangente, as regiões Sudeste e Nordeste foram identificadas como as áreas com os mais altos índices de positividade. Destaca-se que, na região Sudeste, o Estado de Minas Gerais, com seus 853 municípios e extenso território, exibiu o maior índice de positividade, alcançando 3,86%.



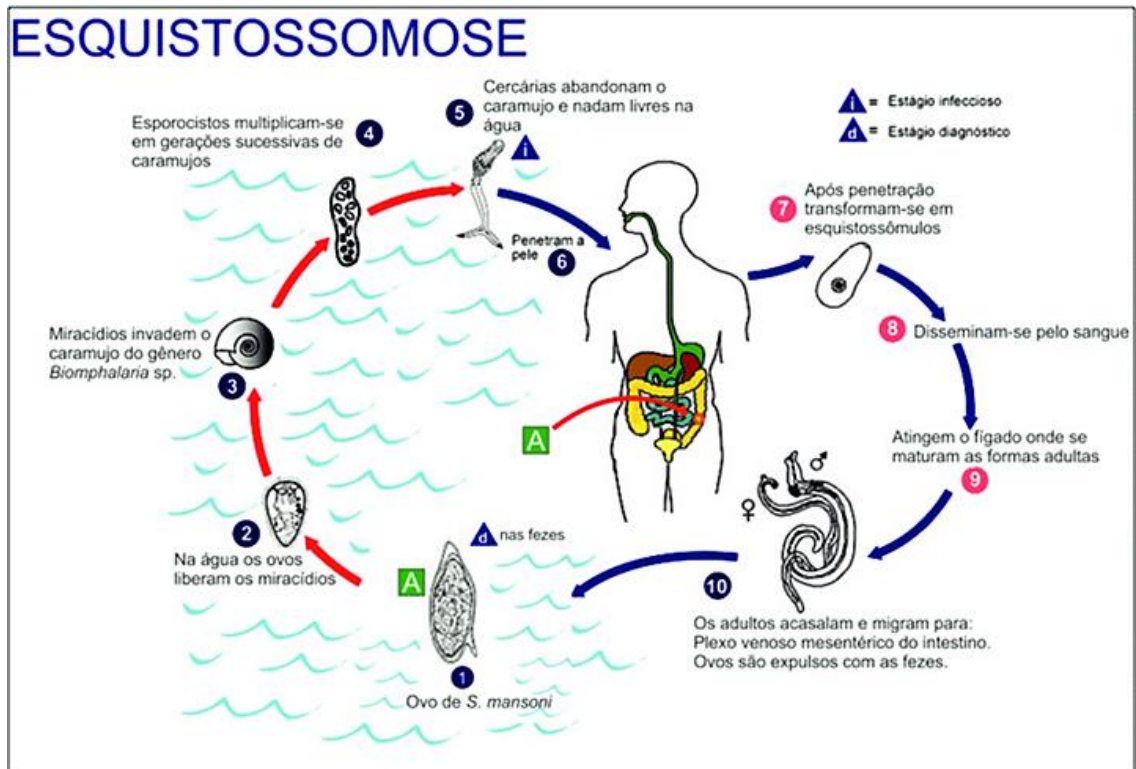
A esquistossomose, à princípio, era considerada uma doença predominantemente rural. Contudo, devido ao processo de urbanização desordenado, formação de conglomerados urbanos periféricos sem nenhum planejamento e o extenso êxodo rural e migração de pessoas infectadas para áreas com precárias condições socioambientais, a doença foi adentrando em áreas urbanas. Nestas áreas, o saneamento básico deficiente e a falta de recursos econômicos da população, possibilita o aparecimento de condições ambientais favoráveis ao estabelecimento de doenças infecciosas e parasitárias, dentre as quais, a esquistossomose. Em função disso, a doença é ligada à pobreza e às regiões em subdesenvolvimento (Brasil, 2019; Simões *et al.*, 2020).

Um total de 1.290 óbitos por esquistossomose foi registrado entre 2000 e 2019 no Brasil, com índice médio de mortalidade de 0,33 óbitos/100.000. Embora o índice de mortalidade geral no estado de Minas Gerais tenha diminuído significativamente ao longo do tempo, ela aumentou em regiões do norte do estado, como o Vale do Jequitinhonha, Vale do Mucuri e Vale do Rio Doce (Gomes *et al.*, 2023).

Deve-se ainda ressaltar que, no contexto geral, o saneamento básico, educação sanitária e tratamento dos doentes são as medidas que, no momento, apresentam melhor eficácia no controle da transmissão e da morbidade da doença (Neves, 2016).

## 2.2 CICLO DE VIDA E PATOLOGIA

A transmissão do *S. mansoni* ocorre através de um complexo ciclo biológico heteroxênico (FIGURA 3), com diversas formas evolutivas de desenvolvimento (vermes adultos, ovos, miracídios, esporocistos, cercárias e esquistossômulos), alternando fases assexuadas e sexuadas de reprodução em seus hospedeiros intermediários e definitivos, respectivamente (King, 2009).

Figura 3 - Ciclo biológico do *Schistosoma mansoni*

Fonte: Centro de Controle de Doenças (2017)

Disponível em: <https://www.cdc.gov/parasites/schistosomiasis/biology.html>

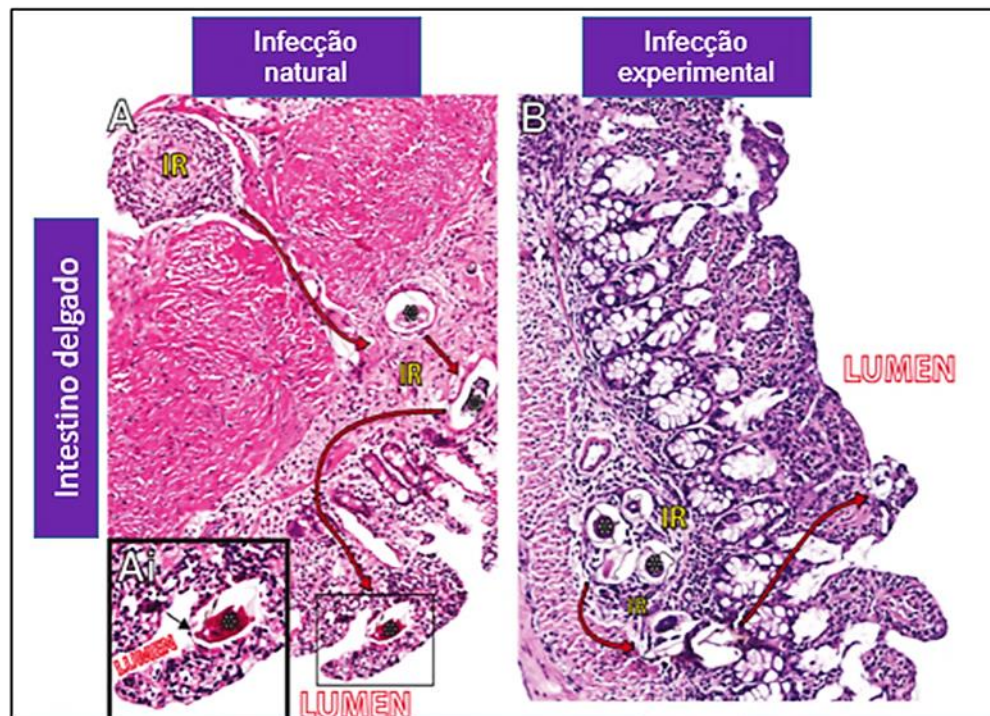
No ciclo de vida do *S. mansoni* é necessário que se tenha um hospedeiro definitivo infectado (onde ocorre a reprodução sexuada). Inicialmente há a liberação dos ovos do *S. mansoni* pelas fezes do hospedeiro humano infectado. Em contato com a água, os ovos eclodem e liberam uma larva ciliada denominada de miracídio. A presença do molusco do gênero *Biomphalaria* (hospedeiro intermediário) na coleção hídrica é essencial para perpetuação do parasito. Uma vez que os miracídeos penetrem em seus tecidos, transformam-se em esporocistos primários e, algum tempo depois (8 a 10 dias), em esporocistos secundários. Posteriormente, os esporocistos secundários migram para as glândulas digestivas do molusco e se reproduzem assexuadamente, dando origem a milhares de cercárias. A cercária tem o corpo alongado e cilíndrico com cerca de 500 micrômetros de comprimento e com uma cauda bifurcada na extremidade facilitando o seu deslocamento. Entre 10 e 16 horas, quando a luz solar e o calor são mais intensos, as cercárias são liberadas pelos moluscos, em maior quantidade na água. Esta situação coincide com o horário em que as pessoas estão em maior contato com a água. O homem ou qualquer outro

mamífero, pode se infectar ao entrar em contato com águas contaminadas com cercárias (Lenzi *et al.*, 2008b; Brasil, 2019). Elas penetram na epiderme do hospedeiro definitivo e passam por mudanças para adaptar ao novo ambiente, entre elas a perda da cauda, das glândulas pré e pós acetabulares e a adoção da respiração anaeróbica. Estas glândulas pós-acetabulares secretam substâncias líticas que facilitam a penetração no hospedeiro e as pré-acetabulares secretam um muco que provavelmente protege o seu tegumento. O tegumento do verme torna-se especializado para absorção e secreção além de atuar como local das respostas imunes do hospedeiro. Com essas transformações as cercárias passam para a forma jovem do verme, o esquistossômulo (Souza *et al.*, 2011).

Em torno de 48 horas após a infecção, os esquistossômulos alcançam a corrente sanguínea e iniciam sua migração passiva, intravascular, passando pelo pulmão e coração antes de alcançar o sistema porta hepático, onde completam seu desenvolvimento. Então, machos e fêmeas se acasalam, iniciando nova migração até seu sítio de residência nas veias mesentéricas, o que leva aproximadamente 2 a 3 semanas. Neste local, a maturidade sexual da fêmea é atingida por volta da 6ª semana, quando a oviposição se inicia. O número de ovos produzidos diariamente varia de acordo com cada espécie, com a fêmea de *S. japonicum* produzindo até 3.500 ovos e as demais espécies (*S. mansoni* e *S. haematobium*) em torno de 300 ovos. Os ovos levam de seis a sete dias para tornarem-se maduros (Ross *et al.*, 2012). Parte desses ovos caem no lúmen intestinal e dão continuidade ao ciclo.

Segundo Amaral *et al.* (2017) observaram que, após a postura dos ovos, nos intestinos delgado e grosso de animais infectados com *S. mansoni*, os granulomas atuam como facilitadores da translocação dos ovos nas camadas dos órgãos em direção ao lúmen para serem eliminados com as fezes, completando o ciclo de vida do verme (FIGURA 4). Esses dados confirmam o fato de diferentes hospedeiros utilizarem esse caminho para eliminar um grande número de ovos do parasito para o ambiente externo.

Figura 4 - Caminho dos ovos de *Schistosoma mansoni* no intestino delgado



Fonte: Adaptado de Amaral *et al.* (2017)

Legenda: Caminho dos ovos de *Schistosoma mansoni* no intestino delgado em infecção natural em *Nectomys squamipes* (A) - um reservatório selvagem capturado em áreas endêmicas no Brasil - e infecção experimental em camundongos Swiss (B). A reação inflamatória granulomatosa (IR) produz um trajeto que leva à translocação dos ovos do parasito das camadas internas para a luz do intestino, conforme mostrado pelas setas. Na imagem em foco, um ovo de *S. mansoni* sai das vilosidades para o lúmen do intestino delgado.

A passagem de ovos para a luz intestinal é favorecida por produtos de eosinófilos e/ou macrófagos periovulares que destroem as fibras da matriz extracelular e corroem a membrana basal do epitélio, criando túneis ou passagens, na mucosa, que permitem a ejeção passiva dos ovos pelos movimentos intestinais peristálticos (LENZI *et al.*, 2008b). Um aspecto observado por Neves e colaboradores (2016) em animais de laboratório com imunossupressão é o fato de ocorrer um acúmulo de ovos nos tecidos intestinais, mostrando que o fluxo de ovos do intestino para a luz intestinal depende de resposta imunoinflamatória para facilitar o processo de expulsão.

Porém, uma grande porcentagem destes ovos (variando desde 20 a 60% do total de ovos produzidos) não são eliminados nas fezes e ficam presos na mucosa intestinal ou são levados pelo fluxo sanguíneo para o fígado, onde são retidos na

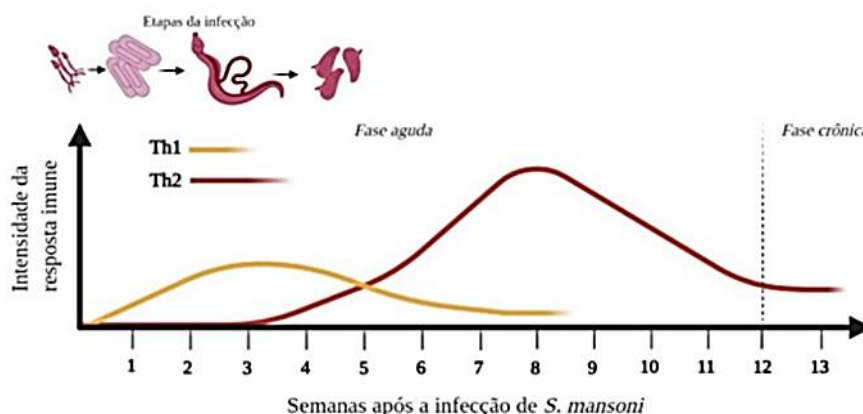
microvasculatura do espaço porta hepático. Estes ovos retidos representam um estímulo antigênico potente e contínuo, ativando o sistema imune e causando uma reação granulomatosa, sendo circundados por células características da resposta inflamatória granulomatosa do hospedeiro, e isso culmina com as manifestações clínicas da forma crônica da doença (Paz *et al.*, 2020; Takaki *et al.*, 2021).

Inicialmente, é possível observar a presença de neutrófilos, macrófagos, linfócitos e outras células envolvidas na inflamação. Entretanto, logo começa a surgir um acúmulo de tecido fibroso em torno do espaço-porta. Este tipo de fibrose recebe o nome de fibrose periportal e é caracterizada pelo acúmulo de células inflamatórias e deposição de matriz extracelular nesta região (Ramadori; Saile, 2004), sendo a causa pela qual 4% a 10% dos indivíduos residentes nas áreas endêmicas desenvolverem a forma hepatoesplênica da doença (Wilson *et al.*, 2007).

A patogenia deste tipo de fibrose desenvolvida em alguns pacientes esquistossomóticos envolvem hipertensão portal e vasos colaterais e, em alguns casos, podem ser letais. As mortes devido à esquistossomose são atualmente estimadas em 11.792 globalmente por ano. No entanto, esses números provavelmente estão subestimados e precisam ser reavaliados (WHO, 2023).

Tratando da resposta imune, a infecção por *S. mansoni* apresenta variações nos perfis Th1/Th2, com a evolução da doença e pode ser diferenciada em três fases (FIGURA 5).

Figura 5 – Desenvolvimento da resposta imune na esquistossomose



Fonte: González Lozano (2021)

A primeira fase abrange o período de três a cinco semanas após a infecção, sendo caracterizada pela exposição do hospedeiro às cercárias e aos esquistossômulos que migram pelo tecido (Cheever *et al.*, 2000). Nesta fase, a resposta imunológica predominante é a do tipo Th1, observando-se a presença de células mononucleares de sangue periférico produzindo grandes quantidades de fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e interleucinas 1 (IL-1) e interleucina 6 (IL-6) (De Jesus *et al.*, 2002; Coura, 2004). Além desses, diversos outros fatores caracterizam a fase aguda da imunopatologia, como aumento de globulinas séricas (IgG4, IgM e IgE), intensa eosinofilia em infiltrados pulmonares (Gryssels *et al.*, 2006), discreta elevação de aminotransferases e bilirrubinas hepáticas, linfadenia e hepatoesplenomegalia discreta (Souza *et al.*, 2011). As células CD4<sup>+</sup> Th1 estão envolvidas no desenvolvimento inicial do granuloma, onde ocorre a resposta inflamatória granulomatosa, desenvolvendo-se em torno dos ovos do verme e onde as citocinas TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  participam da ativação de linfócitos e, conseqüentemente, na formação dos granulomas (Gryseels *et al.*, 2006). A polarização excessiva de Th1, no entanto, é prejudicial ao hospedeiro, como observado em camundongos duplamente deficientes em IL-4 e IL-4/IL-10, que apresentaram maior mortalidade do que camundongos selvagens infectados com *S. mansoni* (Hoffmann *et al.*, 2000).

A resposta imunológica é então modulada para o tipo Th2 regulatória, caracterizada pela produção de IL-4, IL-5 e IL-10 e IL-13 com baixos níveis de IFN- $\gamma$  (Araújo *et al.* 2004). Esta mudança no padrão de resposta tem sido relacionada à produção de IL-4 e IL-10 induzida por antígenos do ovo (Silveira *et al.* 2004). Considera-se então que a mudança para a resposta granulomatosa crônica Th2 em infecções por *S. mansoni* é impulsionada por elementos tóxicos dos antígenos solúveis do ovo. A então predominante resposta Th2 é a responsável pela modulação da produção e das funções efetoras dos mediadores pró-inflamatórios (Cheever *et al.*, 2000).

Por fim, durante a fase crônica, o perfil observado é caracterizado por uma baixa produção de IFN- $\gamma$  e produção aumentada de citocinas com padrão Th2, como IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13 (Ribeiro de Jesus *et al.*, 2000). A resposta inflamatória ao redor dos ovos diminui principalmente devido à modulação da resposta imunológica mediada pela IL-10, que desempenha um papel crucial nesse processo (Araújo *et al.*, 1996; Malaquias *et al.*, 1997; Montenegro *et al.*, 1999). A IL-10, produzida principalmente pelos clones Th2, foi associada à supressão da resposta Th1, sendo,

portanto o perfil da resposta Th2 associado com a proteção e a geração de cronicidade das infecções esquistossomóticas por controlar a resposta granulomatosa ao redor dos ovos. A manutenção da doença parece envolver um equilíbrio entre as respostas Th1 e Th2, e a citocina IL-10 parece estar relacionada à prevenção de uma resposta excessiva Th1 ou Th2, atuando como uma citocina moduladora da infecção (Pearce; Macdonald, 2002).

O papel das citocinas Th2 individuais na formação do granuloma e na fibrose mostrou ser diferente, pois IL-4 ou IL-13 podem gerar a formação do granuloma, enquanto a IL-13 sozinha é a citocina pró-fibrótica dominante nessa doença. A resposta granulomatosa dominada por Th2 é, por sua vez, regulada pela menor resposta Th1, conforme demonstrado pelo fato de que a neutralização *in vivo* de IFN- $\gamma$  ou IL-12 resulta em granulomas maiores e fibrose mais extensa. Além disso, foi demonstrado que as células T reguladoras (Tregs) modulam e diminuem o tamanho do granuloma ao longo de infecções crônicas em camundongos (Pearce; MacDonald, 2002; Zheng *et al.*, 2020).

Enquanto uma resposta altamente polarizada para Th1 leva a uma condição letal aguda de hepatotoxicidade, uma resposta polarizada para Th2 leva a morbidade associada à doença crônica com aumento do granuloma e fibrose. A resposta Th2 está implicada com a patologia durante a infecção helmíntica. No entanto, ela também permite a sobrevivência do hospedeiro protegendo-o contra uma resposta imunológica exacerbada (Pearce; MacDonald, 2002). Desta forma, apesar de o granuloma ser a origem da patologia, ele possui um efeito paradoxal ao oferecer alguma forma de proteção, minimizando o dano tecidual no fígado e nos intestinos. Adicionalmente, o parasito depende fortemente do hospedeiro para a formação do granuloma em resposta aos ovos, uma vez que essa resposta inflamatória facilita a excreção bem-sucedida dos ovos no hospedeiro definitivo e a continuidade do ciclo (Hams; Aviello; Fallon, 2013).

### 2.3 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS

Os sintomas apresentados pela esquistossomose dependem da cepa, carga parasitária, idade, estado nutricional e resposta imune do paciente (Neves, 2016; Coutinho, 2008), sendo que as manifestações clínicas correspondem ao estágio de

desenvolvimento do verme no hospedeiro. A maioria das pessoas infectadas pode permanecer assintomática, dependendo da intensidade da infecção. Clinicamente, a esquistossomose pode ser classificada em fase inicial e fase tardia. A primeira se caracteriza pelas alterações dermatológicas devido à penetração das cercárias na pele, denominada dermatite cercariana, além de manifestações gerais com comprometimento em outros tecidos e órgãos, como linfadenopatia, febre, cefaleia, anorexia, dor abdominal e, com menor frequência, o paciente pode referir diarreia, náuseas, vômitos e tosse seca (Brasil, 2019). As manifestações da esquistossomose aguda não são comuns em indivíduos que vivem em área endêmica, sendo mais frequentes em indivíduos que se infectam pela primeira vez (Burke *et al.*, 2009).

Na fase tardia, manifestam-se as formas crônicas podendo surgir os sinais de progressão da doença para diversos órgãos. As manifestações clínicas variam de acordo com a localização e carga parasitária, da capacidade de resposta imunológica do indivíduo ou do tratamento atribuído. Apresentam-se nas seguintes formas: intestinal, na qual o paciente pode apresentar diarreia, fezes mucossanguinolentas, tenesmo e dores abdominais com alterações da digestão; hepatointestinal, que se caracteriza pela presença de diarreias e epigastralgia, podendo ocorrer áreas de fibrose decorrentes de granulomatose periportal hepática e hepatomegalia devido às reações imunológicas e a formação de granulomas devido ao ovo do *S. mansoni*; e por fim, a forma hepatoesplênica, em que ocorre a presença de hipertensão portal, levando à esplenomegalia e ao aparecimento de varizes no esôfago. Existem, ainda, as formas ectópicas, verificadas em estágios avançados da doença, como a vasculopulmonar, caracterizada por hipertensão pulmonar e glomerulopatia; e uma das formas mais grave dessa doença, a neuroesquistossomose (ou mielorradiculopatia esquistossomótica), caracterizada pela presença de ovos e de granulomas no sistema nervoso central (Brasil, 2019; Fidelis *et al.*, 2020).

#### 2.4 FORMAÇÃO DOS GRANULOMAS HEPÁTICOS E INTESTINAIS

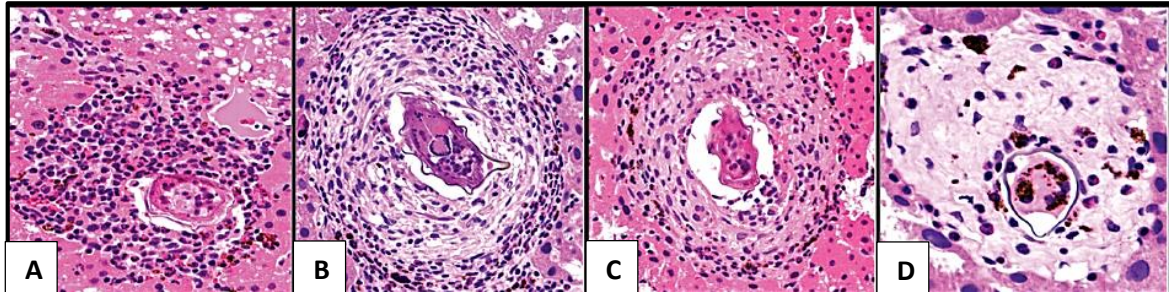
Os granulomas desempenham um papel crucial na esquistossomose ao proteger os tecidos do hospedeiro, agindo como uma barreira contra as toxinas potenciais liberadas pelos ovos. Após a deposição dos ovos nos tecidos, eles prontamente são envoltos por infiltrados de células inflamatórias, resultando na



formação do granuloma. Esse processo é dinâmico, com as lesões variando em tamanho e composição celular ao longo do tempo, sendo coordenado pela influência de uma rede de mediadores inflamatórios (Hams; Aviello; Fallon, 2013; Llanwarne; Helmby, 2021).

A reação granulomatosa é uma lesão dinâmica que se modifica com o tempo (FIGURA 6), podendo ser classificadas como **Granuloma exsudativo** que ocorre nos primeiros dias após a oviposição e é caracterizado por intenso exsudato de células mononucleadas e eosinófilos em torno do ovo. Após isso progride para **Granuloma necrótico-exsudativo** (60 a 78 dias) e apresenta, além dos elementos anteriores, zona de necrose de extensão variada em torno do ovo, às vezes formam-se células epitelióides, que são macrófagos justapostos, com citoplasma abundante, em contato imediato com o verme ou com os restos ovulares. Em seguida ocorre o **Granuloma exsudativo-produtivo** (inicia-se cerca de 70-78 dias) onde ocorre a fusão dos macrófagos e com isso resulta em uma ou mais células gigantes englobando total ou parcialmente os ovos mortos e empreendem a digestão lenta dos restos parasitários, a eosinofilia diminui e dão lugar a uma reação macrofágica e fibroblástica. O granuloma exsudativo-produtivo corresponde à linha divisória entre as duas fases e o fator determinante dessa virada funcional é a morte do miracídio. Existe ainda uma outra fase, que no homem, corresponde ao período entre 90 a 120 dias após a infecção, onde os granulomas encontram-se na **fase produtiva**, com maior tendência para a fibrose onde, quase sempre, não se encontra a zona central de necrose, a neoformação conjuntiva é mais evidente e falta quase completamente a eosinofilia difusa nos sinusoides. Por fim **Granuloma de cura por fibrose** (a partir de 150 dias) onde os macrófagos produzem o Fator de Crescimento de Fibroblastos (FCF), que estimula a proliferação de fibroblastos e a formação de colágeno. Os fibroblastos, por sua vez, se orientam igualmente em camadas concêntricas, em toda a espessura do granuloma, e fabricam abundante quantidade de colágeno, até, que ao término de sua função, passam a fribrócitos, a medida que os fibroblastos aumentam, o granuloma esquistossomótico apresenta-se como uma cicatriz fibrosa de estrutura lamelar, cujos cortes transversais lembram um bulbo de cebola (Andrade, 2008; Amaral *et al.*, 2017; Llanwarne; Helmby, 2021).

Figura 6 - Fases na formação do granuloma durante o desenvolvimento da esquistossomose nas fases aguda e crônica no fígado de camundongos Swiss Webster



Fonte: Adaptado de Amaral *et al.* (2017)

Legenda: A – Granuloma exsudativo; B – Granuloma Necrótico exsudativo; C – Granuloma exsudativo produtivo e D – Granuloma produtivo

Desta forma, ao longo do desenvolvimento da esquistossomose na fase crônica, os granulomas periovulares hepáticos causados pelo *Schistosoma mansoni* passam por alterações em seu tamanho, composição celular e aparência. Essas mudanças, conhecidas como "modulação imunológica", estão relacionadas ao estado imunológico do hospedeiro. No entanto, observa-se que, no fígado, fatores locais desempenhem um papel crucial nesse fenômeno. Em um estudo focado nos componentes da matriz extracelular dos granulomas periovulares em camundongos indicam que a modulação é um fenômeno particularmente característico hepático, uma vez que os granulomas pulmonares e intestinais, formados em torno de ovos maduros, não apresentaram alterações em seu tamanho e aparência ao longo do tempo (Silva *et al.*, 2000; Mayer *et al.*, 2017). Estes autores analisaram os componentes da matriz extracelular (colágenos tipo I, III e IV, fibronectina, laminina, proteoglicanos e elastina) e indicam que estes parâmetros foram encontrados em todos os granulomas e órgãos examinados, mas sua presença foi especialmente proeminente no fígado. A elastina foi detectada apenas nos granulomas hepáticos durante a fase crônica da infecção. A grande quantidade de componentes da matriz extracelular encontrados nos granulomas hepáticos foi a principal responsável pelas mudanças morfológicas observadas na modulação. Conseqüentemente, o ambiente peculiar do fígado com a estrutura celular não parenquimatosa, onde as células perissinusoidais e as células de Kupffer participam de um eixo "sui generis" relacionado com a formação e degradação da matriz, acaba determinando as alterações identificadas no granuloma esquistossomótico como "modulação". Este

aspecto único relacionado às diferenças do desenvolvimento da patologia hepática e intestinal da esquistossomose também foram observadas em estudos de Weinstock e Boros (1983); Lenzi *et al.* (2008a) e Amaral *et al.*(2017).

## 2.5 QUIMIOTERAPIA DA ESQUISTOSSOMOSE MANSÔNICA

O Praziquantel é um medicamento amplamente utilizado no tratamento de infecções parasitárias causadas por platelmintos, como a esquistossomose. O mecanismo de ação do praziquantel ainda não está completamente elucidado, mas acredita-se que ele afete a membrana celular do parasito, levando à alterações na permeabilidade iônica, despolarização da membrana e aumento da concentração de cálcio intracelular. Isso leva à paralisia e morte do parasito. Agindo provavelmente na inibição da bomba  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ , aumentando, assim, a permeabilidade da membrana do helminto a certos cátions monovalentes e divalentes, principalmente ao  $\text{Ca}^{2+}$ , que leva a intensificação da atividade muscular, seguida por contração e paralisia espática. Assim, os helmintos se desprendem dos tecidos do hospedeiro e são deslocados das veias mesentéricas para o fígado, ao passo que os helmintos intestinais são expelidos. Além disso, o Praziquantel provoca alterações na morfologia do tegumento como vacuolizações, destruição de tubérculos e perda de espinhos, aumentando, assim, a exposição de antígenos na superfície do parasito e, conseqüentemente, estimulando a resposta imunológica do hospedeiro (Doenhoff *et al.*, 2008; Thétiot-Laurent *et al.*, 2013).

Embora bem tolerado em virtude de sua baixa toxicidade, o Praziquantel não é eficiente sobre as formas de esquistossômulos e formas jovens do parasito o que, atualmente, se constitui o problema mais sério no seu uso clínico. Outra desvantagem se encontra no fato de ser rapidamente eliminado da circulação e quase completamente do organismo via fezes e urina em, aproximadamente, 24 horas, além de apresentar baixa solubilidade em água, fatores que prejudicam a sua biodisponibilidade. Está cada vez mais frequente a notificação de casos de resistência ao Praziquantel em diversas regiões, principalmente da África. Considerando a possibilidade do aparecimento de resistência do verme ao fármaco, falhas terapêuticas e intolerância do paciente ao tratamento, fica claro o risco de se ter somente dois fármacos (Praziquantel e Oxamniquina) para o tratamento da esquistossomose (Doenhoff *et al.*, 2002; Salih *et al.*, 2023). Porém, existe um

consenso que a quimioterapia tem um valor inquestionável na redução da morbidade em áreas endêmicas (WHO, 1993), mas ainda assim, são urgentes e necessárias estratégias novas e sustentáveis para controlar a doença e limitar a imunopatologia (Stark *et al.*, 2023).

Utilizando uma abordagem mais ampla, seria interessante o desenvolvimento de novas condutas terapêuticas que não apenas combatam o verme, mas também os efeitos dessa doença, tendo como alvo o sistema imunológico do hospedeiro como parte integral de sua estratégia no controle da forma crônica e mais grave da esquistossomose (Licá *et al.*, 2023).

## 2.6 MICROBIOTA, ANTIBIÓTICOS E DISBIOSE

Atualmente, reconhece-se que, ao avaliar o impacto das doenças na população humana, é crucial considerar as mudanças no estilo de vida e nos fatores ambientais amplamente adotados pela sociedade, sendo que alterações podem ocorrer no microbioma humano e no metagenoma de todos os microrganismos que colonizam o corpo humano decorrentes destas transformações (Levy, 2017; Stark *et al.*, 2023). Entre as causas de alteração da microbiota, o uso de antimicrobianos se destaca. Esta classe terapêutica pode alterar características taxonômicas, genômicas e funcionais, por exemplo, da microbiota intestinal humana, com efeitos rápidos e, por vezes, persistentes, levando a um estado de disbiose. O termo disbiose se refere a uma perturbação persistente da microbiota intestinal e foi definido como uma alteração na composição e função da microbiota causada por fatores ambientais e relacionados ao hospedeiro que superam as capacidades de resistência e resiliência do ecossistema microbiano (Ramirez *et al.*, 2020). Depois que a configuração da microbiota é alterada, a disbiose também persiste como um estado estável e pode assumir várias manifestações composicionais dependendo do gatilho (David, 2014).

Sem dúvida, desde a descoberta da penicilina por Alexander Fleming em 1928 e posteriormente, os antibióticos usados no tratamento de doenças infecciosas salvaram milhões de vidas. Nas últimas duas décadas, o uso indevido e excessivo de antibióticos passou a ser considerado um sério problema de saúde pública, colocando em risco as grandes conquistas da medicina. Embora o tratamento com antibióticos seja fundamental para o combate às infecções, seus efeitos sobre a microbiota intestinal e a imunidade do hospedeiro têm se mostrado de extrema importância

(Konstantinidis *et al.*, 2020). Vários estudos reconheceram as consequências adversas do uso de antibióticos sobre o microbiota intestinal em adultos e neonatos, causando disbiose. É bem conhecido que os antibióticos podem produzir alterações na microbiota do hospedeiro, favorecendo a translocação ou selecionando bactérias resistentes que podem aparecer como patógenos oportunistas (Bezirtzoglou; Alexopoulos; Voidarou, 2008; Lange *et al.*, 2016; Álvarez *et al.*, 2021; Matzaras *et al.*, 2022; Aghamohammad; Mahdi, 2023).

Em um estudo realizado em lactentes tratados com antibióticos, principalmente os prematuros, o tratamento com vários antibióticos, como cefalexina, gentamicina, vancomicina e eritromicina, alterou a microbiota bacteriana normal de lactentes, aumentando a porcentagem de *Enterobacteriaceae* potencialmente patogênicas e diminuindo a quantidade de bactérias como *Bifidobacteriaceae*, *Bacillus* e *Lactobacillus*, que fazem parte da microbiota saudável (Greenwood *et al.*, 2014).

O recente aumento em nosso conhecimento da microbiota intestinal humana lança um novo espectro de estudos sobre os efeitos dos antibióticos. Alguns antibióticos, de fato, não são mais considerados apenas benéficos, mas também potencialmente prejudiciais, pois seu abuso parece desempenhar um papel na patogênese de vários distúrbios associados ao comprometimento da microbiota (por exemplo, infecções por *Clostridium difficile* ou distúrbios metabólicos) (Rafey *et al.*, 2023). Tanto os fatores relacionados aos medicamentos (como classe do antibiótico, farmacocinética, farmacodinâmica, tempo de exposição ou via de administração) e fatores relacionados ao hospedeiro parecem influenciar as alterações produzidas pelos antibióticos na microbiota intestinal humana (Ianiro *et al.*, 2016).

Estas alterações podem ser tanto quantitativa quanto qualitativamente, reduzindo ou eliminando espécies bacterianas e permitindo que outras espécies obtenham mais espaço e nutrientes no intestino (Arboleja *et al.*, 2015). Os impactos destas alterações, no entanto, ainda carecem de novos estudos.

De fato, segundo Antunes *et al.* (2011), o tratamento com antibióticos interrompe a homeostase intestinal e tem um profundo impacto no metaboloma intestinal, afetando os níveis de mais de 87% de todos os metabólitos detectados. Muitas vias metabólicas críticas para a fisiologia do hospedeiro podem ser afetadas, incluindo ácido biliar, eicosanóide e a síntese de hormônio esteróide.

No entanto, para a maioria dos tratamentos antiparasitários, pouco se sabe sobre os impactos na microbiota, muito menos como o tempo, a frequência e a dose

do tratamento podem influenciar isso, e quão duradouras ou reversíveis tais perturbações podem ser. Em um estudo de Schneeberger *et al.* (2018), com amostras de fezes de 34 crianças pré-escolares na Costa do Marfim infectadas por *S. mansoni* e tratadas com praziquantel (60 mg/kg) mostrou que o perfil taxonômico geral e os indicadores de diversidade foram encontrados próximos de uma estrutura intestinal “saudável” em todas as crianças. Ligeiras mudanças globais na composição foram observadas entre crianças infectadas e não infectadas pelo *S. mansoni*. O tratamento com praziquantel não foi associado a uma grande mudança nos perfis taxonômicos intestinais, reforçando assim o bom perfil de segurança do fármaco ao descartar efeitos fora do alvo nos micróbios intestinais. O *gene* 16S rRNA da ordem *Fusobacteriales* foi significativamente mais abundante em indivíduos curados, tanto no início quanto 24 horas após o tratamento. A análise do PCR em tempo real, neste estudo citado, confirmou a superabundância de *Fusobacterium* spp. em crianças curadas. A abundância de *Fusobacterium* spp. também pode estar correlacionada com a redução de ovos de *S. mansoni* induzida pelo tratamento, concluindo que nem a infecção por *S. mansoni* nem a administração de praziquantel desencadeiam um efeito significativo na composição microbiana.

Em um outro estudo, o tratamento com o antibiótico enrofloxacina foi capaz de alterar a suscetibilidade dos hospedeiros a infecções parasitárias através de interações parasito-microbiota. Por exemplo, a administração do antibiótico enrofloxacina em camundongos imunodeficientes diminuiu microrganismos aeróbicos e anaeróbicos no intestino e resultou em um número significativamente reduzido de ovos de *Trichuris muris* e cargas de vermes resultantes (Hayes *et al.*, 2010).

Nesse contexto, pesquisas sobre terapias que adotem um quadro de ecologia comunitária (Sinecologia) e examinem explicitamente os efeitos do tratamento na comunidade geral da microbiota intestinal, permitindo-nos proteger contra consequências negativas não intencionais de intervenções medicamentosas no nível ecossistêmico têm se mostrado de extrema importância. Ferramentas da ecologia comunitária também são úteis para entender as interações das espécies em comunidades biológicas complexas. Por exemplo, experimentos de perturbação comunitária envolvendo tratamentos antiparasitários ou antibióticos podem complementar experimentos de infecção controlada, fornecendo uma maneira poderosa de examinar como a alteração de um grupo de organismos afeta outro ao longo do tempo (Leung *et al.*, 2018).

Simultaneamente, estudos de reposicionamento de fármacos levantam possibilidades interessantes para o uso de fármacos voltados para determinadas doenças causadas por um organismo serem usados no enfrentamento de outro, como também a capacidade de algumas substâncias, como probióticos e prebióticos, modularem positivamente a microbiota intestinal e favorecerem o desfecho final de determinada patogênese, conforme indicam estudos recentes (Mohamed *et al.*, 2016; dos Santos *et al.*, 2023; Chen *et al.*, 2024).

Yang *et al.* (2021) ressaltam que as interações entre os medicamentos e a microbiota são bidirecionais. Os antibióticos podem perturbar a microbiota intestinal e os microrganismos também podem modular os medicamentos, modificando assim a composição química e levando à resistência antimicrobiana.

Por fim, evidências cada vez mais significativas destacam o papel crucial da microbiota intestinal na patogênese da esquistossomose mansônica. Em um estudo conduzido por Holzscheiter *et al.* (2014), verificou-se que a administração de antibióticos e antimicóticos de amplo espectro (metronidazol, ciprofloxacina, imipenem, ampicilina, vancomicina e fluconazol) a camundongos C57BL/6 infectados com *S. mansoni* e depletados, resultou em uma redução substancial da inflamação intestinal e do desenvolvimento do granuloma. Além disso, os autores observaram alterações nas respostas imunes específicas contra o *Schistosoma* ao analisarem a produção de citocinas por linfócitos dos linfonodos mesentéricos estimulados *in vitro* com antígeno ovular solúvel (SEA) ou  $\alpha$ CD3, após a depleção da microbiota. Ficou evidente a redução nos níveis de IFN- $\gamma$  e IL-10, bem como um aumento, embora não significativo, de IL-13. Além disso, os camundongos com microbiota depletada apresentaram uma redução na excreção fecal de ovos. Esse estudo pioneiro demonstrou de forma clara o papel direto da microbiota intestinal no desenvolvimento da resposta imune responsável pela patogênese da esquistossomose.

Diante do exposto, optou-se pela análise da ação de dois antibióticos neste experimento, sendo o primeiro, a Gentamicina. Em um trabalho de Araújo (2021), que buscou identificar e isolar bactérias no fígado de camundongos BALB/c infectados por *S. mansoni*, foram isoladas quatro espécies de bactérias (*Bordetella hinzii*, *Haemophilus haemolyticus*, *Lactococcus garvieae* e *Escherichia coli*) e foram realizados ensaios para determinar o perfil de sensibilidade das bactérias à diferentes antibióticos (Clindamicina, Doxiciclina, Eritromicina, Gentamicina, Levofloxacino e Sulfametoxazol + Trimetoprima) onde mostrou-se que todas as espécies estudadas

apresentaram sensibilidade para Gentamicina. O segundo antibiótico escolhido foi a Doxiciclina por esta apresentar estudos anteriores que indicaram efeitos na formação e modulação de granulomas esquistossomóticos (Cunha *et al.*, 2000, Dias *et al.*, 2019; Santos *et al.*, 2021).

## 2.7 ANTIBIÓTICOS

### 2.7.1 Gentamicina

A Gentamicina é um fármaco aminoglicosídeo, esta classe de antibióticos têm sido um componente do arsenal de fármacos antimicrobianos desde 1940, e têm uma ação previsível contra a maioria dos bacilos gram-negativos aeróbios. Apresenta atividade bactericida contra microorganismos suscetíveis e sua ação é dependente da concentração do fármaco no local da infecção. Os aminoglicosídeos são fármacos primariamente bactericidas por causarem alterações em proteínas sintetizadas pela bactéria, ao ligarem-se irreversivelmente aos ribossomos bacterianos. Podem também atuar de forma bacteriostática ao inibirem a síntese de proteínas (Neves *et al.*, 2015). O mecanismo da atividade bactericida da gentamicina ainda não foi totalmente elucidado. Ainda assim, alguns autores propõem que proteínas defeituosas seriam colocadas na parede celular, comprometendo sua impermeabilidade. Desta forma, a capacidade de interferir na síntese proteica bacteriana, levaria à formação de proteínas defeituosas, que se ligariam na unidade 30S do ribossomo, levando a uma leitura incorreta do código genético e, como consequência, permitindo a incorporação de aminoácidos incorretos na cadeia polipeptídica formada no ribossomo. Ao mesmo tempo, outros autores também sugerem que o acúmulo de espécies reativas de oxigênio, como consequência da depleção de proteínas envolvidas nas reações de oxirredução, poderia levar à morte bacteriana (Chaves; Tadi, 2022).

A descoberta da Gentamicina ocorreu em 1963 nos Estados Unidos, liderada por Marvin J. Weinstein e sua equipe do Departamento de Microbiologia da Schering Corporation. Esses pesquisadores isolaram esse antibiótico a partir de duas espécies de actinomicetos do gênero *Micromonospora* (Goodman, 2007). Considerada um marco na história dos aminoglicosídeos, a Gentamicina apresentou uma ampla atividade contra diversas espécies bacterianas, incluindo a *Pseudomonas aeruginosa*. Desde sua descoberta, a Gentamicina tem incentivado a pesquisa de novos



antibióticos com um espectro de ação semelhante, como a Tobramicina (descoberta em 1968) e a Sisomicina (descoberta em 1970), ambas mais ativas contra certas espécies bacterianas. No entanto, o uso do medicamento na terapia de doenças graves resultou em efeitos tóxicos, exigindo estudos para entender as reações adversas durante o tratamento. No final da década de 1960, começaram a surgir estudos que comprovaram os efeitos nefrotóxicos e ototóxicos da Gentamicina (Chaves; Tadi, 2022).

Três características descrevem a atividade bactericida dos aminoglicosídeos ao inibir a síntese de proteínas da bactéria: é dependente da concentração do fármaco no local da infecção, o efeito pós-antibiótico e o sinergismo com outros antibióticos, em especial a Penicilina, Ampicilina, Oxacilina, Cefalosporinas e a Vancomicina. Em relação ao efeito pós-antibiótico, os aminoglicosídeos apresentam este efeito prolongado contra bacilos gram-negativos e contra o *Mycobacterium tuberculosis*, o que garante o efeito do fármaco por algum tempo, mesmo quando a concentração plasmática do antibiótico estiver abaixo da concentração inibitória mínima (MIC) da bactéria (Goodman, 2007).

Os microrganismos mais comuns em ambientes clínicos que apresentam respostas terapêuticas adequadas à Gentamicina são membros da família *Enterobacteriaceae* (por exemplo, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia* spp. e *Enterobacter* spp.), *Pseudomonas aeruginosa* e algumas cepas dos gêneros *Neisseria*, *Moraxella* e *Haemophilus*. Uma porcentagem significativa de estafilococos coagulase negativos e isolados de *Staphylococcus aureus* sensíveis à meticilina apresentam inibição pela Gentamicina na concentração clínica do medicamento (Chaves; Tadi, 2022).

Em estudo de Neves *et al.* (2015) fazendo uma triagem quimiogenômica baseada em alvos de um conjunto de dados de 2.114 proteínas para identificar medicamentos aprovados para uso clínico em humanos que podem ser ativos contra múltiplos estágios de vida do *Schistosoma mansoni*, cada uma dessas proteínas foi tratada como um potencial alvo de fármacos, e sua sequência de aminoácidos foi usada para interrogar três bancos de dados: *Therapeutic Target Database* (TTD), *DrugBank* e *STITCH*. As interações fármaco-alvo previstas foram refinadas usando uma combinação de abordagens, incluindo alinhamento de pares, estado de conservação de regiões funcionais e análise de espaço químico. Para validar esta estratégia, vários medicamentos previamente mostrados como ativos contra espécies

de *Schistosoma* foram corretamente previstos, como Clonazepam, Auranofin, Nifedipina e Artesunato. Também foram identificados 115 fármacos que ainda não foram testadas experimentalmente contra esquistossomose e que necessitam de uma avaliação mais aprofundada. Alguns exemplos são Aprindina, Clotrimazol, Tetrabenazina, Griseofulvina e Cinarizina, e entre elas, a Gentamicina.

Em um estudo (Chissoca, 2016) utilizando diferentes combinações de antibióticos não absorvíveis: Gentamicina, Metronidazol, Neomicina e Vancomicina, administrada via oral (1 g/L) durante 14 dias, a Gentamicina apresentou uma significativa redução da microbiota já no início do tratamento, em associação com Neomicina e Vancomicina, sendo o resultado mais relevante deste trabalho no que diz a respeito à depleção/seleção da microbiota intestinal.

### **2.7.2 Doxiciclina**

A Doxiciclina está inserida na classe de antimicrobianos das tetraciclinas de segunda geração. Como um fármaco bacteriostático, a Doxiciclina inibe a síntese proteica bacteriana, apresentando amplo espectro de ação contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, cocos, aeróbios e anaeróbios. A Doxiciclina se liga de forma reversível às subunidades ribossômicas de 30S e, possivelmente, à subunidade ribossomal 50S, bloqueando a ligação do RNAt ao RNAm inibindo a síntese de proteínas bacterianas. Sua absorção ocorre por via oral (90% a 100%) e não é afetada pela ingestão de alimentos. A Doxiciclina é distribuída pela maioria dos fluidos corporais, ossos, fígado, baço e dentes (Castro *et al.*, 2011).

Após o metabolismo hepático parcial, a concentração sérica dessa tetraciclina é atingida entre 2 e 4 horas, e sua meia-vida varia de 12 a 22 horas. A excreção ocorre principalmente pelas fezes, enquanto outras tetraciclinas são eliminadas por filtração glomerular. Alguns efeitos adversos frequentes associados à classe das tetraciclinas e suas formas semissintéticas incluem distúrbios gastrointestinais, como anorexia, vômito, náuseas e diarreia, além de ulcerações na boca, irritação na região perianal e reações de fotossensibilidade (Griffin *et al.*, 2010).

No entanto, possuem vários efeitos terapêuticos, além de sua atividade antimicrobiana (Ahler *et al.*, 2013; Bode *et al.*, 2014). A Doxiciclina tem sido utilizada em diversos estudos com objetivos além de sua ação bacteriostática primária, incluindo suas propriedades de inibição das metaloproteinases de matriz (MMPs) em

doses sub-microbianas (Cunha, 2000; Dias *et al.*, 2019; Santos *et al.*, 2021), ação anticolagenolítica (Tjaderhane *et al.*, 2007), atividades anti-inflamatórias e antiapoptóticas, bem como a inibição da proteólise, angiogênese e metástase tumoral (Garrido-Mesa *et al.*, 2013). Como propriedades anti-inflamatórias, pode-se elucidar a inibição da ativação das células T e quimiotaxia, a regulação negativa de citocinas pró-inflamatórias, incluindo TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  (SAPADIN; Fleischmajer, 2006). Também em um estudo de González-Lizárraga *et al.* (2017) foi observado que a doxiciclina usada em doses mais baixas que as usadas contra infecções bacterianas, apresenta um efeito protetor sobre neurônios, reduzindo o efeito tóxico da proteína  $\alpha$ -sinucleína e impedindo o avanço da doença de Parkinson.

O reposicionamento de fármacos já demonstrou, ao longo do tempo, sua importância para a descoberta de novos usos, por exemplo como antimaláricos, uma vez que antibióticos de amplo espectro já demonstraram ter atividade antimalárica. As tetraciclina como a Doxiciclina, foi utilizada com sucesso na quimioprofilaxia e no tratamento da malária (Rieckmann *et al.*, 1971; Clyde; Gilman; McCarthy, 1975; Leal, *et al.*, 2003; Panic *et al.*, 2014; Rajendran *et al.*, 2018).

A Doxiciclina também tem sido bastante estudada como um novo medicamento antifilárico. Os efeitos da Doxiciclina administrada em combinação com os fármacos padrão também foram caracterizados. Por exemplo, uma combinação de Doxiciclina e Albendazol foi muito mais eficaz na supressão da microfilária circulante do que a Doxiciclina ou o Albendazol isoladamente (quase 100% de supressão vs. 69% e 89%, respectivamente, quando verificados no dia 365 pós-tratamento) e até conseguiu eliminar completamente em 42% dos pacientes com microfilaremia (Gayen *et al.*, 2013).

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Investigar o efeito *in vivo*, na fase aguda da esquistossomose, da associação dos antibióticos Doxiciclina e Gentamicina ao Praziquantel no tratamento em camundongos BALB/c machos infectados por *Schistosoma mansoni*.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Para atingir o objetivo proposto, buscou-se:

- a) observar e comparar a formação e as fases de granulomas esquistossomóticos no tecido hepático dos grupos experimentais de camundongos por meio de análises histopatológicas e histomorfométricas, bem como o acúmulo de células mono e polimorfonucleares;
- b) identificar as alterações histopatológicas intestinais, na fase aguda da infecção por *S. mansoni*;
- c) analisar parâmetros bioquímicos ALT, AST, Albumina e Fosfatase Alcalina dos grupos experimentais de camundongos BALB/c na fase aguda da infecção por *S. mansoni*;
- d) quantificar a carga parasitária no tecido hepático dos grupos experimentais por PCR em Tempo Real.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 ASPECTOS ÉTICOS

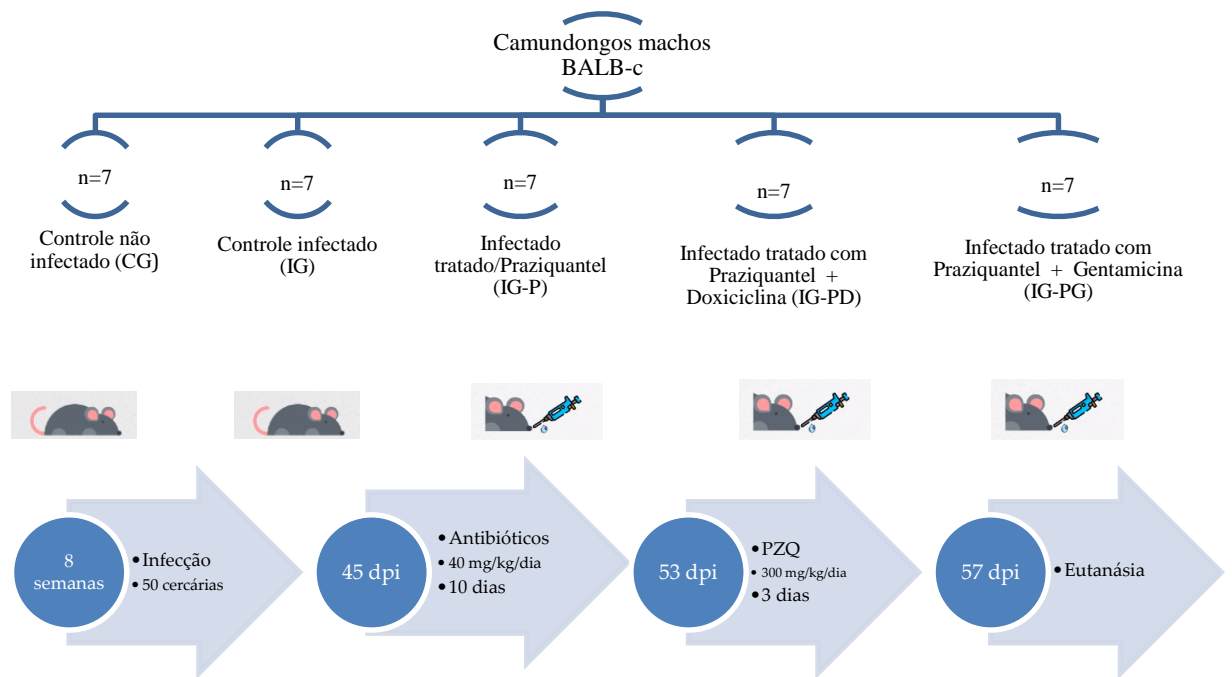
Este estudo foi previamente submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em pesquisa com animais da Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL - MG), parecer 0024/2020, e seguiu os preceitos de experimentação animal previstos nas recomendações do “*Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*”, constante no NIH (2011).

### 4.2 ANIMAIS

Camundongos machos BALB/c com 8 semanas de idade, pesando aproximadamente 25g, foram inoculados no dorso, individualmente, com 50 cercárias de *S. mansoni*, por via subcutânea, seguindo o protocolo do Centro de Pesquisas René Rachou/Fundação Oswaldo Cruz. Os animais foram mantidos em gaiolas devidamente identificadas, com ração e água *ad libitum* e mantidos em sala com temperatura, iluminação e umidade controlados durante todo experimento, sob condições padronizadas de iluminação (ciclo de claro/escuro de 12h/12h), temperatura (23° C) e umidade (60±10%).

### 4.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Os animais foram randomicamente divididos em grupos conforme o esquema a seguir:



#### 4.3.1 Tratamento com antibióticos

Os camundongos nos grupos tratados com antibióticos receberam 100  $\mu$ L de uma solução dos antibióticos Doxiciclina padronizado para 40 mg/kg/dia (Classe das Tetraciclina) e Gentamicina padronizado para 40 mg/kg/dia (Classe dos Aminoglicosídeos), durante 10 dias, por gavagem, e os camundongos do grupo controle receberam 100  $\mu$ L de água, também por gavagem. O tratamento com antibióticos teve início 45 dias após a infecção.

#### 4.3.2 Tratamento com Praziquantel

O grupo dos animais tratados com Praziquantel receberam 100  $\mu$ L de uma solução de Praziquantel na concentração adequada para 300 mg/kg/dia durante 3 dias (Protocolo FIOCRUZ), por gavagem e, os camundongos do grupo controle receberam 100  $\mu$ L de água, também por gavagem. O tratamento com Praziquantel teve início com 53 dias após a infecção.

### 4.3.3 Eutanásia dos animais e coleta de material

A eutanásia dos camundongos foi feita 24 horas após os procedimentos de tratamento (Dias *et al.*, 2019; Santos *et al.*, 2021), ocorrendo no 57º dia após a infecção, sendo os camundongos eutanasiados por exsanguinação por punção cardíaca após anestesia com administração intraperitoneal de Quetamina (0,1 mg/kg de peso corporal) e Xilazina (0,05 mg/kg de peso corporal). O sangue foi coletado e colocado em tubos contendo heparina e centrifugado imediatamente para obtenção do plasma, mantido armazenado a -80 °C até o momento das análises. Foram realizados toracotomia e laparotomia mediana para coleta do fígado e intestino, os quais foram coletados para realização das análises histológicas, estes foram fixados em solução de formaldeído para análises posteriores.

### 4.3.4 Histopatologia e Análise Morfológica

As amostras de intestino grosso e fígado dos camundongos de todos os grupos experimentais foram removidos e fixados em solução de formaldeído 4% tamponada neutra, processados rotineiramente e incluídos em parafina. Foram realizados cortes semiseriados com espessura de 5 micrômetros ( $\mu\text{m}$ ), desprezando um espaçamento entre os cortes de 120  $\mu\text{m}$ . Os cortes microscópicos foram corados com Hematoxilina/Eosina (HE), para observação dos aspectos histomorfológicos do tecido.

Para observar a disposição de colágeno encontrada nos diferentes estágios do granuloma nos grupos infectados alguns cortes foram corados com Picrosirius Red conforme metodologia descrita por Junqueira, Cossermelli e Brentani (1978) e avaliadas em microscopia de campo claro e sob luz polarizada.

As imagens das lâminas histológicas foram capturadas com uma câmera digital ligada a um microscópio. Para a contagem e quantificação do infiltrado inflamatório (células mononucleares: monócitos e linfócitos; e polimorfonucleares: neutrófilos e eosinófilos, foram realizadas dez imagens nos cortes histológicos de cada animal em objetiva 100x. As imagens obtidas foram processadas e analisadas por software analisador de imagem (AxioVision). Foram mensurados os parâmetros: Densidade numérica dos granulomas (Granulomas/ $\mu\text{m}^2$ ), Área percentual de granulomas (%), além da quantificação do infiltrado inflamatório (células mononucleares e polimorfonucleares. A classificação dos estágios evolutivos dos granulomas foi

realizada de acordo com estudos anteriores (Lenzi *et al.*, 1998; Lins *et al.*, 2008; Amaral *et al.*, 2017).

Posteriormente foram realizadas análises mais detalhadas de Percentual de Hepatócitos Binucleados, Relação Núcleo/Citoplasma, Percentual de parênquima hepático, Percentual de Sinusoides Hepáticos, Percentual de Hepáticos PAS+ (glicogênio) e Contagem de ovos por mm<sup>2</sup>.

O parênquima hepático, a densidade de sinusoides foram analisados em imagens obtidas pela coloração Hematoxilina/Eosina (aumento de 400x) usando um sistema de teste proposto por Novaes *et al.* (2012). Os resultados obtidos foram reportados em percentuais. O número de hepatócitos foi relatado como Hepatócitos/mm<sup>2</sup> e o percentual de hepatócitos binucleados foi calculado dividindo o total de hepatócitos binucleados pelo total de hepatócitos por campo.

As áreas médias dos hepatócitos e as razões núcleo/citoplasma foram relatadas em  $\mu\text{m}^2$  e percentual, respectivamente. Todas as análises histomorfométricas descritas acima foram realizadas em cortes histológicos na coloração HE (amplificação de 400x), utilizando as ferramentas de medida do software Image-Pro Plus 6.3® (Novaes *et al.*, 2012; Miranda *et al.*, 2020).

A análise quantitativa do glicogênio hepático (Método do Ácido Periódico de Schiff - PAS) foi realizado nas imagens de cortes histológicos de fígado corados pelo método PAS (Apaer *et al.*, 2019), a distribuição de glicogênio nos hepatócitos foi estimada a partir de um método computacional baseado na segmentação por cores, utilizando o software ImageJ (fotografias nas ampliações de 200x). Os resultados são reportados em percentual de hepatócitos PAS+, conforme descrito na literatura (Gonçalves *et al.*, 2019; Zapparina *et al.*, 2021).

#### **4.3.5 Dosagem de parâmetros bioquímicos ALT, AST, Fosfatase alcalina e Albumina**

Os parâmetros hematológicos e bioquímicos são amplamente utilizados como indicadores fisiológicos dos animais em resposta a alterações endógenas e como biomarcadores de diagnóstico. Alterações nesses parâmetros podem sugerir, por exemplo, em casos de lesões em órgãos ou tecidos específicos. Os valores de referência desses parâmetros, quando corretamente interpretados, podem



demonstrar, portanto, as condições do animal no momento da amostragem (Oliveira *et al.*, 2021).

Para a avaliação da integridade da função hepática, as lesões nos hepatócitos são detectadas através da mensuração de enzimas séricas liberadas do rompimento celular hepático, fornecendo informações da extensão, magnitude e curso (aguda ou crônica) da lesão. A atividade de aspartato aminotransferase (AST), também conhecida de transaminase glutâmica oxalacética (TGO), e de alanina aminotransferase (ALT), também chamada de transaminase glutâmico pirúvica (TGP), Fosfatase alcalina e Albumina foram quantificadas no plasma dos animais experimentais através do teste colorimétrico seguindo as instruções do fabricante.

Os exames bioquímicos foram realizados em aparelho automático (LabMax Pleno – LabTest®). Foram mensurados os níveis séricos de ALT, AST, Fosfatase alcalina e Albumina. Os parâmetros bioquímicos foram determinados utilizando-se *kits* específicos (LabTest®) com metodologia cinética para determinação das atividades enzimáticas e colorimétrica para os demais testes, conforme descrição do fabricante.

#### **4.3.6 Análise de amostras de fígado por PCR em tempo real**

##### 4.3.6.1 Extração de DNA

A extração de DNA das amostras testadas e dos ovos de *S. mansoni* para a construção da curva-padrão foram processadas conforme protocolo básico de extração de DNA com colunas de afinidade, segundo as recomendações do fabricante do kit (*PureLink™ Genomic DNA Mini Kit, Invitrogen*).

##### 4.3.6.2 Construção da curva-padrão de DNA de ovos de *S. mansoni*

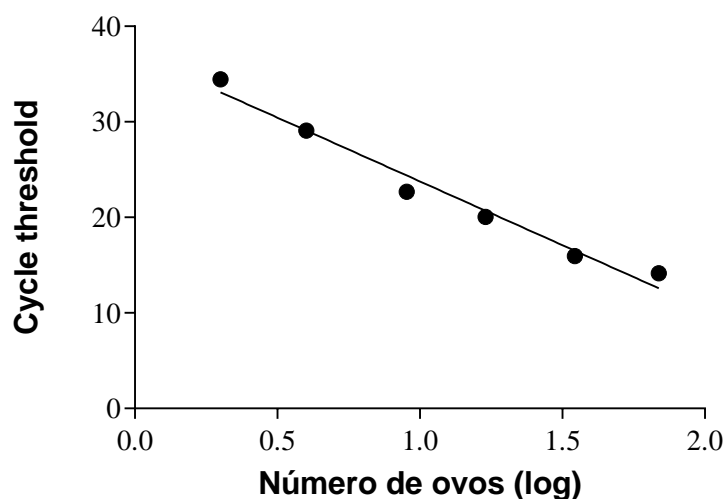
Uma curva-padrão foi construída a partir da diluição seriada de ovos de *S. mansoni* recuperados de fezes de camundongos BALB-c infectados e quantificados em placa de Kline.

Para determinar o comportamento da reação e o limite de detecção da curva padrão, os pontos da curva variaram entre concentrações de 69 a 2,16 ovos. Os “*Cycle thresholds*” (Ct) obtidos foram plotados contra as diferentes concentrações de ovos. O número de ovos foi calculado pelo valor do Ct utilizando uma equação de

regressão linear,  $y=ax+b$ ; onde:  $y = Ct$ ;  $a =$  inclinação da curva (*slope*);  $x$ =número de ovos;  $b=$  onde a curva intercepta o eixo do  $y$  (*y intercept*).

Deste modo foi possível estimar o número de ovos presentes em cada amostra como mostra a figura 7. Sendo o  $R^2$  de 0,9738 determinado para a reação, que indica a correlação entre as variáveis. Foi determinado o limite de detecção da curva correspondendo ao valor máximo de  $Ct$  de 37,12; bem como a inclinação da curva de -13,34, conforme demonstrado abaixo.

Figura 7 – Curva padrão de DNA de ovos de *Schistosoma mansoni*



Fonte: Da autora (2024)

#### 4.3.6.3 PCR em Tempo Real

As reações da PCR em tempo real foram realizadas utilizando o *Power SYBR Green PCR Master Mix* como marcador fluorescente. As reações da PCR em tempo real foram realizadas em um *ABI StepOne Real Time PCR System (Applied Biosystems)*, em um volume final de 10 $\mu$ L por reação. O volume de 1 $\mu$ L de DNA (amostras ou controles) foram adicionadas a um mix contendo 5  $\mu$ L de *2X Power SYBR® Green Master Mix* e 1 $\mu$ L de uma mistura que inclui os iniciadores *forward* e o *reverse* (concentração de 10 $\mu$ M) e 3 $\mu$ L de água ultra pura, livre de DNase e RNase. Foram adicionadas as reações, controles negativos e positivos.

As amplificações para os iniciadores ocorreram em um ciclo inicial de 95°C por 10 minutos, seguido de trinta e cinco ciclos a 95°C por 15 segundos e 60°C por um

minuto. Na próxima etapa foi realizado o estágio de *Melting Curve* constituído de um estágio inicial a 95°C por 15 segundos, 60°C por 1 minuto, seguido da elevação da temperatura, realizando a leitura após cada incremento de 0,3°C, até atingir a temperatura final de 95°C durante 15 minutos.

Para a identificação do DNA de *Schistosoma mansoni* foram utilizados os iniciadores P1 5' GAT CTG AAT CCG ACC AAC CG3' e P2 ATA TTA ACG CCC ACG CTC TC.

#### **4.3.7 Análise Estatística**

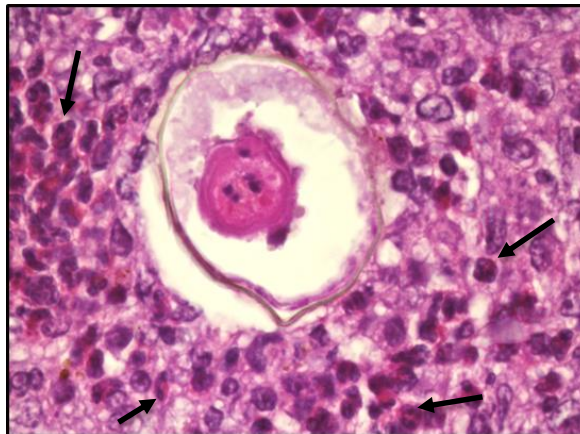
Os dados foram estatisticamente analisados utilizando-se o programa GraphPad Prism versão 8, Software, La Jolla, Califórnia, EUA. Foi realizado o teste de normalidade Shapiro-Wilk e, na sequência, aplicando a análise de variância (ANOVA) seguida do teste de Tukey para múltiplas comparações. O nível de significância adotado foi  $\alpha = 0,05$ , sendo considerado aceitável valores de  $p < 0,05$  como significativos.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O estudo histológico do parênquima hepático após 8 semanas de infecção revelou que os animais infectados demonstraram reações granulomatosas com padrão típico da esquistossomose aguda, com a presença de um grande número de granulomas. As reações granulomatosas apresentavam um acúmulo de células polimorfonucleares, comuns neste período, onde a característica marcante é a intensa resposta inflamatória em torno dos ovos do verme (FIGURA 8).

Como é descrito na literatura, ao longo do tempo de infecção, os granulomas esquistossomóticos hepáticos vão se modificando morfológicamente, apresentando, em camundongos, seu máximo de reatividade celular entre 7 a 9 semanas após a infecção, declinando após este período (Lenzi *et al.*, 1998; Rodrigues *et al.*, 2017).

Figura 8 – Ovo viável de *Schistosoma mansoni* no tecido hepático

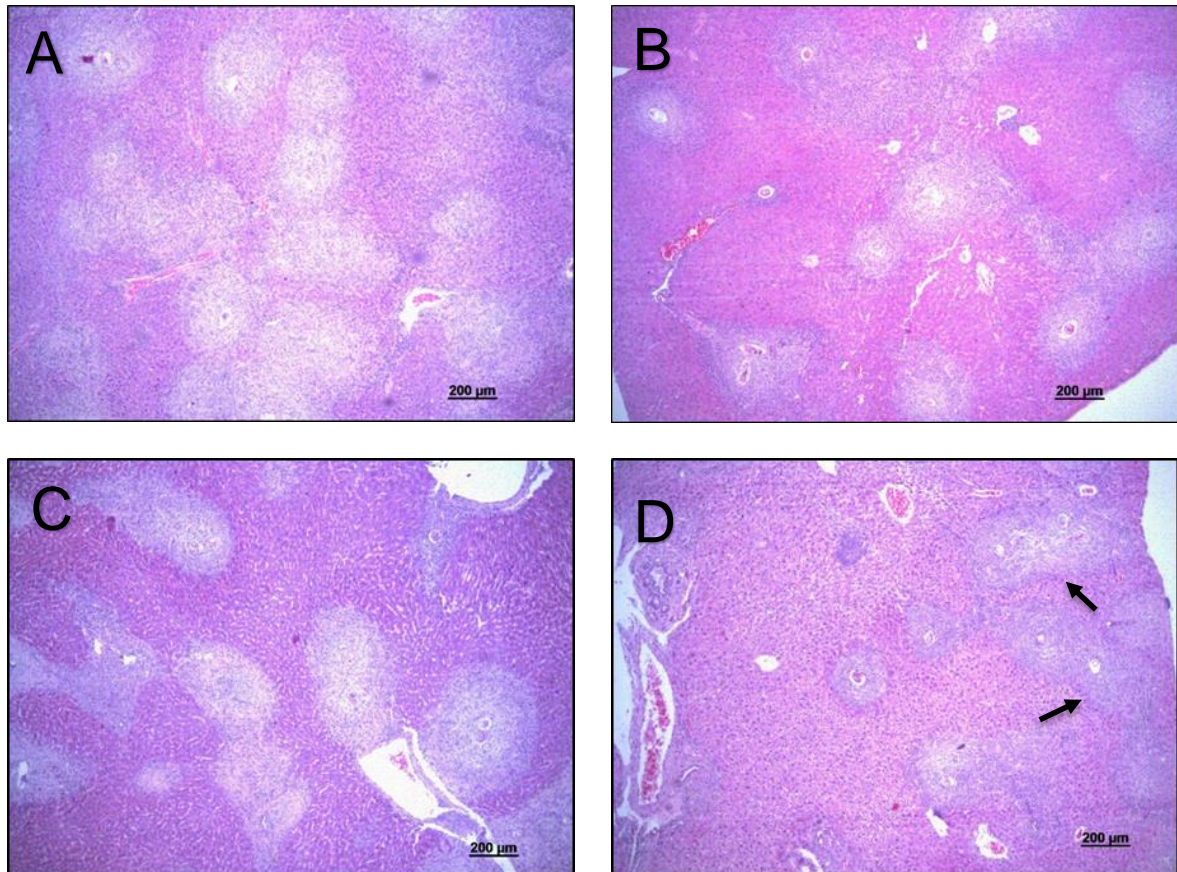


Fonte: Da autora (2024)

Nota: Fotomicrografia de um ovo de *S. mansoni* no fígado de camundongo infectado (IG) corado com Hematoxilina/Eosina em aumento de 40x, evidenciando nas setas infiltrados de células inflamatórias

Na Figura 9 observa-se o aspecto geral, com a objetiva 5x, do tecido hepático afetado pelos granulomas periovulares nos diferentes grupos estudados.

Figura 9 - Fotomicrografias de fígado de camundongos infectados com *Schistosoma mansoni* e necropsiados com 8 semanas após a infecção



Fonte: Da autora (2024)

Legenda: Fotomicrografias de fígado de camundongos corados com Hematoxilina/Eosina Objetiva 5x. **(A)** Aspecto histológico de camundongo do grupo infectado do grupo IG evidenciando as intensas infiltrações celulares granulomatosas formadas ao redor de ovos de *Schistosoma mansoni*; **(B)** Aspecto histológico de camundongo do grupo infectado tratado com Praziquantel do grupo IG-P evidenciando uma diminuição da área dos granulomas formados ao redor de ovos de *Schistosoma mansoni*; **(C)** Aspecto histológico de camundongo do grupo infectado tratado com Praziquantel e Doxiciclina IG-PD, evidenciando granulomas maiores, do tipo necrótico-exsudativo **(D)** Aspecto histológico de camundongo do grupo infectado tratado com Praziquantel e Gentamicina do grupo IG-PG, evidenciando granulomas com áreas menores e granulomas coalescentes (setas) e com características mais próximas da fase exsudativa-produtiva

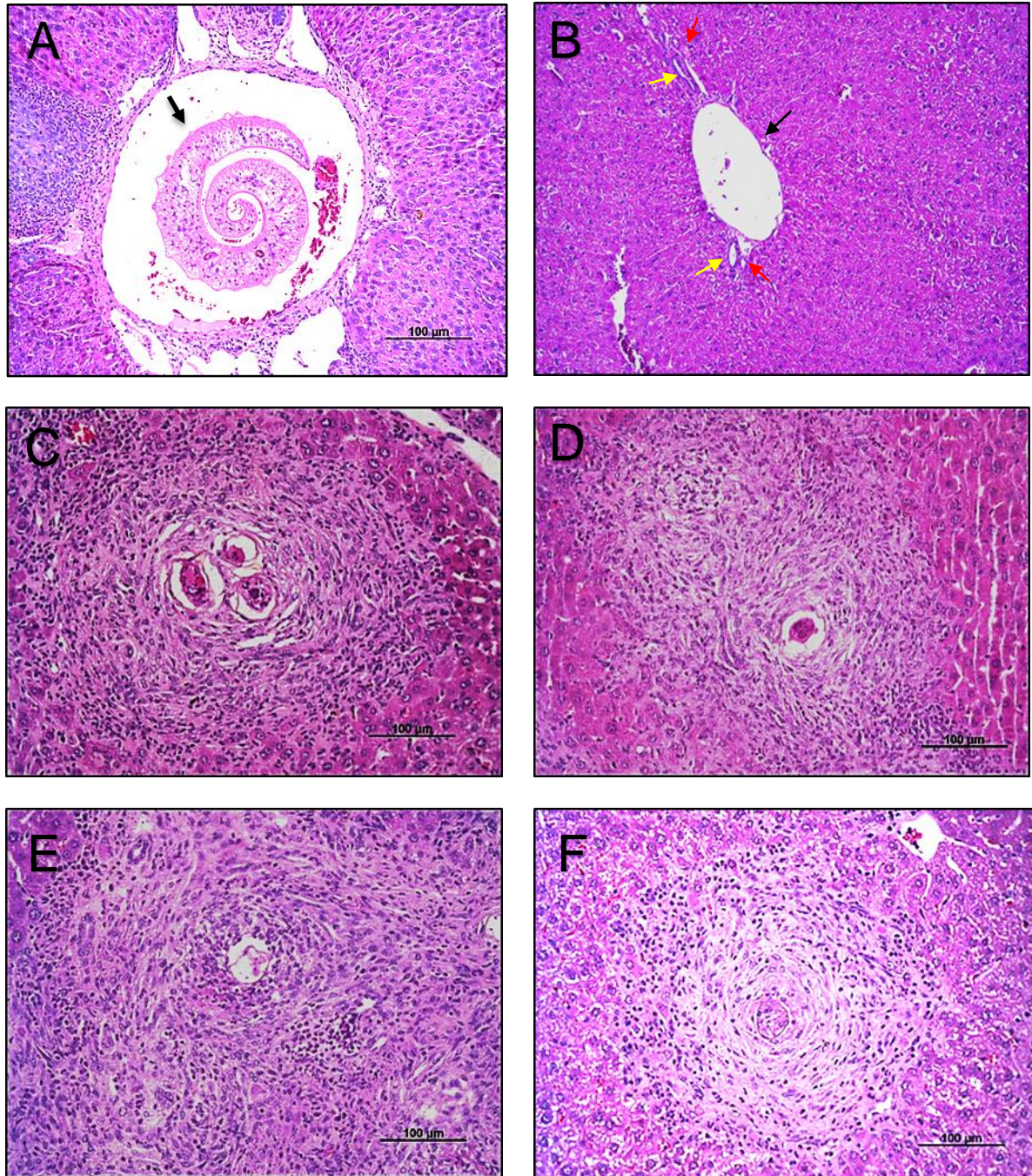
Analisando-se o aspecto geral dos granulomas, observa-se a extensão dos danos provocados no tecido hepático durante a fase aguda da infecção por *S. mansoni*. Pode ser observado que o tratamento com Praziquantel (IG-P) se mostra eficiente em diminuir os diâmetros dos granulomas quando comparado com o grupo controle infectado (IG) (FIGURAS 9A e 9B). No grupo infectado e tratado com

Praziquantel + Doxiciclina (IG-PD) (FIGURA 9C) observa-se um aumento no diâmetro dos granulomas. Nos camundongos do grupo infectado e tratado com Praziquantel + Gentamicina (IG-PG) (FIGURA 9D), observa-se granulomas menores, coalescentes ou apresentando conexões fibrosas entre si ou com espaços-porta que são características mais próximas da fase exsudativa-produtiva.

Segundo observam Silva *et al.* (2000), durante a fase intermediária entre a fase aguda e a fase crônica, os granulomas hepáticos diferem daqueles da fase aguda por apresentarem tendência à confluência e por serem menores e com células e fibras colágenas mais compactadas. Os eosinófilos tornam-se menos numerosos, enquanto os macrófagos e fibroblastos tornam-se mais proeminentes. Estas características são observadas, neste estudo, nos grupos tratados com Praziquantel (IG-P) e Praziquantel e Gentamicina (IG-PG), sendo mais proeminentes neste último grupo, indicando que a associação deste antibiótico ao Praziquantel parece acelerar o processo de modulação do granuloma.

As diferenças observadas nas formações dos granulomas hepáticos entre os grupos são melhor observadas nas fotomicrografias com objetiva 10x do fígado dos camundongos infectados com *Schistosoma mansoni* e os grupos tratados e necropsiados com 8 semanas após a infecção na Figura 10.

Figura 10 - Fotomicrografias de fígado de camundongos infectados com *Schistosoma mansoni* e necropsiados com 8 semanas após a infecção



Fonte: Da autora (2024)

Legenda: Fotomicrografias de fígado de camundongos corados com Hematoxilina/Eosina em aumento de 10x. **(A)** Presença do helminto na veia central (seta); **(B)** Aspecto histológico normal de camundongos controles do grupo controle não infectado (CG), evidenciando os componentes da tríade portal composto por veia porta (seta preta), artérias hepáticas (seta vermelha) e ductos biliares (seta amarela); **(C)** Aspecto histológico de camundongo do grupo infectado do grupo IG evidenciando a infiltração celular granulomatosa formada ao redor de ovos de *Schistosoma mansoni* **(D)** Aspecto histológico de camundongo do grupo infectado tratado com Praziquantel do grupo IG-P evidenciando uma diminuição da área dos granulomas formados ao redor de ovos de *Schistosoma mansoni* **(E)** Aspecto histológico de camundongo do grupo infectado tratado com Praziquantel e Doxiciclina do

grupo IG-PD, evidenciando granulomas maiores, com um extenso infiltrado de eosinófilos e pouco colagenizados **(F)** Aspecto histológico de camundongo do grupo infectado tratado com Praziquantel e Gentamicina do grupo IG-PG, evidenciando granulomas com áreas menores e o início da organização das fibras de colágeno em camadas ao redor do ovo de *S. mansoni* e células inflamatórias mais presentes na região periférica do granuloma.

Na Figura 10A o registro de um helminto macho (seta) na veia central de um camundongo do grupo infectado e não tratado (IG). Na Figura 10B do grupo controle não infectado (CG), nota-se a arquitetura preservada, com o parênquima hepático constituído por cordões de hepatócitos, entremeados por sinusóides e espaços portais de aspecto histológico característico.

É possível observar no grupo infectado não tratado (IG) (FIGURA 10C) a presença de grande número de ovos viáveis e um extenso infiltrado de células inflamatórias espalhadas em toda extensão do granuloma como também no parênquima ao redor, exibindo forte reação inflamatória aguda, evidenciando os fibroblastos que se orientam igualmente em camadas concêntricas.

No grupo infectado e tratado com Praziquantel (IG-P) (FIGURA 10D) já é possível observar uma discreta redução no infiltrado inflamatório e a formação de células epitelióides com abundante citoplasma envolvendo os restos ovulares.

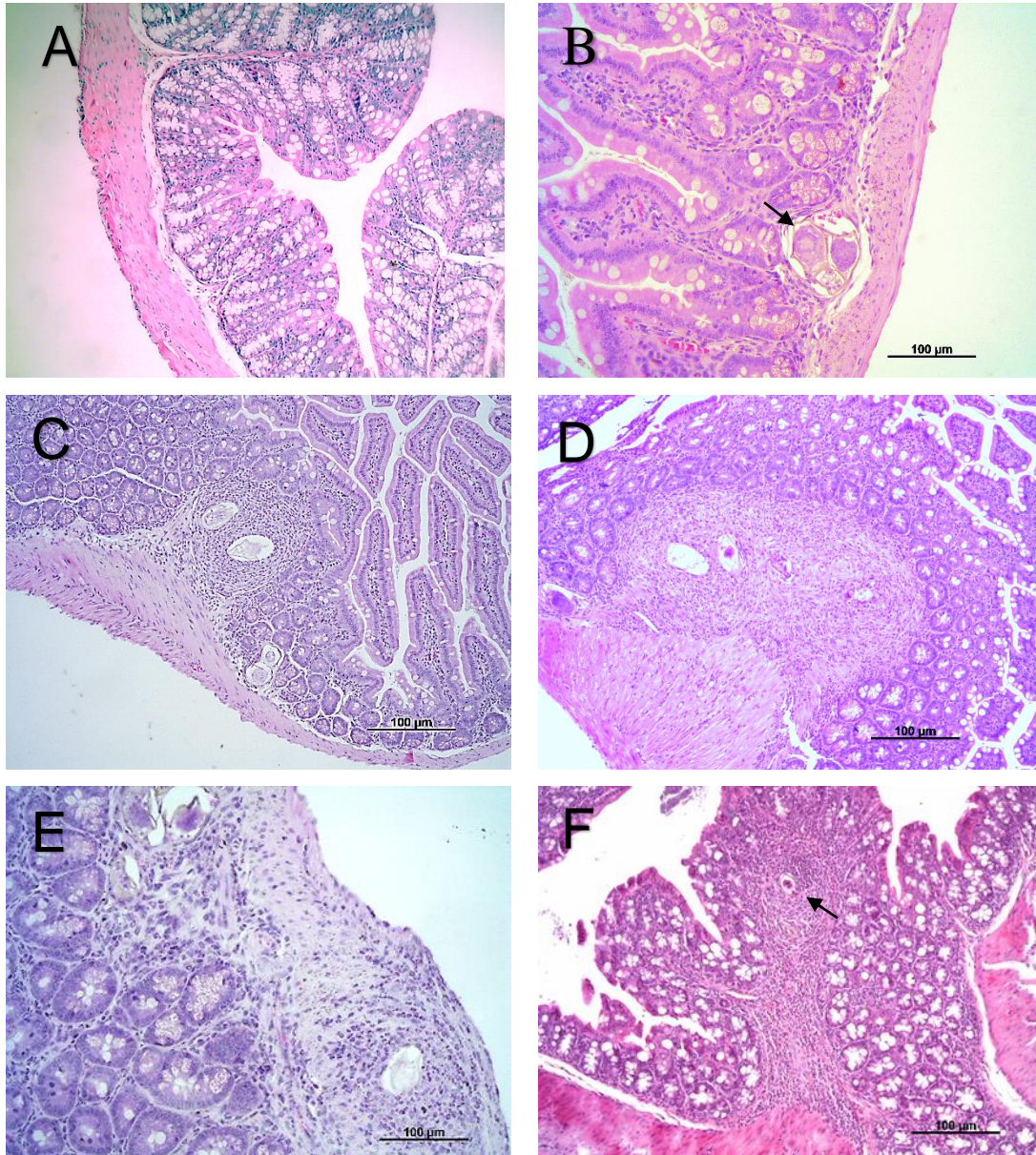
No grupo infectado e tratado com Praziquantel + Doxiciclina (IG-PD) (FIGURA 10E) observa-se que os granulomas apresentam um diâmetro maior, do tipo necrótico-exsudativo. Houve uma frequente presença de intensa infiltração inflamatória aguda, não apenas nos espaços-porta, mas também no parênquima hepático como também formando um aglomerado central. Essa infiltração foi caracterizada pela presença de polimorfonucleares neutrófilos e numerosos eosinófilos. Observa-se ainda um acúmulo de eosinófilos ao redor de restos de miracídio em desintegração, ainda caracterizando a fase necrótico-exsudativa (Amaral *et al.*, 2017; Lenzi *et al.*, 2008).

Nos camundongos do grupo infectado e tratado com Praziquantel + Gentamicina (IG-PG) (FIGURA 10F), observou-se que os granulomas eram de dimensões reduzidas, apresentando maior quantidade de células gigantes ao redor dos ovos, demonstrando o processo de digestão dos restos parasitários. A presença destes granulomas com áreas menores e com os eosinófilos mais acumulados nas regiões periféricas do granuloma são características mais próximas da fase exsudativa-produtiva.



Os granulomas periovulares no intestino ocorreram como estruturas pequenas e bem definidas (FIGURA 11). Eles eram claramente distintos das respostas observadas no fígado, onde os granulomas apresentavam graus de componente exsudativo ou necrótico-exsudativo, o que demonstra a evolução da modulação. Essas diferenças não estão relacionadas apenas ao tipo predominante de reação granulomatosa, mas também ao tamanho dos granulomas periovulares, que é maior no fígado, conforme observam Silva *et al.* (2000). Estes autores salientam que a modulação é um fenômeno particularmente característico hepático, uma vez que os granulomas pulmonares e intestinais, formados em torno de ovos maduros, não apresentaram alterações em seu tamanho e aparência ao longo do tempo. Estas descobertas confirmam e ampliam dados que sugerem que a chamada “modulação imunológica” da doença granulomatosa periovular esquistossômica é um fenômeno morfológico peculiar ao fígado, tendo em vista que as fibras de elastina foram encontradas apenas em granulomas hepáticos e exclusivamente durante a fase crônica da doença, onde ocorre a fibrose do espaço portal. A configuração única de modulação dos granulomas periovulares no fígado pode ser explicada pela presença coordenada de elementos celulares específicos, tais como hepatócitos, células estreladas hepáticas (células perissinusoidais) e células de Kupffer, reconhecidos por desempenhar um papel crucial na formação e degradação da matriz extracelular (Silva *et al.*, 2000).

Figura 11 - Fotomicrografias de intestino de camundongos infectados com *Schistosoma mansoni* e necropsiados com 8 semanas após a infecção



Fonte: Da autora (2024)

Legenda: Fotomicrografias de intestino de camundongos corados com Hematoxilina/Eosina em aumento de 10x. **(A)** Aspecto histológico normal do intestino de camundongos do grupo controle não infectado (CG) Obj 10x, **(B)** Ovo de *S. mansoni* observado na mucosa intestinal, provocando uma injúria física entre as camadas mucosa e submucosa Obj 20x **(C)** Aspecto histológico de camundongo do grupo infectado do grupo IG destacando ovos viáveis e maduros de *Schistosoma mansoni* Obj 10x **(D)** Aspecto histológico de camundongo do grupo infectado tratado com Praziquantel do grupo IG-P apresentando ovos de *S. mansoni* já em processo de desintegração Obj 10x **(E)** Aspecto histológico de camundongo do grupo infectado tratado com Praziquantel e Doxíciclina do grupo IG-PD, nota-se um infiltrado de células inflamatórias aglomerados ao redor do ovo de *S. mansoni* Obj 10x **(F)** Aspecto histológico de camundongo do grupo infectado tratado com Praziquantel e

Gentamicina do grupo IG-PG, evidenciando o processo inflamatório exercendo o papel de favorecer a rota de excreção do ovo de *S. mansoni* rumo ao lúmen intestinal Obj 5x.

Na análise histopatológica do intestino foram visualizados granulomas esquistossomóticos e ovos do parasito nas criptas intestinais, lâmina própria e submucosa do intestino dos grupos infectados e uma extensa resposta inflamatória.

Na Figura 11A observa-se o aspecto histológico normal do intestino de camundongos do grupo controle não infectado (CG). Na Figura 11B, é possível identificar a presença de um ovo de *S. mansoni* entre as camadas submucosa e mucosa, resultando em danos físicos.

Ovos viáveis e maduros de *S. mansoni* são observados na camada mucosa de camundongo do grupo infectado (IG), destacando o extenso infiltrado inflamatório ao seu redor (FIGURA 11C). Na Figura 11D já é possível observar o processo de desintegração dos ovos ocorrendo no grupo infectado tratado com Praziquantel (IG-P).

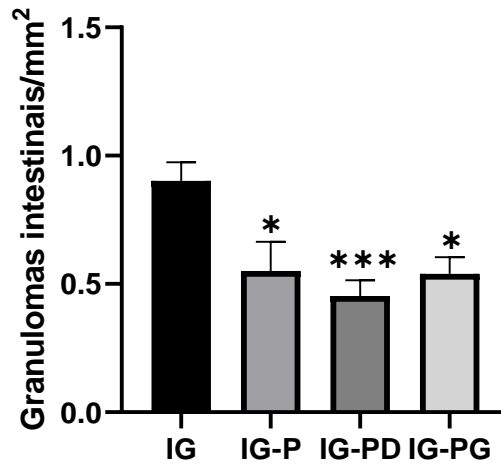
Na fotomicrografia de um animal do grupo infectado tratado com Praziquantel e Doxiciclina do grupo IG-PD (FIGURA 11E), observa-se uma concentração de células inflamatórias agrupadas ao redor do ovo de *S. mansoni*. Na Figura 11F é interessante observar o processo inflamatório exercendo o papel de favorecer a rota de excreção do ovo de *S. mansoni* rumo ao lúmen intestinal em um camundongo do grupo infectado tratado com Praziquantel e Gentamicina (IG-PG).

Em relação à excreção dos ovos pelas fezes, os produtos secretados pelos eosinófilos, ou pelos eosinófilos em conjunto com os monócitos-macrófagos, desempenham um papel crucial na corrosão da membrana basal. Essa ação resulta na destruição ou descamação das células epiteliais sobrepostas, provocando a abertura de canais ou túneis que servem como passagens para os ovos em direção ao lúmen intestinal (Lenzi *et al.*, 2008).

Na Figura 11F nota-se, de fato, um ovo de *Schistosoma mansoni* em rota de excreção pelas fezes. O ovo está envolto por uma reação pré-granulomatosa exsudativa, caracterizada pela formação de ondas celulares compostas por monócitos/macrófagos e eosinófilos, conforme observam Lenzi *et al.* (2008). Essas ondas celulares estão direcionadas para o lúmen intestinal, onde atuarão perfurando o epitélio intestinal e criando túneis que possibilitam a eliminação dos ovos por meio dos movimentos peristálticos.

Os resultados do número de granulomas/mm<sup>2</sup> no intestino de camundongos infectados com *S. mansoni* e os grupos infectados e tratados com Praziquantel e as associações com os antibióticos são observados no gráfico 1:

Gráfico 1 – Número de granulomas/mm<sup>2</sup> no intestino de camundongos infectados com *S. mansoni*

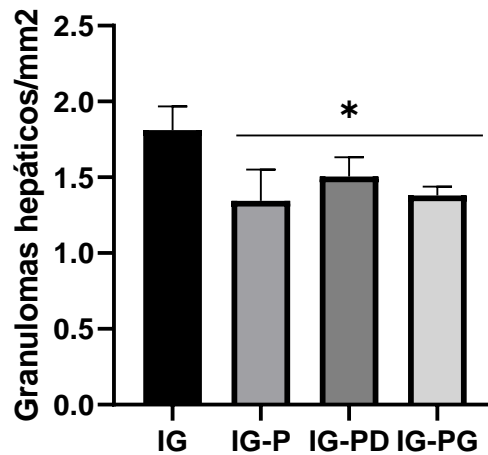


Fonte: Da autora (2024)

Legenda: IG – Animais infectados com *S. mansoni*; IG-P - Animais infectados com *S. mansoni* e tratados com Praziquantel; IG-PD - Animais infectados com *S. mansoni* e tratados com Praziquantel + Doxiciclina; IG-PG - Animais infectados com *S. mansoni* e tratados com Praziquantel + Gentamicina. (\* $p < 0,05$ ; \*\*\* $p < 0,001$ )

No gráfico 2 são apresentados os resultados relativos ao número de granulomas/mm<sup>2</sup> no fígado de camundongos infectados com *S. mansoni* e os grupos infectados e tratados com Praziquantel e as associações com os antibióticos:

Gráfico 2 – Número de granulomas/mm<sup>2</sup> no fígado de camundongos infectados com *S. mansoni*

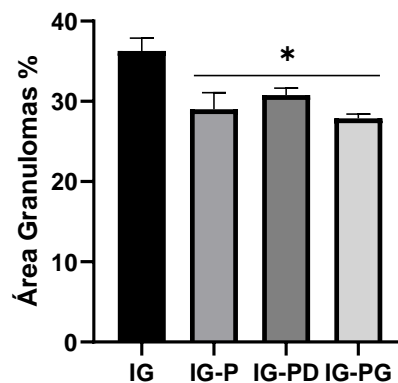


Fonte: Da autora (2024)

Legenda: IG – Animais infectados com *S. mansoni*; IG-P - Animais infectados com *S. mansoni* e tratados com Praziquantel; IG-PD - Animais infectados com *S. mansoni* e tratados com Praziquantel + Doxiciclina; IG-PG - Animais infectados com *S. mansoni* e tratados com Praziquantel + Gentamicina. (\*p<0,05)

Os resultados da área percentual dos granulomas no fígado de camundongos infectados com *S. mansoni* e os grupos infectados e tratados com Praziquantel e as associações com os antibióticos são apresentados no gráfico 3:

Gráfico 3 – Área percentual dos granulomas no fígado de camundongos infectados com *S. mansoni*



Fonte: Da autora (2024)

Legenda: IG – Animais infectados com *S. mansoni*; IG-P - Animais infectados com *S. mansoni* e tratados com Praziquantel; IG-PD - Animais

infectados com *S. mansoni* e tratados com Praziquantel + Doxiciclina;  
IG-PG -Animais infectados com *S. mansoni* e tratados com  
Praziquantel + Gentamicina. (\* $p < 0,05$ )

Avaliando-se a quantidade de granulomas intestinais e hepáticos e a dimensão afetada do fígado (área dos granulomas) nos diferentes grupos experimentais, observou-se que os tratamentos com Praziquantel e as associações (Praziquantel + Doxiciclina e Praziquantel + Gentamicina) diminuíram o número de granulomas no intestino e fígado, como também a área destes. No intestino ocorreu a maior redução significativa ( $p < 0,001$ ) com a associação Praziquantel + Doxiciclina (IG-PD).

A coloração Picrosirius Red é uma técnica histológica comumente utilizada para avaliar colágeno em amostras histológicas. Essa coloração destaca as fibras de colágeno, permitindo uma melhor visualização e análise das suas características, como a quantidade e a qualidade das fibras de colágeno presentes no granuloma. No contexto de granulomas esquistossomóticos, a coloração Picrosirius Red pode ser aplicada para avaliar a resposta fibrosa associada à infecção pelo *S. mansoni*, sendo especialmente útil para distinguir diferentes tipos de colágeno. Sob a luz polarizada, as fibras de colágeno são destacadas em cores diferentes, permitindo uma melhor identificação das características morfológicas e da organização do colágeno presente no granuloma esquistossomótico. A cor resultante da polarização, distinguem-se entre os tipos de colágeno (colágeno I: apresenta cor amarela, laranja ou vermelha e colágeno III: apresenta a cor verde) (Junqueira *et al.*, 1978).

Foi realizada a coloração Picrosirius Red em lâminas dos diferentes grupos infectados por *S. mansoni* (FIGURA 12) e os resultados são apresentados a seguir:

Figura 12 - Fotomicrografias de fígado de camundongos infectados com *Schistosoma mansoni* na fase aguda da infecção (8 semanas após a infecção) corados com Picrosirius Red

(Continua)

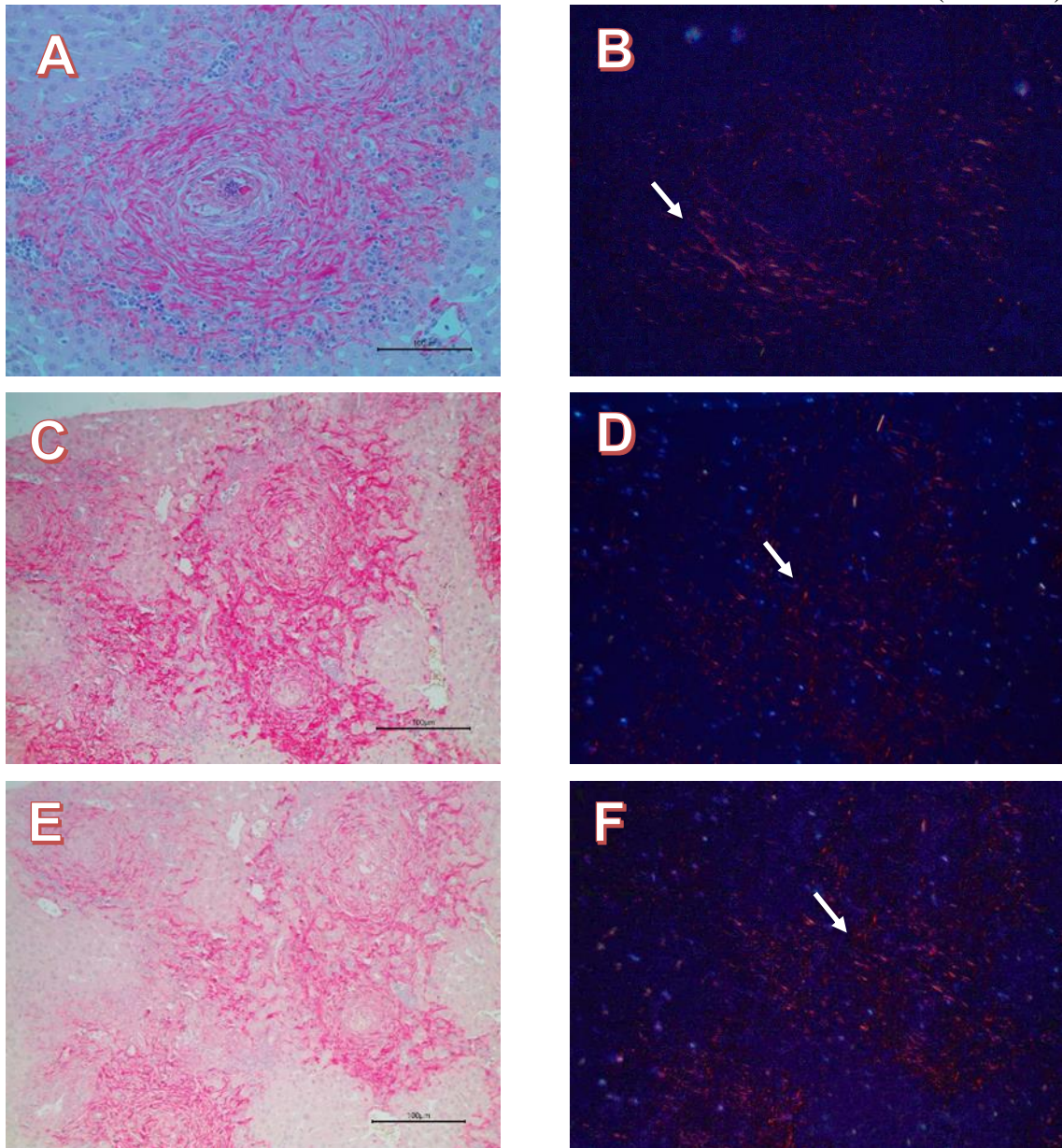
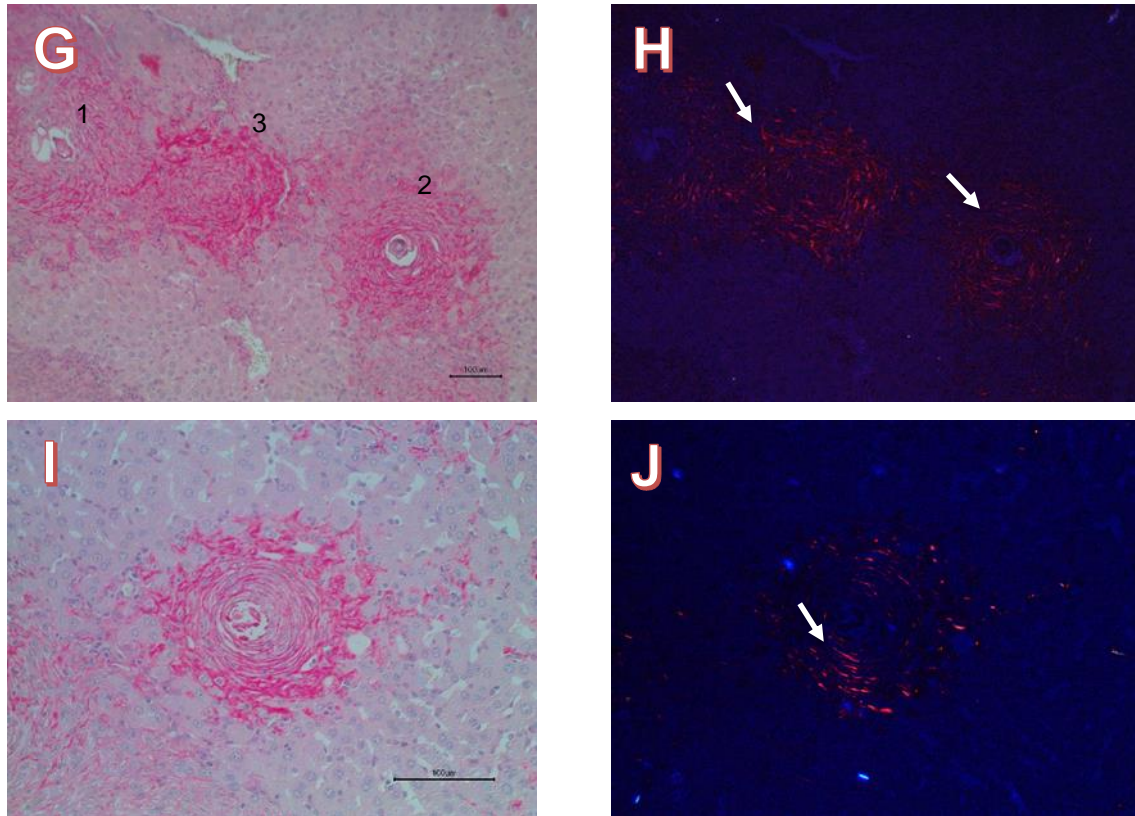


Figura 12 - Fotomicrografias de fígado de camundongos infectados com *Schistosoma mansoni* na fase aguda da infecção (8 semanas após a infecção) corados com Picrosirius Red

(Conclusão)



Fonte: Da autora (2024)

Legenda: Fotomicrografias de fígado de camundongos corados com Picrosirius Red - aumento 20x exceto em G e H (aumento 10x). As imagens B, D, F, H e J foram feitas em microscopia de polarização. (→) Setas brancas indicam a presença de colágeno tipo I (coloração avermelhada). (A) e (B) Grupo Infectado (IG) granuloma periovular com extenso infiltrado de células inflamatórias evidenciando os fibroblastos que se orientam igualmente em camadas concêntricas (C) e (D) Grupo Infectado e tratado com Praziquantel, evidenciando granuloma exsudativo-productivo (IG-P) (E) e (F) Grupo infectado e tratado com Praziquantel e Doxiciclina, evidenciando a presença de colágeno de forma difusa (IG-PD); (G) e (H) Grupo infectado e tratado com Praziquantel e Gentamicina aumento de 10x; apresenta 3 granulomas em estágios diferentes: 1 (Granuloma necrótico-exsudativo); 2 (Granuloma exsudativo productivo) e 3 (Granuloma productivo em fase inicial) (I) e (J) Grupo infectado e tratado com Praziquantel e Gentamicina aumento de 20x, evidenciando um granuloma exsudativo productivo com os fibroblastos se organizando em camadas concêntricas ao redor de restos de ovos em processo de digestão.

Nas Figuras 12A e 12B do grupo Infectado (IG) nota-se um granuloma periovular com extenso infiltrado de células inflamatórias, evidenciando as fibras de



colágeno que ainda estão frouxamente se organizando em uma disposição concêntrica.

A presença de granuloma exsudativo-produtivo é notado no grupo Infectado e tratado com Praziquantel (IG-P) (FIGURAS 12C e 12D), evidenciando pontos de colágeno dispersos ao redor do granuloma.

Nas Figuras 12E e 12F do grupo infectado e tratado com Praziquantel e Doxiciclina (IG-PD); observa-se granulomas com a presença de colágeno de forma difusa espalhado pelo parênquima hepático ao redor das lesões geradas pelos granulomas.

As Figuras 12G e 12H do grupo infectado e tratado com Praziquantel e Gentamicina (IG-PG) com aumento de 10x; apresenta 3 granulomas em estágios diferentes, sendo em 1 (Granuloma necrótico-exsudativo); em 2 (Granuloma exsudativo produtivo) e em 3 (Granuloma produtivo em fase inicial).

De fato, à medida que a doença progride para a fase crônica, devido à imunomodulação, observa-se uma tendência dos granulomas diminuírem em tamanho e adquirirem características mais fibróticas. Desta forma, observa-se no fígado de camundongos infectados neste estudo, uma prevalência de granulomas na fase Exsudativa e Exsudativa Produtiva, por se tratar da fase aguda da doença. Mas já é possível observar alguns granulomas caminhando para a fase Produtiva, destacadas pela presença de fibras colágenas e uma diminuição no número de células ao redor dos ovos, principalmente no grupo tratado com Praziquantel e Gentamicina (IG-PG) (FIGURA 12G). Contudo, identifica-se igualmente em todos os grupos experimentais a presença de granulomas recém-formados, representados pelos tipos Exsudativo Produtivo e Necrótico Exsudativo, indicando que novos ovos continuam a se depositar no fígado durante o curso da infecção.

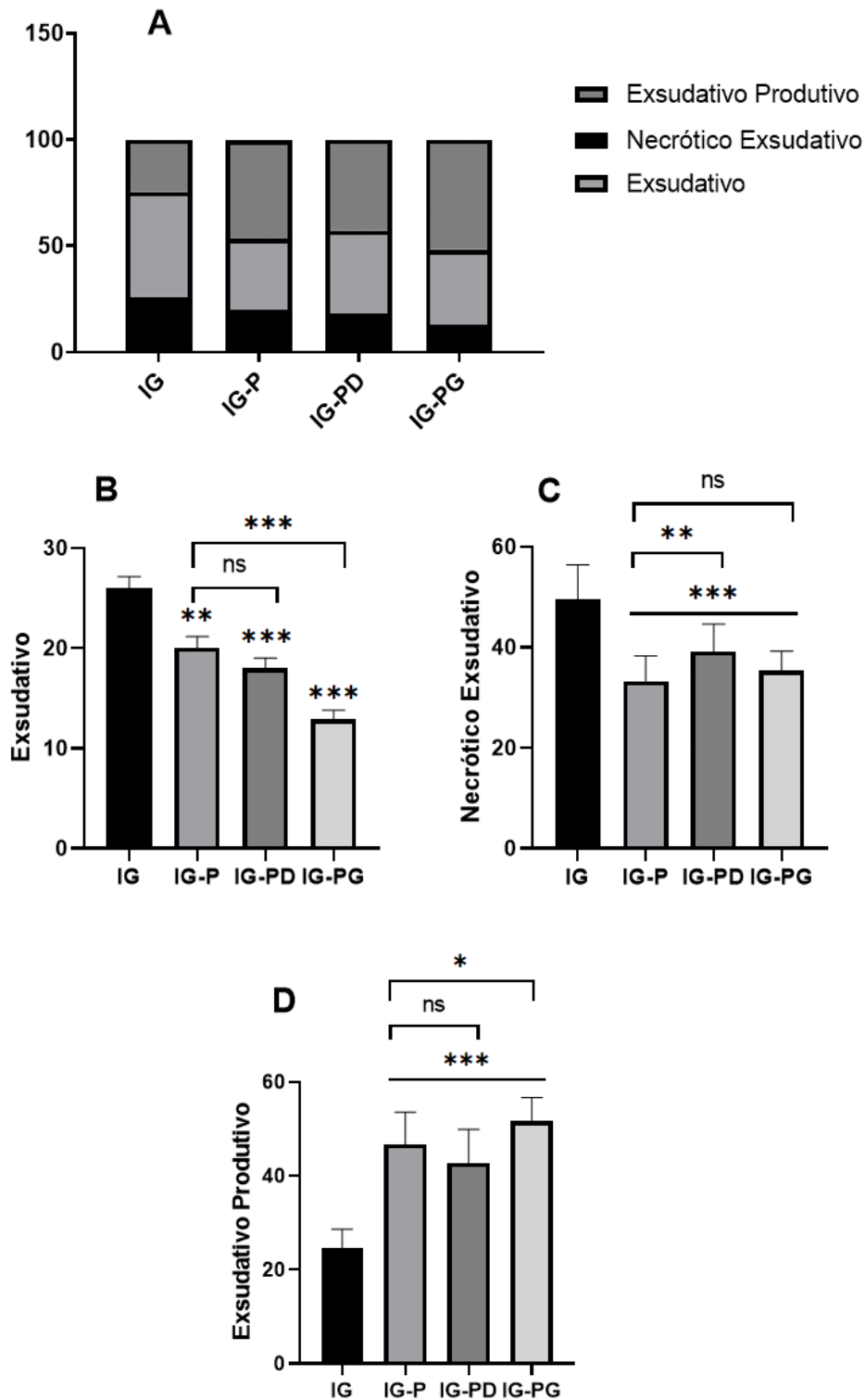
Nas Figuras 12I e 12J do grupo infectado e tratado com Praziquantel e Gentamicina (IG-PG) com aumento de 20x, evidencia um granuloma exsudativo produtivo com os fibroblastos se organizando em camadas concêntricas ao redor de restos de ovos em processo de digestão.

A remodelação morfofuncional hepática foi observada mais desordenada e a colagenização se apresentou de forma bastante difusa no grupo tratado com Praziquantel e Doxiciclina (IG-PD) (Fig 12E e 12F). Neste grupo, a intensa infiltração inflamatória foi acompanhada por acentuada degeneração parenquimatosa e danos

aos hepatócitos, o que foi comprovado pelos níveis circulantes elevados de ALT (FIGURA 14).

Observando-se os tipos de granulomas nos tecidos hepáticos, nota-se que os grupos com os tratamentos (IG-P, IG-PD e IG-PG) apresentam uma diminuição do número de granulomas do tipo exsudativo e um aumento de granulomas Exsudativo-productivos, conforme demonstrado na Figura 13.

Figura 13 - Fases da formação do granuloma durante o desenvolvimento da esquistossomose na fase aguda no fígado (%)



Fonte: Da autora (2024)

Legenda: IG – Animais infectados com *S. mansoni*; IG-P - Animais infectados com *S. mansoni* e tratados com Praziquantel; IG-PD - Animais infectados com *S. mansoni* e tratados com Praziquantel + Doxíciclina; IG-PG - Animais infectados com *S. mansoni* e tratados com Praziquantel + Gentamicina. (\* $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ )

No período estudado que consistiu na fase aguda da esquistossomose mansônica, os grupos tratados com Praziquantel demonstraram alterações na distribuição percentual das fases evolutivas das lesões granulomatosas, indicando que o tratamento com Praziquantel é efetivo na diminuição da formação de novos granulomas e a infecção caminha para a evolução da imunomodulação da doença. Este fato traz benefícios ao hospedeiro, tornando a doença menos grave (Amaral *et al.*, 2017; Llanwarne; Helmbly, 2021). Dentre os grupos tratados com Praziquantel e suas associações, o grupo tratado com Praziquantel e Gentamicina (IG-PG) apresentou a maior alteração na diminuição de granulomas do tipo exsudativo ( $p < 0,001$ ) como também uma maior expressão percentual de granulomas na fase exsudativa produtiva ( $p < 0,05$ ) quando comparado com o grupo tratado apenas com o Praziquantel (IG-P).

A Doxiciclina é uma tetraciclina sintética aprovada em 1967. Foi demonstrado que esse antibiótico de amplo espectro também possui propriedades anti-inflamatórias úteis que o tornam adequado para o tratamento de várias condições não infecciosas. Outros modelos *in vitro* demonstraram que a Doxiciclina foi capaz de inibir a proteína quinase C, importante na formação de granulomas. (Duarte *et al.*, 2009). Também se observou a inibição da fosfolipase A2, molécula com papel-chave em processos inflamatórios, mediante a liberação de ácido araquidônico e a produção de eicosanóides. Além disso, foi capaz de diminuir os níveis de imunoglobulina E (IgE) em pacientes asmáticos (Navarro-Trivino, 2020; Sapadin; Fleischmajer, 2006; Li *et al.*, 2022).

Apesar deste possível efeito anti-inflamatório, em um estudo de DIAS *et al.* (2019) foi observado um agravamento da inflamação granulomatosa e no remodelamento morfofuncional hepático patológico. Em outra pesquisa, a Doxiciclina estimulou a deposição de colágeno e modificou a organização dos granulomas hepáticos e pulmonares (Santos *et al.*, 2021), processo potencialmente relacionado à atenuação nos mecanismos de colagenólise em resposta à inibição das metaloproteinases de matriz MMP-2 e MMP-9. Processos semelhantes a estes trabalhos foi observado no presente estudo, onde nota-se um processo inflamatório mais intenso ao redor dos ovos no grupo tratado como Praziquantel associado ao antibiótico Doxiciclina (IG-PD). Também é possível notar que a Doxiciclina interfere na organização das fibras de colágeno, retardando o processo da modulação dos granulomas.

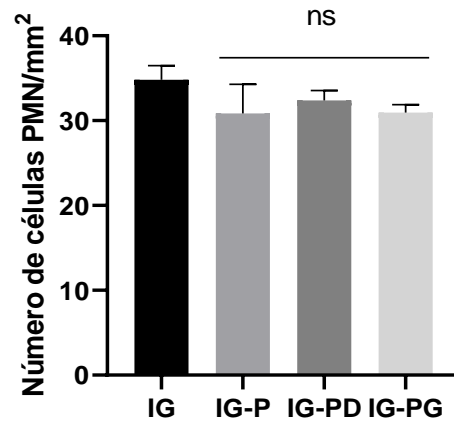
Em um trabalho que investigou o efeito anti-inflamatório da Gentamicina em um modelo de sepse neonatal induzida por Lipopolissacarídeos (LPS), as concentrações de citocinas inflamatórias foram medidas no fluido peritoneal usando ELISA. Neste estudo foi observado que as concentrações de TNF- $\alpha$ , IL-2 e IL-1 $\beta$  diminuíram no grupo LPS + GNT em comparação com o grupo controle LPS, enquanto as concentrações de IL-10 aumentaram no grupo LPS + GNT, indicando o efeito anti-inflamatório de Gentamicina na sepse neonatal. Estes autores também relataram que, no grupo GNT + LPS, as alterações histopatológicas dos pulmões, fígado, rins e intestinos foram aliviadas em comparação com aquelas no grupo LPS. Estes autores concluíram que a Gentamicina é um medicamento eficaz com propriedades anti-inflamatórias e bactericidas para o tratamento da sepse neonatal, capaz de mitigar a resposta inflamatória e melhorar o resultado de sobrevivência e atenuar as lesões teciduais, aumentando a quantidade e a função de Tregs CD4+ CD25+ por meio da ativação da via de sinalização do transdutor de sinal e ativador da transcrição 5 (p-STAT5) em Tregs in vivo e in vitro (Li *et al.*, 2022).

De maneira semelhante, vários estudos recentes também mostraram que os antibióticos podem regular a proliferação e diferenciação de Tregs, que modulam as citocinas inflamatórias (Han; Yan; King, 2021; Zhang *et al.*, 2021a; Zhang *et al.*, 2021b; Cortés-Hernández *et al.*, 2021) e estas descobertas podem justificar os resultados encontrados na presente pesquisa com o uso associado de Praziquantel + Gentamicina (IG-PG).

Os granulomas de *Schistosoma* podem ser definidos como um conjunto compacto de células inflamatórias e residentes formando uma estrutura bem definida ao redor dos ovos do parasita. Células T e B, bem como seus subconjuntos; neutrófilos; eosinófilos; basófilos; mastócitos; macrófagos residentes (células de Kupffer); macrófagos inflamatórios e diferenciados (células epitelioides e gigantes); células estreladas hepáticas; e fibroblastos compõem uma comunidade celular intrincada dentro do granuloma esquistossomótico (Malta *et al.*, 2022).

Analisando-se o infiltrado de leucócitos polimorfonucleares e mononucleares decorrentes do processo inflamatório em torno dos granulomas hepáticos, os resultados são apresentados nos GRÁFICOS 4 e 5.

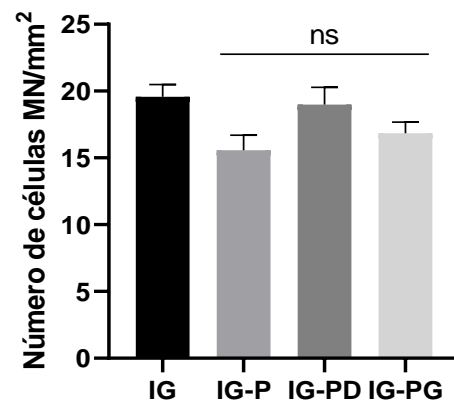
Gráfico 4 – Contagem de leucócitos polimorfonucleares/mm<sup>2</sup> no fígado de camundongos infectados



Fonte: Da autora (2024)

Legenda: IG – Animais infectados com *S. mansoni*; IG-P - Animais infectados com *S. mansoni* e tratados com Praziquantel; IG-PD - Animais infectados com *S. mansoni* e tratados com Praziquantel + Doxiciclina; IG-PG -Animais infectados com *S. mansoni* e tratados com Praziquantel + Gentamicina.

Gráfico 5 – Contagem de leucócitos mononucleares/mm<sup>2</sup> no fígado de camundongos infectados



Fonte: Da autora (2024)

Legenda: IG – Animais infectados com *S. mansoni*; IG-P - Animais infectados com *S. mansoni* e tratados com Praziquantel; IG-PD - Animais infectados com *S. mansoni* e tratados com Praziquantel + Doxiciclina; IG-PG -Animais infectados com *S. mansoni* e tratados com Praziquantel + Gentamicina.

Com relação ao número de células do processo inflamatório, não houve influência significativa dos tratamentos sobre a quantidade de leucócitos polimorfonucleares (neutrófilos e eosinófilos) e de mononucleares (monócitos e linfócitos) ( $p > 0,05$ ). É conhecido que o infiltrado peritoneal após a infecção e no decorrer desta, varia em relação ao seu conteúdo de células mono ou polimorfonucleares. Deve-se levar em conta que o granuloma ocorre de formas distintas nas fases aguda e crônica da doença. No início, são volumosos, com grande número de macrófagos, linfócitos, eosinófilos e alguns plasmócitos – sinais da reação imunológica, em torno do ovo - a reação granulomatosa é exacerbada e atinge dimensão considerável, apresentando volume 100 vezes o do ovo. Na fase crônica, o exsudato diminui e é substituído por tecido conjuntivo até se transformar em um nódulo fibrótico, estes granulomas atingem dimensões bem menores (McManus *et al.*, 2018).

Conforme observam Chiaramonte *et al.* (2001) a infecção é dinâmica, os ovos continuam sendo depositados e formarão novos granulomas, porém estes apresentarão tamanhos reduzidos e menor número de células ao seu redor, ao contrário dos da primeira oviposição, estes novos granulomas tendem a diminuir de tamanho e tornar-se mais fibróticos. Esse fenômeno é conhecido como imunomodulação. Os granulomas intestinais não sofrem imunomodulação pronunciada como a observada nos granulomas hepáticos (Amaral *et al.*, 2017).

Desta forma, a influência dos tratamentos com Praziquantel e suas associações à Doxiciclina e Gentamicina utilizados neste estudo podem ocorrer sobre o processo inflamatório já instalado como também prevenindo a inflamação ao previamente diminuir a carga parasitária ou ainda atuando na resposta inflamatória de novos granulomas que estão continuamente sendo formados ao redor de novos ovos depositados.

Com a mesma perspectiva, em um estudo usando antibióticos de amplo espectro e antimicóticos administrados por via oral, foram analisados camundongos infectados com *S. mansoni* que foram simultaneamente depletados de bactérias intestinais. Após a depleção, houve significativamente menos inflamação no intestino, que foi acompanhada por diminuição do desenvolvimento de granuloma intestinal. Ao contrário, a patologia hepática permaneceu inalterada. Além disso, as respostas imunes específicas da formação dos granulomas foram distorcidas e a excreção fecal de ovos diminuída (Holzscheiter *et al.*, 2014). Assim, estes autores demonstram que

a microbiota do hospedeiro pode atuar como um terceiro parceiro na modulação de respostas imunes específicas contra helmintos, apontando para uma importante contribuição das bactérias intestinais na modulação das respostas imunes específicas da esquistossomose, seja no desenvolvimento de granulomas como na excreção de ovos.

Já é conhecido que existe uma relação recíproca entre microbiota e organismo humano: os microrganismos residentes do corpo têm um papel significativo na regulação da fisiologia de seus hospedeiros e na prevenção de infecções patogênicas, enquanto o sistema imune dos hospedeiros é importante na determinação da composição da microbiota (Lei; Nair; Alegre, 2015). O equilíbrio da microbiota representa um desafio em especial para o intestino, pois cerca de 70% das células imunes de cada indivíduo se encontram nesse nicho. Desta forma, a microbiota intestinal, além do já reconhecido estado nutricional, desempenha um papel fundamental na maturação, desenvolvimento e regulação do sistema imunológico (Palm; de Zoete; Flavell, 2015). Os antibióticos podem afetar a comunidade microbiana comensal e não patogênica e favorecer a colonização de microrganismos oportunistas, ou interferir na colonização por estes, sendo relatado que os antibióticos de amplo espectro reduzem a diversidade bacteriana (Modi *et al.*, 2014; Bezirtzoglou *et al.*, 2008; Konstantinidis *et al.*, 2020).

Em um outro estudo *in vivo* usando como modelo a infecção por *Toxoplasma gondii*, foi observada que esta infecção causa um colapso da fisiologia intestinal e das funções de barreira, seguido pelo acúmulo de bactérias Gram-negativas no íleo, identificadas como *Escherichia coli* e *Bacteroides/Prevotella* spp. Constatou-se translocação bacteriana e agravamento da inflamação mediado por bactérias via citocina do tipo Th1 e/ou mediadores pró-inflamatórios. Neste estudo, após a administração profilática ou terapêutica de Ciprofloxacina e/ou Metronidazol, notou-se melhoras na imunopatologia ileal e redução dos níveis intestinais de NO e IFN- $\gamma$  (Heimesaat *et al.*, 2006).

Neste estudo foram escolhidos os antibióticos Gentamicina (Aminoglicosídeo, atua frente as bactérias Gram-negativas) e Doxiciclina (Tetraciclina, amplo espectro). Em suma, em relação às análises histopatológicas, observa-se que a associação da Doxiciclina ao Praziquantel não apresentou efeito benéfico ao hospedeiro, visto que as reações inflamatórias granulomatosas hepáticas foram mais intensas, provocando um dano tecidual maior. Este antibacteriano também foi capaz de agravar a formação

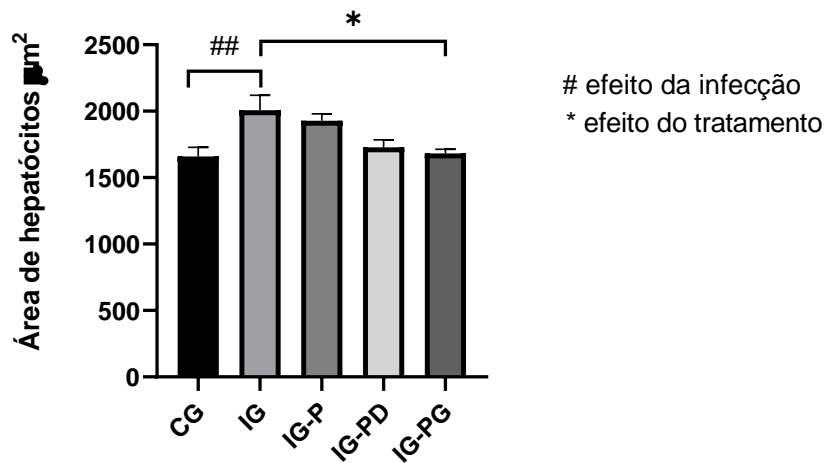


de granulomas pulmonares no contexto da esquistossomose mansônica (Santos *et al.*, 2021), embora ele tenha sido previamente reportado como um agente anti-*S. mansoni in vitro* (Dias *et al.*, 2019). Estes autores também relataram que o tratamento com a Doxiciclina aumentou a inflamação granulomatosa hepática e a colagenogênese em camundongos infectados por *S. mansoni*.

Por outro lado, a associação da Gentamicina ao Praziquantel, mostrou uma resposta histopatológica diferente, onde os granulomas hepáticos observados apresentaram diâmetros menores e com características mais próximas da fase exsudativa-produtiva, indicando acelerar o processo de modulação do granuloma. A mudança do perfil Th1 para Th2 exerce um papel importante no desenvolvimento da esquistossomose e está fortemente ligada à citocina IL-10 (Chayé *et al.*, 2023; Gomides *et al.*, 2024), resultando na imunomodulação dos granulomas. Os resultados de Li *et al.* (2022) são interessantes para a análise do resultado que foi encontrado em relação à associação de Gentamicina ao Praziquantel, pois estes autores encontraram em sua pesquisa que a Gentamicina foi eficiente em diminuir as concentrações de TNF- $\alpha$ , IL-2 e IL-1 $\beta$  em um modelo de sepse neonatal induzida por Lipopolissacarídeos (LPS) como também foi capaz de aumentar as concentrações de IL-10. Portanto, em relação às análises histopatológicas, foram observadas alterações nas respostas imunomodulatórias dos granulomas e estes resultados relacionados à associação do Praziquantel aos antibióticos Doxiciclina e Gentamicina exigem novos estudos para esclarecer seus efeitos na esquistossomose.

Com relação aos parâmetros histomorfométricos analisados, a área de hepatócitos é avaliada no Gráfico 6:

Gráfico 6 – Área de hepatócitos



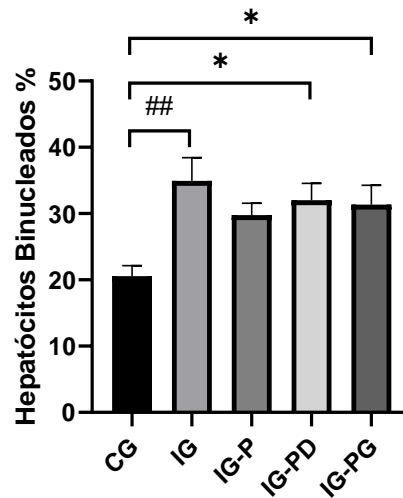
Fonte: Da autora (2024)

Legenda: CG – Animais do grupo controle não infectados; IG – Animais infectados com *S. mansoni*; IG-P - Animais infectados com *S. mansoni* e tratados com Praziquantel; IG-PD - Animais infectados com *S. mansoni* e tratados com Praziquantel + Doxiciclina; IG-PG -Animais infectados com *S. mansoni* e tratados com Praziquantel + Gentamicina. (##  $p < 0,01$ , \*\* $p < 0,01$ )

A infecção por *S. mansoni* levou a um aumento significativo da área dos hepatócitos ( $p < 0,01$ ), comparando-se entre os grupos Controle não infectado (CG) e Grupo infectado (IG), como um efeito da própria infecção no tecido hepático. Também observa-se diferença significativa entre os grupos tratados com Praziquantel associado ao antibiótico Gentamicina (IG-PG) comparado ao Grupo infectado (IG), como efeito do tratamento ( $p < 0,05$ ). Estes resultados são justificados pelo aumento do fígado causado pelos intensos danos gerados pelos granulomas neste órgão. No entanto, este resultado indica que o uso do Praziquantel associado ao antibiótico Gentamicina foi capaz de reduzir a área de hepatócitos para níveis semelhantes aos do Grupo controle não infectado (CG).

No Gráfico 7, analisando o Percentual de Hepatócitos Binucleados, houve diferença significativa entre o grupo Controle não infectado (CG) e o Grupo Infectado (IG) ( $p < 0,01$ ) como também com os Grupos Infectados Tratados com Praziquantel e suas associações (IG-PD e IG-PG) ( $p < 0,05$ ).

Gráfico 7 - Percentual de Hepatócitos Binucleados



Fonte: Da autora (2024)

Legenda: CG – Animais do grupo controle não infectados; IG – Animais infectados com *S. mansoni*; IG-P - Animais infectados com *S. mansoni* e tratados com Praziquantel; IG-PD - Animais infectados com *S. mansoni* e tratados com Praziquantel + Doxiciclina; IG-PG -Animais infectados com *S. mansoni* e tratados com Praziquantel + Gentamicina. (##  $p < 0,01$ , \* $p < 0,05$ )

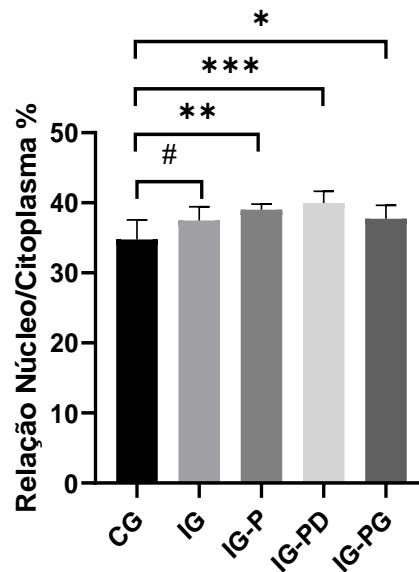
Os hepatócitos, células fundamentais no funcionamento do fígado, desempenham papéis cruciais na manutenção da homeostase, na capacidade de regeneração e na resposta a lesões. Embora a maioria das células somáticas de mamíferos seja diplóide, contendo pares de cromossomos, existem também células poliplóides que possuem conjuntos adicionais de cromossomos. No caso dos hepatócitos, que representam uma das células poliplóides mais estudadas, mais de 25% e 90% da população de hepatócitos em humanos e camundongos, respectivamente, exibem poliploidia (Wilkinson; Duncan, 2019).

Recentes descobertas revelaram mecanismos celulares e moleculares que regulam a poliploidia hepática. Além disso, evidências dos últimos anos indicam que hepatócitos diplóides e poliplóides desempenham funções especializadas. Os hepatócitos diplóides têm a capacidade de acelerar a regeneração hepática e promover a recuperação compensatória após lesões agudas. Essas complexas interações celulares destacam a importância dos diferentes subtipos de hepatócitos na resposta adaptativa do fígado a diversos desafios fisiológicos (Wilkinson *et al.*, 2021). Nesse sentido, a ocorrência de um aumento de hepatócitos binucleados indica a adaptação e a regeneração dos tecidos hepáticos, demonstrando que eles são

necessários para facilitar a adaptação às lesões causadas por doenças hepáticas crônicas (Duncan, 2013).

No gráfico 8 analisa-se a Relação Núcleo/Citoplasma entre os grupos experimentais:

Gráfico 8 - Relação Núcleo/Citoplasma



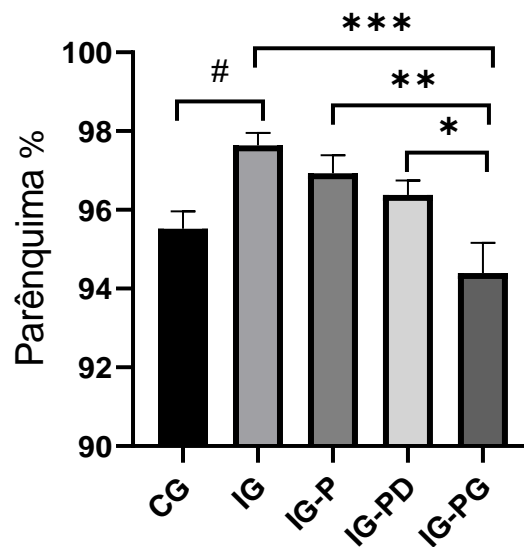
Fonte: Da autora (2024)

Legenda: CG – Animais do grupo controle não infectados; IG – Animais infectados com *S. mansoni*; IG-P - Animais infectados com *S. mansoni* e tratados com Praziquantel; IG-PD - Animais infectados com *S. mansoni* e tratados com Praziquantel + Doxiciclina; IG-PG - Animais infectados com *S. mansoni* e tratados com Praziquantel + Gentamicina. (#  $p < 0,05$ ; ##  $p < 0,01$ , ###  $p < 0,001$ )

Na relação Núcleo/Citoplasma, observa-se que houve diferença significativa entre o grupo Controle não infectado (CG) e os grupos Infectados com tratamentos (IG-P, IG-PD e IG-PG), sendo as diferenças entre CG e IG e CG e IG-PG ( $p < 0,05$ ), entre CG e IG-P ( $p < 0,01$ ) e entre CG e IG-PD ( $p < 0,001$ ), demonstrando o efeito deletério da infecção na estrutura celular hepática. Importante notar que o grupo tratado com Praziquantel + Doxiciclina apresenta a maior diferença estatística ( $p < 0,001$ ), indicando que o efeito das reações granulomatosas esquistossomóticas no tecido hepático deste grupo de animais provocam maior dano.

O gráfico 9 apresenta os resultados relativos ao Percentual de Parênquima Hepático:

Gráfico 9 - Percentual de Parênquima Hepático



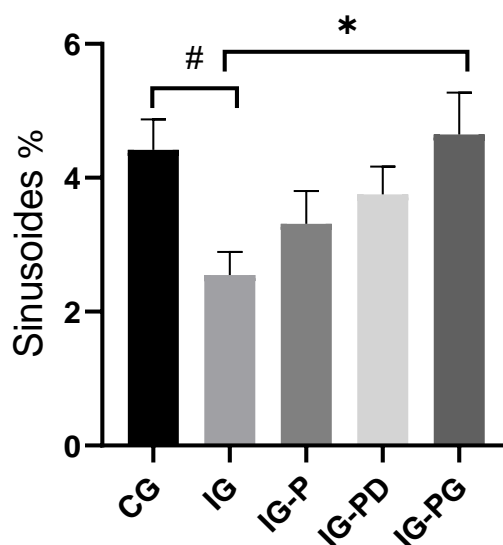
Fonte: Da autora (2024)

Legenda: CG – Animais do grupo controle não infectados; IG – Animais infectados com *S. mansoni*; IG-P - Animais infectados com *S. mansoni* e tratados com Praziquantel; IG-PD - Animais infectados com *S. mansoni* e tratados com Praziquantel + Doxiciclina; IG-PG - Animais infectados com *S. mansoni* e tratados com Praziquantel + Gentamicina. (##  $p < 0,01$ , \*\*  $p < 0,01$ )

Comparando-se o Percentual de Parênquima Hepático, houve diferenças significativas entre os grupos Controle não infectado (CG) e Grupo infectado (IG) ( $p < 0,05$ ). Observa-se também que, entre os grupos tratados, o tratamento com Praziquantel associado à Gentamicina (IG-PG) provocou diferença significativa comparado ao Grupo Infectado não tratado (IG) ( $p < 0,001$ ).

O gráfico 10 representa o Percentual de Sinusoides Hepáticos analisados entre os grupos experimentais:

Gráfico 10 - Percentual de Sinusoides Hepáticos



Fonte: Da autora (2024)

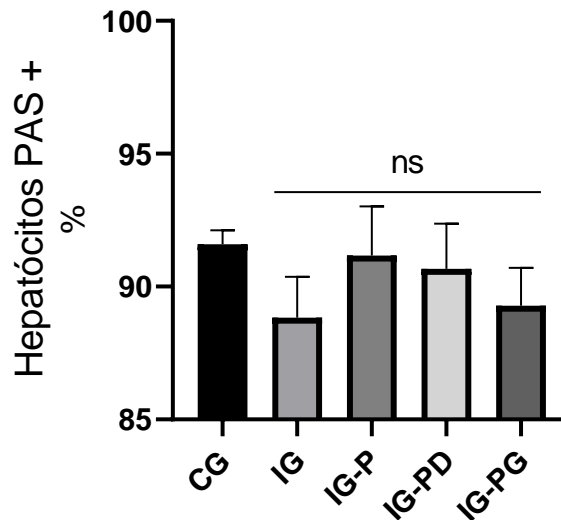
Legenda: CG – Animais do grupo controle não infectados; IG – Animais infectados com *S. mansoni*; IG-P - Animais infectados com *S. mansoni* e tratados com Praziquantel; IG-PD - Animais infectados com *S. mansoni* e tratados com Praziquantel + Doxiciclina; IG-PG - Animais infectados com *S. mansoni* e tratados com Praziquantel + Gentamicina. (#  $p < 0,05$ ; \*  $p < 0,05$ )

Observa-se que, em relação ao Percentual de Sinusoides Hepáticos, o Grupo Controle Infectado (IG) apresentou o menor valor, com diferença significativa ( $p < 0,05$ ), comparado ao Grupo Controle não infectado (CG) e o Grupo tratado com a associação Praziquantel e Gentamicina (IG-PG) apresentou o maior Percentual de Sinusoides Hepáticos quando comparado ao grupo infectado (IG) ( $p < 0,05$ ). Importante destacar que o tratamento com Praziquantel + Gentamicina apresenta o Percentual de Sinusoides Hepáticos bem próximo ao Grupo Controle sem infecção (CG).

Segundo Baptista e Andrade (2005), inicialmente, os granulomas, ao se formarem, são avasculares e se interpõem entre os vasos interlobulares portais e os sinusóides. Posteriormente, os granulomas e o tecido fibrótico resultante tornam-se vascularizados. Os novos vasos cursam do espaço interlobular para os sinusoides e podem originar-se de segmentos terminais das artérias hepáticas, do sistema vascular biliar, de vasos venosos interlobulares ou dos próprios sinusoides, iniciando um processo de angiogênese. Estes autores observam que este processo vai diminuindo gradualmente depois disso, sendo que na fase crônica, os granulomas fibróticos tendem a exibir uma rede vascular delimitadas na periferia.

No gráfico 11 avalia-se o Conteúdo de Glicogênio Hepático pelo Percentual de Hepatócitos PAS+

Gráfico 11 - Análise do Conteúdo de Glicogênio Hepático pelo Percentual de Hepatócitos PAS+



Fonte: Da autora (2024)

Legenda: CG – Animais do grupo controle não infectados; IG – Animais infectados com *S. mansoni*; IG-P - Animais infectados com *S. mansoni* e tratados com Praziquantel; IG-PD - Animais infectados com *S. mansoni* e tratados com Praziquantel + Doxíciclina; IG-PG -Animais infectados com *S. mansoni* e tratados com Praziquantel + Gentamicina

Os resultados das análises do Conteúdo de Glicogênio Hepático pelo Percentual de Hepatócitos PAS+ demonstram que não houve diferença significativa ( $p > 0,05$ ) entre os grupos Controle infectado (IG) e Tratamentos (IG-P, IG-PD e IG-PG) e Grupo Controle não infectado (CG). O grupo infectado (IG) apresenta um perfil de queda na quantidade de glicogênio medido por esta análise, no entanto não houve diferença significativa entre este grupo e o grupo controle (CG). Da mesma forma, os grupos infectados e tratados (IG-P, IG-PD e IG-PG) apresentam que houve um reestabelecimento na produção do glicogênio comparando-se ao grupo infectado (IG), mas ainda assim, sem diferença estatística ( $p > 0,05$ ).

O fígado possui um papel importante no desenvolvimento da infecção esquistossomótica pois ele é o local de amadurecimento do esquistossômulo para sua forma adulta. Além disso, a formação de granulomas periovulares no fígado induzido pela resposta imune do hospedeiro definitivo em resposta à presença de ovos de vermes aprisionados nas paredes dos vasos hepáticos e o desenvolvimento

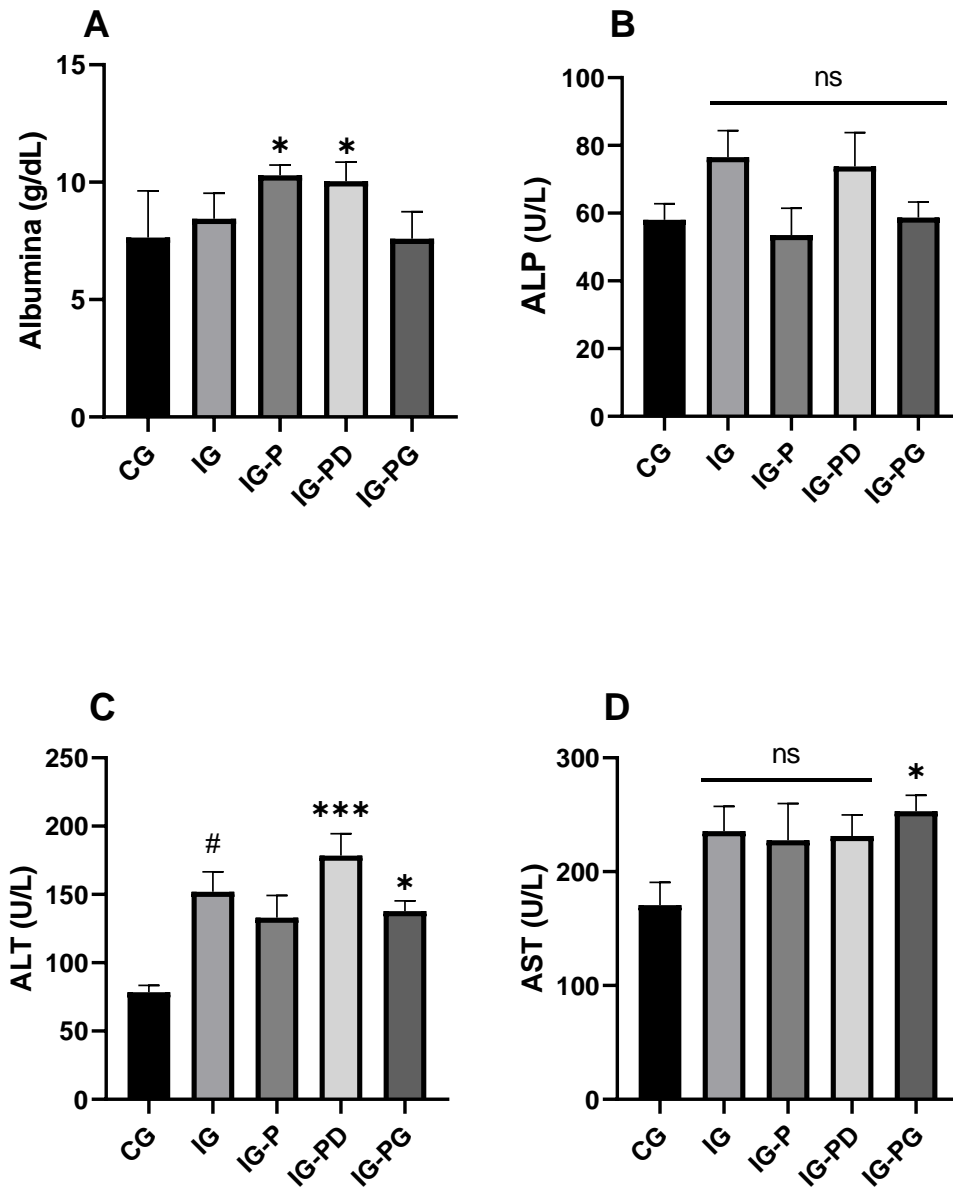
de fibrose hepática periportal caracterizam lesões severas ao órgão e variados níveis de destruição tecidual, gerando alterações das enzimas hepáticas (Wynn *et al.*, 2004).

De acordo com Wilson (2009), a partir do 4º dia de infecção já é possível encontrar vermes jovens no fígado, após isso, os vermes completam seu processo de amadurecimento e se transformam em vermes adultos - até o 20º / 22º dia de infecção. Por volta do 35º dia já é possível observar ovos nas fezes do animal parasitado e, conseqüentemente, podem ser observados granulomas periovulares no fígado. Essas movimentações dos vermes jovens e adultos de *S. mansoni* geram impactos no fígado e, conseqüentemente, nas alterações das enzimas hepáticas. Por essa razão, a avaliação da função hepática torna-se extremamente importante para a determinação da evolução da doença, a eficiência do tratamento e suas associações com antibióticos nos grupos experimentais deste estudo. Desta forma, as enzimas hepáticas avaliadas no presente estudo foram utilizadas para indicar possíveis lesões nos hepatócitos e ductos biliares do fígado.

As amostras de sangue recolhidas dos animais dos grupos experimentais foram utilizadas para avaliação de marcadores clássicos de dano tecidual, especificamente dosagem de atividade de Alanina Aminotransferase (ALT), Aspartato Aminotransferase (AST), Albumina e Fosfatase alcalina (ALP) e os resultados são apresentados na figura 14:



Figura 14 – Resultados dos parâmetros bioquímicos (Albumina, ALT, AST e Fosfatase alcalina)



Fonte: Da autora (2024)

Legenda: CG – Animais não infectados; IG – Animais infectados com *S. mansoni*; IG-P - Animais infectados com *S. mansoni* e tratados com Praziquantel; IG-PD - Animais infectados com *S. mansoni* e tratados com Praziquantel + Doxiciclina; IG-PG - Animais infectados com *S. mansoni* e tratados com Praziquantel + Gentamicina. (# p<0,05; \*p<0,05; \*\*\*p<0,001)

Os parâmetros Albumina, ALT e AST variaram significativamente ao longo dos grupos, tendo sido observado aumento significativo nos grupos infectados e

infectados e tratados com Praziquantel, Praziquantel + Doxiciclina e Praziquantel + Gentamicina (IG; IG-P; IG-PD e IG-PG), comparados ao grupo não infectado (CG).

A quantificação da atividade sérica de ALT demonstrou um aumento significativo da atividade desta enzima em camundongos infectados por *S. mansoni* e nos grupos infectados que receberam os tratamentos associados aos antibióticos (IG-PD e IG-PG), na fase aguda. O grupo IG-PD apresentou a maior diferença significativa ( $p < 0,001$ ) quando comparada ao grupo IG, sendo que as demais alterações significativas apresentaram  $p < 0,05$ . Esta alteração pode sinalizar um possível agravamento da resposta inflamatória nos granulomas hepáticos.

A estimativa da atividade de AST no plasma de camundongos infectados apresentou diferença significativa no grupo tratado com a associação Praziquantel + Gentamicina (IG-PG), permanecendo semelhante nos demais grupos. Estes parâmetros estão de acordo com o relatado na literatura por Lambertucci (2014) indicando que, na fase aguda de infecções, níveis elevados de ALT podem ser observados, por outro lado, os níveis de AST costumam ser observados mais elevados na fase crônica.

A enzima ALT é encontrada abundantemente no citosol de hepatócitos. A atividade de ALT no fígado é cerca de 3000 vezes a atividade sérica. Assim, em caso de injúria ou lesão hepatocelular a liberação de ALT das células hepáticas lesionadas aumentam a mensuração de ALT no soro (Kim *et al.*, 2008), ocorrendo aumentos já no início das lesões causadas pela deposição dos ovos na fase aguda da doença. Aspartato aminotransferase (AST) catalisa a transaminação reversível de aspartato e  $\alpha$ -cetoglutarato em oxalacetato e glutamato, e está presente em maior concentração nos hepatócitos e nas células musculares. O aumento da atividade sérica de AST pode ser causado por necrose e lesão subletal de hepatócitos e de células musculares, evidenciando que a doença avança para a fase crônica.

Em um outro estudo sobre os efeitos do praziquantel sobre parâmetros bioquímicos em camundongos sadios e esquistossomóticos mostrou que as alterações respondem à variável tempo e o tratamento de camundongos infectados com Praziquantel resultou em uma elevação temporária das atividades plasmáticas de ALT e AST no dia 1 após o tratamento. Os valores voltaram ao normal no dia 5 (Andrews; Dycka; Franck, 1980).

A albumina é sintetizada pelo fígado e representa a maior fração das proteínas totais, em conjunto com a globulina. Tem como funções a manutenção da pressão

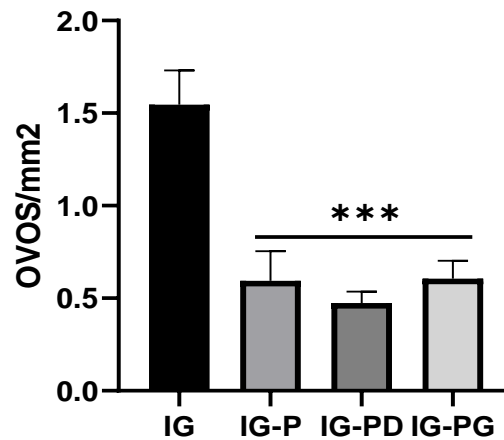
oncótica do sangue, fonte primária de aminoácidos de reservas para as proteínas tissulares, desintoxicação e inativação de compostos tóxicos, transporte de ácidos graxos e de alguns minerais. Metabolicamente a hipoalbuminemia pode afetar outras substâncias devido ao papel da albumina como transportadora, além de causar queda na pressão osmótica do soro e gerar ascite (Thrall *et al.*, 2015). É observado que, na média, a hipoalbuminemia só é constatada quando 60 a 80% da função hepática já está comprometida (Gonzales; Silva, 2006). O fato desta pesquisa ter como foco a fase aguda da doença implica em níveis ainda altos encontrados nestes resultados.

Da mesma forma, em relação ao marcador Fosfatase Alcalina (ALP), observa-se alterações numéricas, mas que não foram suficientes para gerar diferenças estatísticas, muito embora por se tratar da fase aguda da doença, visto que Dos Reis *et al.* (2022) e Silva *et al.* (2018) mostraram que a infecção pelo *S. mansoni*, na fase crônica da doença, pode diminuir os níveis de glicose, e aumentar os níveis de marcadores hepáticos de lesão, como ALT, AST e fosfatase alcalina, ao passo que o tratamento com Praziquantel normalizou os níveis de glicose e diminuiu os níveis dos marcadores de lesão (ALT, AST e Fosfatase alcalina) durante a esquistossomose.

Considerada uma enzima de indução, a fosfatase alcalina (ALP) é amplamente distribuída no organismo, Sintetizada no fígado, osteoblastos, epitélios intestinal e renal e na placenta. Porém os hepatócitos respondem pela maior parte da atividade sérica normal dessa enzima. O aumento da produção de ALP e de sua concentração sérica pode ser notado em casos de maior atividade osteoblástica, colestase, indução por medicamentos e doenças crônicas, inclusive neoplasias. Nos distúrbios hepáticos detecta-se o aumento de sua atividade no soro em decorrência de colestase tanto por obstrução dos canalículos intra como extrabiliares (Thrall *et al.*, 2015).

Na patologia hepática da esquistossomose, os granulomas periovulares e a fibrose periportal são as lesões mais importantes. Os ovos de *Schistosoma* são os iniciadores deste processo granulomatoso e os responsáveis pela resposta do organismo do hospedeiro definitivo às agressões sofridas pela presença dos parasitos (Lenzi *et al.*, 1998). A contagem de ovos de *Schistosoma* pode ser um indicador de fecundidade de vermes adultos como também da carga parasitária.

Neste estudo, foi realizada a contagem do número de ovos por mm<sup>2</sup> no fígado em todos os grupos experimentais infectados e os resultados são apresentados no Gráfico 12:

Gráfico 12 - Contagem de ovos no fígado por mm<sup>2</sup>

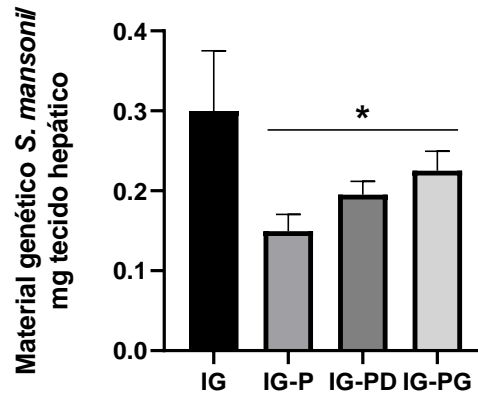
Fonte: Da autora (2024)

Legenda: IG – Animais infectados com *S. mansoni*; IG-P - Animais infectados com *S. mansoni* e tratados com Praziquantel; IG-PD - Animais infectados com *S. mansoni* e tratados com Praziquantel + Doxiciclina; IG-PG - Animais infectados com *S. mansoni* e tratados com Praziquantel + Gentamicina. (\*\*\*) $p < 0,001$ .

Todos os resultados dos grupos tratados com Praziquantel (IG-P, IG-PD e IG-PG) apontaram para uma diminuição significativa da postura de ovos ( $p < 0,0001$ ), um aspecto que está associado à eficácia do Praziquantel na eliminação do *S. mansoni*. No entanto, observa-se que com a associação do Praziquantel + Doxiciclina (IG-PD) houve uma maior redução numérica de ovos no fígado. Nota-se que em um estudo de Dias *et al.* (2019), a Doxiciclina foi capaz de reduzir o número de acasalamento e a postura de ovos em vermes *S. mansoni in vitro*, embora este efeito não se reproduziu com as análises *in vivo* naquele experimento.

Neste trabalho foi também realizada a análise de PCR em tempo real do tecido hepático visando quantificar o material genético de *S. mansoni* neste órgão. No Gráfico 13 observa-se o seguinte resultado:

Gráfico 13 - Quantificação hepática de material genético de *Schistosoma mansoni* por q-PCR



Fonte: Da autora (2024)

Legenda: IG – Animais infectados com *S. mansoni*; IG-P - Animais infectados com *S. mansoni* e tratados com Praziquantel; IG-PD - Animais infectados com *S. mansoni* e tratados com Praziquantel + Doxiciclina; IG-PG - Animais infectados com *S. mansoni* e tratados com Praziquantel + Gentamicina. (\* $p < 0,05$ )

Foi observado que o número de material genético de *S. mansoni* por mg de tecido hepático diminuiu consideravelmente ( $p < 0,05$ ) entre o grupo infectado e os grupos tratados com Praziquantel e suas associações com os antibióticos Doxiciclina e Gentamicina. No entanto, nota-se que a associação dos antibióticos ao Praziquantel indica favorecer uma maior passagem de ovos/parasito do intestino rumo ao fígado, embora sem diferenças estatísticas significantes. Diante dos resultados que demonstram que os antibióticos podem interferir tanto na resposta granulomatosa aos ovos como podem alterar o efeito do Praziquantel isolado, um outro aspecto relevante a ser investigado, neste estudo, é o efeito dos antibióticos Doxiciclina e Gentamicina sobre a microbiota dos camundongos infectados e como a disbiose provocada por eles pode afetar e modular a resposta imune do organismo em resposta aos danos provocados pelos ovos e vermes nos tecidos hepáticos e intestinais, considerando que o fígado é o principal órgão onde os ovos do parasito ficam alojados, e a reação granulomatosa que se forma ao redor destes, a causa da gravidade desta doença.

Baseados em estudos como o de Hayes *et al* (2010), fica bem caracterizado o efeito da microbiota intestinal no estabelecimento de helmintos e a ação de antibióticos (gentamicina e enrofloxacina) interferindo nesta relação. Nesta pesquisa, foi constatado que o estabelecimento bem-sucedido do nematóide parasitário crônico

*Trichuris muris* no intestino grosso de camundongos é dependente da presença da microbiota intestinal e ocorre em paralelo com a modulação da resposta imunológica do hospedeiro. A administração de antibióticos para reduzir a população bacteriana no hospedeiro resultou em uma significativa diminuição na eclosão de ovos de *T. muris*. Essas interações cruciais entre bactérias e parasitos apresentam uma nova dinâmica no ecossistema intestinal, com implicações importantes para os conceitos de homeostase intestinal e regulação imunológica. Os ovos de *T. muris* foram induzidos a eclodir *in vitro* quando incubados por pelo menos 30 min com explantes de ceco de camundongos contendo números substanciais de bactérias a 37°C. Para definir o papel das bactérias neste processo, os ovos foram incubados numa cultura de *Escherichia coli*, uma bactéria comensal intestinal comum. Na presença de *E. coli*, a eclosão foi observada a um nível semelhante ao observado nos explantes intestinais, muito possivelmente associado no papel que as fímbrias exercem na eclosão dos ovos.

A segunda descoberta neste estudo, possivelmente ainda mais interessante, foi que a depleção da microbiota intestinal induzida por antibióticos levou não apenas a um redução na carga de vermes, mas também a uma mudança na resposta imune dependente de células T. As respostas Th2 foram diminuídas, uma vez que menos tricurídeos estavam se ligando às paredes intestinais e as respostas das células T auxiliares tipo 17 (Th17) e reguladoras, as células T (Treg) estavam aumentadas (Hayes *et al.*, 2010).

Pode-se citar outros estudos experimentais que sugerem que tratamentos antihelmínticos podem alterar a suscetibilidade do hospedeiro a outras infecções bacterianas e protozoárias (Knowles *et al.*, 2013; Pedersen; Antonovics, 2013; Ezenwa; Jolles, 2015), potencialmente removendo efeitos imunomodulatórios do helminto ou interações competitivas com outras espécies. Da mesma forma, perturbando comunidades de parasitos através de tratamentos medicamentosos pode ter efeitos negativos sobre a microbiota intestinal, mas tais estudos estão apenas começando a surgir. Como outro exemplo, em camundongos infectados com *T. muris*, o tratamento antihelmíntico reverteu os declínios na diversidade de microbiota e mudanças composicionais foram observadas com infecção experimental (Houlden *et al.*, 2015), e em humanos infectados por helmintos usando albendazol, a diversidade geral de microbiota diminuiu, com redução de *Clostridiales* e expansão de *Bacteroidales* (Ramanan *et al.*, 2016).

Em uma coorte de 109 crianças do ensino fundamental de Taichung (Taiwan), em um estudo de Yang *et al.* (2017) foi avaliado que a infecção por *Enterobius vermicularis* estava associada ao aumento da diversidade microbiana intestinal, houve diminuição da abundância relativa de *Fusobacteria* mas houve também uma proporção enriquecida de *Actinobacteria*, incluindo o probiótico *Bifidobacterium*. Verificou-se que a desparasitação pelo uso do mebendazol se relacionou com um aumento adicional na diversidade bacteriana. No entanto, níveis mais baixos de IgA no intestino foram detectados no grupo infectado com *Enterobius vermicularis* e aumentaram em apenas metade dos indivíduos após o tratamento com mebendazol.

Em um estudo semelhante em uma coorte de 99 crianças e adolescentes com idades entre 7 e 18 anos foi avaliada a microbiota intestinal por sequenciamento do gene 16S rRNA de amostras de fezes em crianças com infecção por *Opisthorchis felineus* antes e após o tratamento anti-helmíntico (Praziquantel) em uma região endêmica –Tomsk, Sibéria Ocidental, Federação Russa. Não houve mudança na diversidade alfa entre os grupos infectados com *O. felineus* e controle, porém foram encontradas mudanças significativas na abundância bacteriana em diferentes níveis taxonômicos entre os indivíduos infectados e não infectados. A família *Enterobacteriaceae* foi mais abundante em participantes infectados em comparação com crianças não infectadas. Após a terapia com Praziquantel, houve diferenças significativas na abundância de alguns microrganismos, incluindo um aumento de *Faecalibacterium* e diminuição de *Megasphaera*. A desparasitação alterou a abundância de algumas bactérias, mas não a diversidade microbiana (Sokolova *et al.*, 2021).

No entanto, para a maioria dos tratamentos antiparasitários, nada se sabe sobre os impactos na microbiota, muito menos como o tempo, a frequência e a dose do tratamento podem influenciar isso, e quão duradouras ou reversíveis tais perturbações podem ser. Da mesma forma, o tratamento com antibióticos também pode alterar a suscetibilidade dos hospedeiros a infecções parasitárias através de interações parasito-microbiota. Conforme o exemplo citado, envolvendo a administração do antibiótico Enrofloxacina em camundongos imunodeficientes que foi capaz de diminuir microrganismos aeróbicos e anaeróbicos no intestino e resultou em um número significativamente reduzido de ovos de *Trichuris muris* e cargas de vermes resultantes (Hayes *et al.*, 2010).

Por fim, o reaproveitamento de medicamentos é uma estratégia útil para acelerar o processo de desenvolvimento de medicamentos devido a custos mais baixos, risco reduzido e menor tempo de comercialização devido à disponibilidade de dados pré-clínicos (Padhy; Gupta, 2011). Nos últimos anos, uma variedade de iniciativas de reaproveitamento de medicamentos foram utilizadas, principalmente na pandemia COVID19 (Irham *et al.*, 2023) e podem também ser utilizadas com atenção especial às doenças tropicais negligenciadas.

As estratégias atuais de tratamento da esquistossomose, baseadas principalmente no Praziquantel, enfrentam desafios como a resistência e a falha em prevenir a reinfecção e destaca a necessidade de estratégias complementares, especialmente em regiões com focos ambientais persistente. A reutilização de medicamentos, devido a restrições econômicas, é decisiva para as doenças negligenciadas. O uso de recursos como a integração de terapias contra diversos estágios da esquistossomose pode aumentar a eficácia e impedir a resistência (Villamizar-Monsalve *et al.*, 2024).

Um exemplo de associação de medicamentos pode ser citado como o tratamento combinado de Praziquantel e Albendazol para a hidatidose (equinococose), porque ambos os medicamentos apresentam um mecanismo de ação diferente e o Praziquantel aumenta a biodisponibilidade do Sulfóxido de Albendazol quando os dois são administrados juntos (Panic *et al.*, 2014).

Outro exemplo é a associação de artemisininas com Praziquantel. Revisões sistemáticas e meta-análises concluíram que a combinação de artemisininas com Praziquantel, mas não artemisininas sozinhas, pode levar a maiores índices de cura do que Praziquantel sozinho, apesar da necessidade de estudos mais aprofundados para eliminar possibilidade de viés e poder chegar em conclusões mais definitivas. Um maior efeito do tratamento combinado de artemisininas e Praziquantel pode ser devido ao fato de que as artemisininas têm atividade contra estágios juvenis, enquanto o Praziquantel afeta vermes adultos com pouca atividade contra os estágios juvenis (Bergquist; Elmorshedy, 2018; Pfarr *et al.*, 2023).

Descobrir novos agentes ou utilizar estratégias associativas apresentam uma abordagem abrangente para navegar pelos desafios complexos no campo das doenças negligenciadas e é essencial para lidar com as preocupações como a resistência ao Praziquantel no enfrentamento da esquistossomose (Villamizar-Monsalve *et al.*, 2024).



A expectativa é que os resultados apresentados neste Capítulo 1 possam contribuir com novas pesquisas que tratem do reposicionamento de fármacos como também da associação de medicamentos no âmbito do enfrentamento da esquistossomose.

## 6 CONCLUSÕES

Neste estudo, na fase aguda da esquistossomose mansônica em camundongos BALB-c machos, foi possível observar que o tratamento com Praziquantel quando utilizado com as associações: Praziquantel + Doxiciclina (IG-PD) e Praziquantel + Gentamicina (IG-PG) diminuíram o número de granulomas no intestino e no fígado, assim como alteraram significativamente os resultados das áreas dos granulomas no fígado, embora a associação dos antibióticos ao Praziquantel não diferenciou estatisticamente em relação ao tratamento com Praziquantel isolado.

Em relação aos parâmetros histológicos foi possível observar que a associação do Praziquantel aos antibióticos Doxiciclina e Gentamicina foi capaz de alterar as características da modulação granulomatosa. sendo o grupo tratado com a associação Praziquantel + Gentamicina (IG-PG) o que apresentou a maior porcentagem de granulomas exsudativo-produtivos em relação ao grupo tratado somente com o Praziquantel (IG-P). Por outro lado, não houve influência dos tratamentos sobre a contagem numérica de leucócitos polimorfonucleares e de mononucleares.

Quanto aos marcadores bioquímicos, Albumina, ALT e AST variaram significativamente ao longo dos grupos, tendo sido observado aumento significativo nos níveis circulantes de ALT no grupo Praziquantel + Doxiciclina (IG-PD), indicando maior dano tecidual hepático. O aumento estatisticamente significativo observado nos níveis de AST no grupo tratado com Praziquantel + Gentamicina (IG-PG) indica uma modulação acelerada tendendo para fase crônica.

Todos os tratamentos causaram uma diminuição significativa na redução do número de ovos/mm<sup>2</sup> no fígado como também redução de material genético de *S. mansoni* por mg de tecido hepático analisado por PCR-Tempo real.

Em suma, foi observado que a associação Praziquantel + Doxiciclina (IG-PD) potencializou o dano inflamatório associado aos granulomas hepáticos, causando também uma desorganização na estrutura da colagenização, que se apresentou de forma bastante difusa nos animais deste grupo. Por outro lado a associação do Praziquantel à Gentamicina (IG-PG) demonstrou modular positivamente a resolução do processo granulomatoso.

## CAPÍTULO 2 - ANÁLISE COMPARATIVA DAS MICROBIOTAS HEPÁTICA E INTESTINAL DE CAMUNDONGOS BALB/c NA ESQUISTOSSOMOSE AGUDA

### 1 INTRODUÇÃO

O intestino humano abriga um microbioma diversificado composto por trilhões de microrganismos como bactérias, arqueias, vírus e parasitos que são importantes para o bem-estar do hospedeiro (Naveed; Abdullah, 2021). A coevolução recíproca entre mamíferos e microrganismos intestinais acontece há centenas de milhões de anos. Atualmente, sabe-se que os seres humanos vivem em conjunto com inúmeros microrganismos existentes no exterior ou no interior do seu organismo, principalmente no intestino (Davenport *et al.*, 2017).

O microbioma humano pode ser considerado “uma comunidade microbiana que ocupa um habitat razoavelmente bem definido, possuindo propriedades físico-químicas distintas” (van der Meulen *et al.*, 2016). No entanto, na literatura científica, o termo surge também associado à Genética. Nesta área, o microbioma é visto como um “conjunto de genomas dos microrganismos que vivem com o ser humano” ou como um “segundo genoma do hospedeiro”, sendo que os próprios microrganismos são definidos como “microbiotas” (Coburn; Guttman, 2015).

A microbiota intestinal humana é definida então como a totalidade dos microrganismos presentes na superfície epitelial do trato gastrointestinal humano (Linares *et al.*, 2016). A microbiota humana, especialmente a microbiota intestinal, é considerada um “órgão essencial” que integra aproximadamente 150 vezes mais genes do que os encontrados no genoma humano, contendo cerca de 1000 espécies diferentes de bactérias (Wang *et al.*, 2017). A interrogação sobre as características e os mecanismos subjacentes a essa relação fez emergir conhecimentos que, ao longo do tempo, têm sublinhado a relevância da microbiota humana na manutenção da saúde e no desenvolvimento de doenças (Davenport *et al.*, 2017).

Apesar da importância da microbiota na manutenção da saúde humana, a sua composição ainda não é totalmente conhecida. No entanto, os avanços técnico-científicos registados mais recentemente têm permitido analisar a microbiota com

maior sensibilidade e especificidade (Mizock, 2015; Wang *et al.*, 2017; Miyauchi *et al.*, 2023).

A maioria das pesquisas atuais que investigam os efeitos de parasitos na microbiota aproveita a tecnologia de sequenciamento de última geração, com um estudo típico para verificar mudanças amplas na composição da comunidade bacteriana intestinal após infecção por parasitos usando sequenciamento de RNA ribossômico 16S (rRNA). Sequenciamento de 16S rRNA é um método baseado em PCR no qual primers direcionados a regiões genéticas altamente variáveis são usados para amplificar o DNA bacteriano em uma amostra, e o pool resultante de seqüências analisadas para avaliar a abundância relativa de microrganismos. Embora este método forneça um importante primeiro passo para entender as interações parasito-microbiota, agora precisamos olhar além das amplas mudanças taxonômicas que ele pode revelar para sondar novos mecanismos e prever melhor os resultados da infecção. Por exemplo, um aumento do gênero *Bacteroides* após a infecção pode ter vários efeitos sobre os hospedeiros, dependendo do contexto e de determinadas espécies envolvidas. Um movimento para entender os papéis funcionais e metabólicos dos microrganismos intestinais alterados por infecção parasitária, além de suas interações com outras espécies microbianas, é agora necessário (Formenti *et al.*, 2021).

Além disso, durante a invasão de microrganismos não comensais, algumas bactérias da microbiota intestinal são capazes de invadir a barreira da mucosa e se translocar para outros compartimentos do corpo, causando doenças infecciosas locais e sistêmicas, por alcançarem sítios não convencionais de colonização comensal. Segundo Wiest e Rath (2003), a translocação microbiana, mecanismo fisiológico da passagem de bactérias e seus produtos (endotoxinas) do lúmen intestinal, através da lâmina própria, para os linfonodos mesentéricos, órgãos intra e extraperitoneais e circulação sistêmica, tem sido estudada como causa patológica quando estas bactérias migram, aderem e se multiplicam em outros tecidos, como fígado e baço.

Estudos mostram que microrganismos que compõem a microbiota intestinal podem causar doença sistêmica em indivíduos imunodeprimidos ou mesmo naqueles sem outras condições associadas. No entanto, os fatores que controlam a translocação de microrganismos ainda são pouco conhecidos e estão relacionados ao agente e ao hospedeiro (Vaishnav, 2013; Rosero *et al.*, 2014; Chen *et al.*, 2020).

De acordo com a literatura, existem vários fatores preponderantes para a translocação bacteriana. Existe um consenso entre os autores que, para ocorrer a translocação bacteriana, o processo está associado a três principais mecanismos: o aumento da permeabilidade da mucosa intestinal, o perfil imunológico e o aumento da microbiota intestinal. Neste contexto, qualquer alteração de um ou todos esses componentes, pode favorecer a passagem de bactérias ou antígenos para locais extra intestinais, acarretando sérias complicações (Zeng; Inohara; Nuñez, 2017; Naaber *et al.*, 2000; Chanchaoenthana *et al.*, 2023).

Por exemplo, durante a infecção pelo *S. mansoni*, tem sido relatado a ocorrência de translocação de bactérias da microbiota intestinal para outros órgãos, tais como linfonodos, baço e fígado, sendo *Escherichia coli* uma bactéria frequente (Lima *et al.*, 2015; Furch *et al.*, 2022; Araújo Fiuza *et al.*, 2022).

A esquistossomose, como agente facilitador de doenças bacterianas, é justificado analisando que a patogenia desta doença provoca, além de alterações no sistema imunológico, dano ao intestino, sistema porta e linfonodos mesentéricos. Encontra-se já documentada a associação da esquistossomose com bactérias Gram-negativas (Lambertucci, 1998). Já foi descrita também a interação da esquistossomose com bactérias Gram-positivas (Lambertucci *et al.*, 1990). Ferraz *et al.* (2005) sugerem que a presença de bactérias aeróbicas no linfonodo mesentérico como consequência da translocação bacteriana pode desempenhar um papel no desenvolvimento de complicações infecciosas pós-operatórias, particularmente em pacientes esquistossomóticos.

Diante disto, observa-se o importante papel da microbiota no desenvolvimento da esquistossomose mansônica e desta forma, o objeto deste segundo experimento é investigar as possíveis alterações na mucosa intestinal, os danos causados pela deposição de ovos e a formação dos granulomas. Além disso, comparar as microbiotas entre os grupos experimentais e avaliar uma possível translocação bacteriana por meio de um incremento de enterobactérias *E. coli* no grupo infectado.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 MICROBIOTA INTESTINAL E ESQUISTOSSOMOSE

O microbioma intestinal, em termos qualitativos e quantitativos é diverso e dinâmico, sendo um dos ecossistemas mais complexos e menos conhecido. Este microbioma pode sofrer facilmente alterações resultantes de certas patologias, da composição da dieta e dos distúrbios gastrointestinais (Sartor *et al.*, 2008).

Cerca de 90% da comunidade bacteriana no adulto pertence às divisões Firmicutes (Gram positivas - 65%) e Bacteroidetes (Gram negativas - 25%), sendo que os anaeróbios dominam face aos aeróbios. Os gêneros anaeróbios mais relevantes incluem *Bacteroides* e *Bifidobacterium* (Marchesi *et al.*, 2016). Os filos *Proteobacteria* (incluindo *Escherichia coli*), *Actinobacteria*, *Fusobacteria* e *Verrucomicrobia* são encontrados com menos frequência na microbiota intestinal (Lange *et al.*, 2016). Salienta-se, ainda, a existência de uma elevada diversidade microbiana interindividual, uma vez que cada ser humano possui um padrão bacteriano exclusivo, o qual é determinado pelo genótipo do hospedeiro (Li *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2017).

Até o momento, foi demonstrado que diferentes parasitos intestinais podem aumentar, diminuir ou não ter efeito na diversidade microbiana intestinal (Glendinning *et al.*, 2014; Lee *et al.*, 2014; Mutapi, 2014; Schneeberger *et al.*, 2018). Além das alterações no microbioma intestinal associadas diretamente aos parasitos, os tratamentos usados para controlar essas infecções também podem ter um impacto significativo na abundância e na diversidade das bactérias intestinais (Kay *et al.*, 2015).

A infecção por *Schistosoma mansoni* provoca mudanças profundas na composição geral da microbiota intestinal do hospedeiro. Essas alterações indicam um estado de disbiose que acompanha a migração do ovo do parasito através da parede intestinal e a formação de granulomas. Muitas dessas mudanças específicas na microbiota estão relacionadas a bactérias associadas à regulação do sistema imunológico e à inflamação do hospedeiro. Essas descobertas sugerem que o equilíbrio entre as bactérias que têm propriedades imunorreguladoras e aquelas com propriedades pró-inflamatórias durante a esquistossomose desempenham um papel crucial na estrutura do estabelecimento efetivo da infecção e/ou da gravidade da

doença resultante das respostas imunes do hospedeiro à infecção (Jenkins *et al.*, 2018).

Segundo Lima *et al.*, (2012), pacientes infectados com *S. mansoni* podem apresentar comprometimento da circulação mesentérica devido à ação traumática, irritativa e espoliativa dos parasitos adultos, que se alimentam de sangue e obstruem os vasos sanguíneos. Além disso, uma ação traumática também é causada pelos ovos espiculados, que precisam atravessar a mucosa intestinal para serem eliminados nas fezes. Contudo, uma parte desses ovos fica retida na mucosa, desencadeando em uma reação inflamatória granulomatosa crônica.

Perturbações intensas da microbiota intestinal que levam ao desenvolvimento de disbiose, são comumente observadas em doenças que envolvem inflamação no intestino (Zeng; Inohara; Nuñez, 2017), como por exemplo a esquistossomose, que gera um extenso processo inflamatório nos tecidos hepáticos e intestinais e isto pode favorecer o processo de translocação de bactérias do intestino para outros tecidos e órgãos.

## 2.2 TRANSLOCAÇÃO BACTERIANA

O trato gastrointestinal (TGI) é reconhecido como um sistema orgânico com funções que vão além das ações simples de digestão e excreção de alimentos. Além disso, ele desempenha papéis metabólicos e de defesa contra microrganismos e substâncias antigênicas (MacFIE, 2004). Sua arquitetura é altamente eficaz, composta por diversos componentes essenciais. Esses componentes incluem uma barreira celular formada por uma camada de células epiteliais colunares, que são intercaladas com células especializadas, como linfócitos e células M. Além disso, o trato gastrointestinal possui tecido linfoide associado ao intestino, suco gástrico, enzimas pancreáticas, bile, muco e conta com o processo de peristaltismo. Essa complexa combinação de elementos permite que o TGI execute suas funções, garantindo a digestão eficiente dos alimentos, a absorção de nutrientes essenciais e a proteção contra agentes patogênicos invasores. O TGI é um órgão multifuncional e vital para a manutenção da saúde e do bem-estar do organismo (Galvão, 2014).

O ambiente microbiano no trato gastrointestinal abriga uma ampla variedade de microrganismos aeróbios e anaeróbios, que atuam na prevenção da colonização por microrganismos patogênicos externos, por meio de diversos mecanismos, tais

como a barreira de colonização. Desta forma, as bactérias que compõem a microbiota intestinal permanecem no lúmen intestinal, pois são contidos por esta eficiente barreira mucosa. Em casos de injúria orgânica, aliada à presença de uma microbiota alterada, estas bactérias podem migrar para outros tecidos e órgãos (Zeng; Inohara; Nuñez, 2017).

Evidenciados por dados e pesquisas, este fato levou à formação do conceito de translocação microbiana. O intestino foi considerado o local mais importante na origem das infecções causadas por translocação bacteriana, pelo fato de ser um grande reservatório de microrganismos (Zanoni *et al.*, 2009). As bactérias mais comumente encontradas em processos de translocação são bactérias presentes na microbiota intestinal normal, principalmente bacilos Gram-negativos aeróbios e facultativos. Bactérias anaeróbicas, translocam apenas em situações em que o intestino se encontra estruturalmente danificado (Zeng; Inohara; Nuñez, 2017).

Diversos elementos contribuem para a redução da eficácia dessa barreira, incluindo processos inflamatórios que perturbem a homeostase local, desnutrição, choque, uso de antibióticos por via oral, administração de nutrição enteral e parenteral, obstrução da vesícula, como também observado, em casos de distúrbios psiquiátricos (Galvão, 2014).

Em um primeiro momento, a translocação foi definida como a migração de bactérias viáveis através da mucosa intestinal e da lâmina própria para os linfonodos e, possivelmente, para outros tecidos estéreis (Berg, 1995). Contudo, com o passar do tempo, esse conceito foi revisado e ampliado. Atualmente, considera-se a translocação como a passagem não apenas de microrganismos viáveis, mas também de microrganismos não viáveis, além de seus produtos, tais como endotoxinas e antígenos, através do processo de aumento da permeabilidade intestinal. O processo de translocação depende do papel de barreira exercido pela mucosa intestinal, sendo auxiliada pelos componentes do sistema imune celular (enterócitos, macrófagos e linfócitos T) e humoral (IgG, IgM e IgA secretória) (Wiest; Rath, 2003).

Diversas pesquisas em animais têm revelado que a translocação é um fenômeno complexo, resultado de múltiplos fatores. Um deles é o desequilíbrio da microbiota residente, levando ao crescimento excessivo de certas bactérias. Além disso, eventos que impactam o sistema imunológico do hospedeiro ou causam danos físicos à barreira intestinal podem, isoladamente ou em conjunto, facilitar a passagem



de bactérias através do intestino (Gencay *et al.*, 2008; Zaroni *et al.*, 2009; Nikitenko; Stadnikov; Kopylov, 2011).

A translocação é mais acentuada em determinadas linhagens bacterianas, especialmente aquelas com maior capacidade de aderência e fixação ao epitélio produtor de muco. Essa habilidade geralmente está associada aos bacilos entéricos que possuem fímbrias, como alguns tipos de *Escherichia coli*. Embora vários microrganismos possam atravessar a membrana intestinal, suas velocidades de translocação variam consideravelmente (Galvão, 2014). Dentre as bactérias Gram-negativas, as *Enterobactérias*, incluindo *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Proteus mirabilis*, apresentam uma translocação rápida. Por outro lado, *Staphylococcus epidermidis* apresenta um índice intermediário de translocação, enquanto os anaeróbios, como *Bacteroides*, *Clostridium* e *Fusobacterium*, apresentam uma translocação significativamente mais lenta (Berg, 1995; MacFIE, 2000; MacFIE, 2004).

O processo de translocação ocorre em três estágios distintos. No primeiro estágio, a bactéria penetra a mucosa intestinal, alcançando os linfonodos mesentéricos. No segundo estágio, ocorre a migração da bactéria dos linfonodos mesentéricos para órgãos como fígado, baço, pulmões e rins. Por fim, no terceiro e último estágio, a bactéria dissemina-se pela cavidade peritoneal e pelo sangue, desencadeando o desenvolvimento de sepse (Berg, 1995).

É notável que o macrófago tecidual desempenha um papel fundamental no processo de translocação entre as células que compõem o tecido intestinal. Estudos demonstraram que bactérias Gram-negativas, como a *E. coli*, marcadas com substâncias radioativas, conseguem atravessar o tecido através de um trânsito direto pelos enterócitos, alcançando a lâmina própria, onde são fagocitadas por macrófagos. Estes macrófagos transportam então as bactérias até os linfonodos mesentéricos, permitindo que as bactérias sobreviventes sejam liberadas (Wiest; Rath, 2003).

Os autores Rundles e Lin (1998) revelaram a ocorrência do transporte direto de *Salmonella* do trato digestório para a corrente sanguínea por meio de macrófagos presentes na lâmina própria. Esses microrganismos, ao serem englobados pelos macrófagos, deslocam-se até os nódulos linfáticos, fígado, baço e medula óssea, chegando finalmente à corrente sanguínea. Em muitos casos, o macrófago não consegue eliminar a *Salmonella*, tornando-se, assim, um veículo de transporte para o patógeno.

No Brasil, o primeiro caso de bacteremia prolongada na esquistossomose hepatoesplênica foi observado por Ferreira (1954), e definitivamente demonstrado por Neves (1967), que detectou, por meio de hemoculturas seriadas, presença persistente da bactéria na corrente sanguínea por até 113 dias em pacientes esquistossomóticos (Santana *et al.*, 2013).

No Egito, 6 pacientes com esquistossomose, apresentaram, também, febre prolongada, sendo que bacteremia por *Escherichia coli* foi encontrada em 5 casos, e em 1 caso foi observado infecção do trato urinário pela mesma bactéria (Farid, Trabolsi, Hafez, 1984). Outras pesquisas experimentais foram realizadas por outros autores, que concluíram que ocorre maior susceptibilidade à infecções por bactérias na esquistossomose (Rocha *et al.*, 1968; Ottens; Dickerson, 1972; Ferraz *et al.*, 1993).

Santana e outros autores (2013) observaram, em um estudo de revisão sistemática, que muitos dos microrganismos observados nas coinfeções com *S. mansoni* compõem a microbiota normal do paciente, como *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*.

Desde então estas pesquisas avançaram buscando um entendimento entre disfunção entérica, translocação bacteriana e esquistossomose (Araújo Fiuza *et al.*, 2022; Furch *et al.*, 2022; Chanchaonthana *et al.*, 2023).

Em um estudo que utilizou um modelo experimental de esquistossomose crônica em camundongos, foi observada a translocação de bactérias para os linfonodos mesentéricos, baço, fígado e sangue periférico, sendo mais prevalente em camundongos fêmeas. A capacidade de translocação observada foi maior em linhagens específicas de bactérias, como *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* e *Pseudomonas aeruginosa*, que possuem maior capacidade de aderência e fixação ao epitélio produtor de muco. Desta forma, o trato digestório funciona como reservatórios de disseminação de infecção potencial (Lima *et al.*, 2012).

Um outro fator que parece facilitar a translocação bacteriana é a ocorrência de imunossupressão na fase crônica da doença. Conforme observam Lima, Teles e Castro (2016), foi demonstrada a secreção de citocinas Th1 pelas células hepáticas em camundongos infectados por *S. mansoni* antes da postura dos ovos. Contudo, a presença de antígenos dos ovos levou a um aumento das citocinas Th2, resultando em uma diminuição na secreção de IFN- $\gamma$  e IL-2, ao mesmo tempo em que houve um aumento nas concentrações de IL-4 e IL-5, levando à modulação do sistema imune.

Nesse sentido, Floudas *et al.* (2019), demonstraram que a infecção pelo *Schistosoma* modula simultaneamente o sistema imunológico do hospedeiro e a microbiota intestinal e foi capaz de melhorar a colite inflamatória do hospedeiro, em um estudo usando o modelo de sulfato de dextrana sódica (DSS) de colite ulcerativa aguda em camundongos da linhagem BALB/c.

Mais recentemente, Li *et al.* (2020), avaliando a microbiota intestinal em um modelo murino para fibrose hepática, corroboram com a hipótese que existe uma relação entre a disfunção da barreira intestinal em animais com doenças hepáticas crônicas e um aumento da translocação de bactérias intestinais e seus componentes. Devido à exposição contínua à lipopolissacarídeos de bactérias gram-negativas da microbiota intestinal, houve a sinalização TGF- $\beta$  em células estreladas hepáticas que foi ativada pela imunidade inata mediada pelo receptor Toll-like, aumentando a secreção de matriz extracelular.

Desta forma, a esquistossomose demonstra possuir fatores favoráveis para facilitar a translocação microbiana, como alterações imunológicas e da mucosa intestinal, com a presença de ovos espiculados que rompem a mucosa intestinal e de granulomas que afetam a estrutura morfológica intestinal.

### 2.3 *Escherichia coli*

A *Escherichia coli* é uma bactéria pertencente à família *Enterobacteriaceae*, comumente encontrada no intestino de mamíferos e aves. Embora seja considerada uma bactéria comensal, é frequentemente apontada como um dos principais agentes causadores de diarreia em seres humanos e animais, além de certas cepas terem adquirido a capacidade de promover inflamação intestinal e produzir toxinas como a colibactina com potencial oncogênico. A família *Enterobacteriaceae* incluem outros simbiontes além da *Escherichia coli* como *Klebsiella spp.* e *Proteus spp.* Essas bactérias residem em baixos níveis no intestino, situando-se próximas ao epitélio da mucosa devido à sua tolerância relativamente maior ao oxigênio difundido presente nesse epitélio (Ahmed, 2007; Tilg *et al.*, 2018).

Devido a este fato, nos recém-nascidos, os primeiros colonizadores do trato gastrointestinal são anaeróbios facultativos, como as *Enterobacteriaceae*. Esses microrganismos consomem o oxigênio, criando um ambiente propício para a subsequente colonização de anaeróbios estritos, como *Bacteroides*, *Clostridium* e

*Bifidobacterium*, o que ocorre em questão de poucos dias após o nascimento (Koenig *et al.*, 2011).

Nos primeiros meses, o leite materno favorece a proliferação de fermentadores de oligossacarídeos, como *Bifidobacterium*. No entanto, após o desmame e a introdução de alimentos sólidos ricos em polissacarídeos não digeríveis pelas enzimas do hospedeiro, ocorre uma mudança na composição da microbiota intestinal. Essa mudança leva a uma expansão dos fermentadores de polissacarídeos, incluindo *Bacteroides*, *Clostridium* e *Ruminococcus*, enquanto ocorre simultaneamente uma diminuição na quantidade de *Bifidobacterium* e *Enterobacteriaceae* (Fallani *et al.*, 2011).

Por outro lado, as *Enterobacteriaceae* têm uma presença notável como simbiontes em diversas condições relacionadas à inflamação, tais como doenças inflamatórias intestinais (DII), obesidade, câncer colorretal, doença celíaca e tratamento com antibióticos. Tanto mudanças ambientais quanto alterações nutricionais, ocasionando a inflamação no intestino, podem favorecer o crescimento dessas bactérias. Em vários contextos, o intestino inflamado - seja por infecção de um patógeno (Lupp *et al.*, 2011) ou deficiências na imunidade do hospedeiro (Carvalho *et al.*, 2012) - parece criar um ambiente propício para a expansão das *Enterobacteriaceae*. Por exemplo, pacientes com doença de Crohn ou colite ulcerativa, duas formas de doença inflamatória intestinal, demonstram uma maior prevalência de *Enterobacteriaceae* (Frank *et al.*, 2007; de la Fuente *et al.*, 2014).

Além do exposto, vários estudos indicam que cepas de *E.coli* comensais podem conter um ou mais genes de virulência, o que lhes confere potencial para causar doenças em animais imunosuprimidos e/ou saudáveis. A aderência é o principal fator envolvido na colonização intestinal. A *E. coli* expressa fímbrias e adesinas não-fimbriais, que são responsáveis pela adesão às células epiteliais do intestino. Essas características são vantajosas tanto para seu papel como componente normal da microbiota intestinal (podendo inclusive atuar como probiótico e competir com microrganismos patogênicos), quanto para seu papel como patógeno (Bélangier *et al.*, 2011; Stecher *et al.*, 2012; Mansour; Asrar; Elhenawy, 2023). Portanto, devido a esta maior capacidade de aderência e fixação ao epitélio produtor de muco facilitado pela presença de fímbrias, cepas de *E. coli* possuem maior capacidade para realizar a translocação para outros tecidos e órgãos.

## 2.4 Metataxonômica

Até o final dos anos 1990, a microbiota intestinal era tradicionalmente avaliada pela análise de isolados a partir de métodos de culturas de anaeróbios estritos e facultativos (Hayashi *et al*, 2003). Com o advento da biologia molecular, várias técnicas de identificação bacteriana têm surgido ao longo das últimas décadas, permitindo diagnósticos mais rápidos, precisos e seguros.

A união entre a Biologia Molecular e a Engenharia trouxe um rápido e impressionante progresso a partir do desenvolvimento de tecnologias de Sequenciamento de Alto Rendimento, as quais, associadas a um desenvolvimento contínuo de ferramentas de Bioinformática, fornecem soluções para vários problemas no campo da Genética e da Biologia (Levy; Myers, 2016).

Dentre as áreas beneficiadas, essa técnica permitiu o estabelecimento de novas abordagens no estudo de diversidade, genômica e função gênica de microrganismos ditos “não cultiváveis”, dada a dificuldade em cultivar grande parte da microbiota presente na natureza, onde se estima que apenas algo entre 0,1 e 1,0% sejam cultiváveis por meio de métodos tradicionais de cultivo (Streit; Schmitz, 2004).

Os avanços na análise metagenômica com o advento do sequenciamento de última geração ampliaram nosso conhecimento sobre comunidades microbianas em comparação com técnicas convencionais, fornecendo uma abordagem avançada para identificar microrganismos novos e não cultiváveis com base em suas informações genéticas derivadas de um ambiente específico (Lema; Gameda; Woldesemayat, 2023).

O sequenciamento de alto desempenho das regiões V3/V4 do gene 16S rRNA é uma técnica poderosa para a análise da composição microbiana em diversos ambientes (Zhang *et al.*, 2023). O gene 16S rRNA é altamente conservado entre diferentes espécies de bactérias e arqueias, mas contém regiões hipervariáveis que podem ser usadas para a identificação e classificação de microrganismos. As regiões V3 e V4 são especialmente importantes porque oferecem um equilíbrio ótimo entre comprimento de leitura e variabilidade suficiente para distinguir entre diferentes grupos taxonômicos (Desidério, 2022).

A metagenômica é uma técnica para o exame de DNAs presentes em habitats regulares por meio da extração direta de DNA. A metagenômica pode ser dividida em dois tipos principais, como a metagenômica Shotgun, que requer o sequenciamento

de genes inteiros na comunidade microbiana, e o sequenciamento Amplicon daqueles que se concentram em uma parte significativa do gene para estudos de taxonomia, como 16 s rRNA, 18 s rRNA e Espaçador Interno Transcrito (ITS, do inglês *Internal Transcribed Spacer*) (Lema; Gameda; Woldesemayat, 2023).

É importante destacar que os levantamentos do gene 16S rRNA são frequentemente chamados de estudos metagenômicos, embora não sejam. Na análise do gene 16S rRNA, o estudo é focado em um único gene usado como marcador taxonômico. Por outro lado, a metagenômica estrutural visa investigar os genomas dos membros da comunidade microbiana. Nesse sentido, a última abordagem permite a reconstrução geral da estrutura da comunidade, potencialmente revelando vias metabólicas de todo o microbioma e atribuindo papéis geocológicos menores ou maiores aos membros da comunidade. Importante observar que os levantamentos do 16S rRNA e a metagenômica não são mutuamente exclusivos; pelo contrário, abordagens que estabelecem uma ligação entre as análises do 16S rRNA com genes ou vias metabólicas têm se mostrado úteis na determinação do potencial funcional de um microbioma. Assim, a combinação dessas estratégias complementares permite uma exploração mais profunda de questões biológicas relevantes na ecologia microbiana, como “quem são os membros da comunidade?” e “quais são seus papéis funcionais?” (Alves *et al.*, 2018).

Sugere-se então que estudos focados na diversidade taxonômica, que consistem em avaliar quais microrganismos estão presentes em uma determinada amostra ambiental, sejam denominados metataxonômicos ou "*metabarcoding*". Esse tipo de abordagem utiliza genes marcadores, como o gene da pequena subunidade ribossomal 16S (gene 16S rRNA) para bactérias e arqueas (Janda; Abbott, 2007) e o Espaçador Interno Transcrito (ITS) para fungos (Schoch *et al.*, 2012). Embora frequentemente referidos como estudos metagenômicos devido à origem da amostra ser metagenômica, a abordagem em si não é metagenômica, pois está focada em um único gene e não no conteúdo gênico total da amostra (Quince *et al.*, 2017).

Desta forma, neste estudo o foco foi uma análise metataxonômica, utilizando o Sequenciamento do gene 16S rRNA.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Investigar em camundongos BALB/c machos, com esquistossomose mansônica em fase aguda e inoculados com *Escherichia coli*, as alterações histopatológicas intestinais e as variações das microbiotas intestinal e hepática.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Para atingir o objetivo proposto neste estudo, buscou-se:

- a) analisar o impacto da coinfeção por *Schistosoma mansoni* e *Escherichia coli* no intestino de camundongos BALB/c por meio de técnicas histopatológicas;
- b) investigar possíveis alterações na composição das microbiotas hepática e intestinal dos camundongos BALB/c não-infectados e infectados, durante a fase aguda da esquistossomose por meio de técnicas de metataxonômica (Sequenciamento do gene 16S rRNA).

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 ASPECTOS ÉTICOS

Este estudo foi previamente submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em pesquisa com animais da Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG), parecer 0024/2020, e seguiu os preceitos de experimentação animal previstos nas recomendações do “*Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*”, constante no NIH (2011).

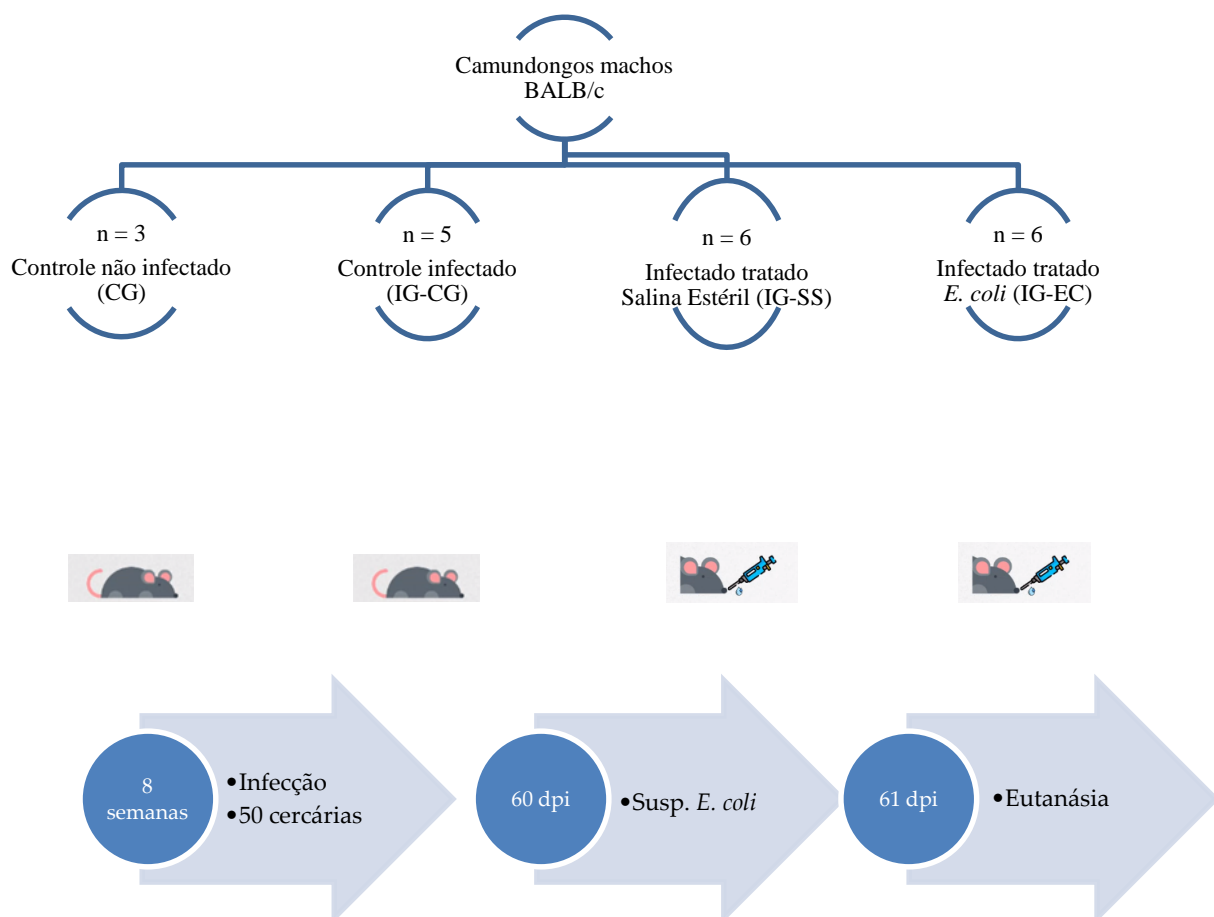
### 4.2 ANIMAIS

Camundongos machos BALB/c com 8 semanas de idade, pesando aproximadamente 25g, foram inoculados no dorso, individualmente, com 50 cercárias de *S. mansoni*, por via subcutânea, seguindo o protocolo do Centro de Pesquisas René Rachou/Fundação Oswaldo Cruz. Os animais foram mantidos em gaiolas devidamente identificadas, com ração e água *ad libitum* e mantidos em sala com temperatura, iluminação e umidade controlados durante todo experimento, sob condições padronizadas de iluminação (ciclo de claro/escuro de 12h/12h), temperatura (23° C) e umidade (60±10%).

### 4.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Os animais foram randomicamente divididos em grupos conforme o esquema a seguir:





#### 4.3.1 Inoculação com a enterobactéria *Escherichia coli*

A bactéria *Escherichia coli* (Cepa ATCC 25922 - *American Type Culture Collection*) cresceu por 24 horas em caldo LB – Luria Bertani (20 ml) a 37°C e 120 rpm. Após o crescimento, foi retirada uma alíquota para determinar o número de UFC por titulação em placas contendo meio LB ágar 1,5% ( $10^{-3}$  a  $10^{-9}$ ).

Os animais com 60 dias após infectados, foram inoculados com 100  $\mu$ l desta suspensão na concentração de  $10^{11}$  UFC/ml, por gavagem (IG-EC). O grupo controle (IG-SS) recebeu salina estéril, também por gavagem.

#### 4.3.2 Eutanásia dos animais e coleta de material

A eutanásia dos camundongos foi realizada 24 horas após a inoculação com a enterobactéria *Escherichia coli*, ocorrendo com 61 dias após a infecção com *S. mansoni* (Dias *et al.*, 2019; Santos *et al.*, 2021). Para cada animal, foi realizada a coleta das fezes, manipulando o animal em fluxo laminar de forma a induzir a defecação em cima de uma placa de Petri estéril coletando 2 a 3 pelotas de fezes em um tubo Eppendorf estéril. Cada tubo foi pesado. Foi então adicionado 1000 µL de PBS estéril em cada tubo. O tubo foi vortexado até a completa dissolução das fezes. Esta suspensão foi congelada a -80°C para extração de DNA com kit de extração de DNA.

Após a coleta das fezes, os camundongos foram submetidos à eutanásia por overdose de anestésico (Ketamina associada a Xilazina na proporção de 2:1), onde foi feita a administração intraperitoneal de Ketamina (0,1 mg/kg de peso corporal) e Xilazina (0,05 mg/kg de peso corporal). Foram realizadas toracotomia e laparotomia mediana para coleta de amostras do intestino, os quais foram coletados para realização das análises histológicas. Estas amostras foram fixados em solução de formaldeído para análises posteriores.

#### 4.3.3 Extração de DNA de fezes e fígado

O DNA total da microbiota de fezes e de fígado foram extraídos utilizando o kit *QIAamp® Fast DNA Stool Mini kit* (QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, GERMANY) de acordo com protocolo do fabricante. Para a extração, foram utilizados 200 µL do material colhido e macerado após a eutanásia que foi congelado a -80°C, e este material foi usado então no processo de extração de DNA. A qualidade do DNA extraído foi verificada através de eletroforese em gel de agarose a 1,5% e as bandas visualizadas com transiluminador de luz ultravioleta. Os DNAs foram quantificados por fluorescência em NanoDrop Jenway Genova 3-in-1 Spectrophotometer.

#### 4.3.4 Histopatologia e análise morfológica

O intestino grosso dos camundongos de todos os grupos experimentais foram removidos e fixados em solução de formaldeído 4% tamponada neutra, processados

rotineiramente e incluídos em parafina. Foram realizados cortes semiseriados com espessura de 5 micrômetros ( $\mu\text{m}$ ), desprezando um espaçamento entre os cortes de 120  $\mu\text{m}$ . Os cortes microscópicos foram corados com hematoxilina/eosina (HE), para observação dos aspectos histomorfológicos do tecido. As imagens das lâminas histológicas foram capturadas com uma câmera digital ligada a um microscópio. As imagens obtidas foram processadas e analisadas por software analisador de imagem. Para a contagem e quantificação do infiltrado inflamatório (células mononucleares: monócitos e linfócitos; e polimorfonucleares (neutrófilos e eosinófilos) foram realizadas dez imagens nos cortes histológicos de cada animal em objetiva 100 x. As imagens obtidas foram processadas e analisadas por software analisador de imagem (AxioVision). Foram mensurados os parâmetros: Densidade numérica dos granulomas, Área de granulomas ( $\mu\text{m}^2$ ) e além da quantificação do infiltrado inflamatório (células mononucleares: monócitos e linfócitos; e polimorfonucleares: neutrófilos e eosinófilos).

#### 4.3.5 Metataxonômica

A identificação de bactérias foi realizada utilizando-se o sequenciamento de alto desempenho das regiões V3/V4 do gene 16S rRNA. O preparo das bibliotecas seguiu um protocolo proprietário (*Neoprosecta Microbiome Technologies*, Brasil). Foi realizada a amplificação com primers para região V3-V4 do gene 16S rRNA, 341F (CCTACGGGRSGCAGCAG, doi: 10.1371/journal.pone.0007401) e 806R (GGACTACHVGGGTWTCTAAT, doi: 10.1038/ismej.2012.8). As bibliotecas foram sequenciadas utilizando-se o equipamento *MiSeq Sequencing System* (Illumina Inc., USA). Utilizou-se sequenciamento for paired-end, os kits V3 com 600 ciclos ou V2 com 500 ciclos. Para single-end, o kit V2 com 300 ciclos foi utilizado. As sequências foram analisadas por meio do pipeline Sentinel. No pipeline Sentinel os arquivos fastq foram avaliados quanto à qualidade Phred (QP) usando o programa FastQC v.0.11.8 (Andrews, 2010). A seguir, os arquivos fastq foram submetidos à trimagem de primers e sequências com baixa qualidade (Phred < 20). O software proprietário utilizado para tal finalidade foi construído em *Python* v.3.6, sendo este inspirado nas funcionalidades do projeto *BioPython* (Cock *et al.* 2009). Para dados paired-end, antes da etapa de trimagem, dois pares de arquivos (R1 e R2) foram unidos em um só arquivo usando *pandaseq* v.2.11 (Masella *et al.*, 2012). Clusters com abundância menor do que 2,

foram removidos das análises, pois tais estruturas normalmente são relacionadas a sequências quimeras (Smyth *et al.*, 2010). As identificações taxonômicas foram realizadas com blastn v.2.6.0+ (Altschul *et al.*, 1990), usando como referência um banco de dados proprietário ou público. Quanto à definição de uma classe, dentre os 20 hits retornados para cada cluster, uma instrução em Python avaliou se um dos três quesitos foram atendidos pelos hits: 1) maior bit-score; 2) menor evaluate; e 3) taxonomias com maior representação. Os hits que atenderam um dos itens anteriores, foram escolhidos como espécie representante, essas análises foram realizadas na plataforma computacional da Amazon, onde a estrutura de bioinformática da Neoprospecta está hospedada. As análises de DMD Bactéria e Fungo, puderam ser feitas contra bancos de dados de referência para os genes 16S rRNA e ITS proprietários ou públicos. O pipeline de bioinformática realizou as análises contra os bancos de dados proprietários. Os bancos de sequências para os genes 16S rRNA e ITS, contam com sequências de genes completos (em sua maioria), os quais contém sequências recuperadas de genomas, não ambíguas e filtradas para sequências quimeras. No entanto, além das análises feitas a partir destes bancos próprios de sequências podem ser usados bancos de dados públicos. Os bancos de dados públicos que podem ser utilizados são o Silva (Quast *et al.*, 2013) e Greengenes (DeSantis *et al.*, 2006).

#### **4.3.6 Análise estatística**

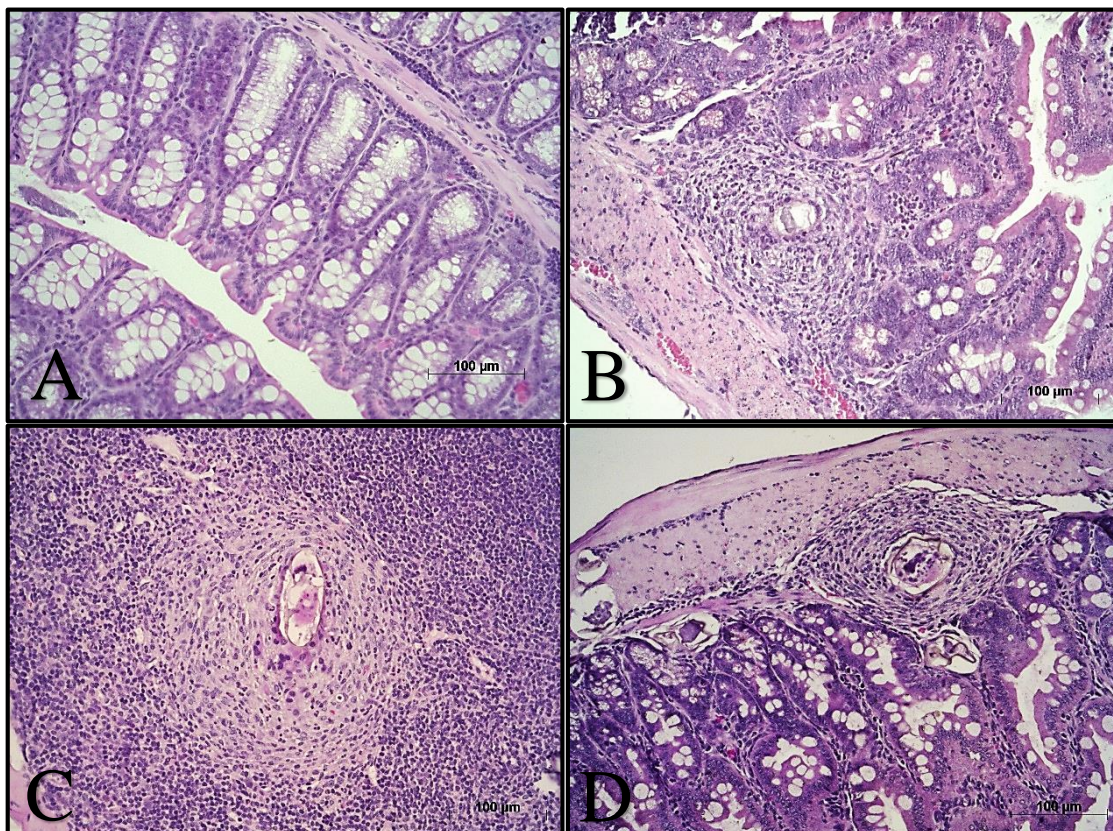
Os dados foram estatisticamente analisados utilizando-se o programa GraphPad Prism versão 8, Software, La Jolla, Califórnia, EUA. Foi realizado o teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov e, na sequência, aplicando a análise de variância (ANOVA) seguida do teste de Tukey para múltiplas comparações. Para as análises metataxonômicas foi utilizado o teste de normalidade Shapiro-Wilk seguido do teste Wilcoxon para as análises de diversidade alfa e o teste Permanova para a diversidade beta. Para todas as análises o nível de significância adotado foi  $\alpha = 0,05$ , sendo considerado aceitável valores de  $p < 0,05$  como significativos.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os granulomas hepáticos e intestinais, ainda que pareçam semelhantes, possuem diferenças no tamanho, composição celular e na deposição de matriz extracelular (Schwartz; Fallon, 2018; Costain et al., 2018). Considerando que a presença de granulomas pode levar a alterações na arquitetura da mucosa intestinal, no intestino grosso dos animais infectados com *S. mansoni* a resposta inflamatória ao redor dos ovos do parasito é útil para que estes consigam atravessar as camadas do intestino em direção à luz do órgão para serem eliminados juntamente com as fezes, completando o ciclo de vida do parasito (Amaral et al., 2017; Dias et al., 2018).

Na análise histopatológica do intestino dos animais foi possível observar a presença de ovos na mucosa e submucosa do órgão, com ou sem a presença de granulomas. Os granulomas formados ao redor de ovos maduros no intestino mostraram uma mistura de proliferação e características exsudativas, com um extenso infiltrado de células inflamatórias (FIGURA 15). Esses resultados foram obtidos a partir da coloração com Eosina e Hematoxilina em camundongos infectados e não infectados pelo *S. mansoni* em fase aguda (8 semanas após a infecção).

Figura 15 - Fotomicrografias de intestino de camundongos infectados com *Schistosoma mansoni* e necropsiados com 8 semanas após a infecção



Fonte: Da autora (2024)

Legenda: A – Intestino de camundongo do grupo não infectado. Objetiva de 10x. B - Intestino de camundongo do grupo infectado. Objetiva de 20x. C - Granuloma esquistossomótico no intestino do grupo infectado por *S. mansoni* tratado com salina estéril. Objetiva de 20x. D - Intestino de camundongo do grupo infectado por *S. mansoni* e inoculado com a suspensão de *E. coli*. Objetiva de 20x.

A análise histopatológica do intestino revelou as seguintes características nos diferentes grupos de camundongos: nos animais não infectados CG (Figura 15A), as criptas intestinais exibiram epitélio bem definido e a lâmina própria com suas estruturas bem preservadas. No grupo infectado IG (Figura 15B), observou-se a presença de um granuloma na lâmina própria da camada mucosa, acompanhado por células PMN (polimorfonucleares) e MN (mononucleares), além da ausência de definição no epitélio das criptas intestinais e um aumento na celularidade da lâmina própria. No grupo IG-SS (Figura 15C), foi possível observar o ovo do *S. mansoni* formando um granuloma, cercado por uma grande quantidade de células PMN e MN.

Na análise histopatológica do grupo IG-EC (Figura 15D), identificou-se um granuloma contendo o ovo entre as camadas mucosa e submucosa, bem como fragmentos de ovos na camada submucosa, enquanto as criptas intestinais não apresentavam definição clara. Observa-se que a análise histopatológica demonstrou que a estrutura básica da mucosa colônica foi danificada pelos granulomas induzidos pela grande quantidade de ovos de *S. mansoni* retidos neste órgão.

Já é conhecido que as fêmeas de vermes *S. mansoni* produzem cerca de 300 ovos por dia e os depositam perto da vasculatura que circunda os intestinos, onde exploram o mecanismo de proteção do hospedeiro para facilitar a passagem dos ovos. Os ovos são organismos viáveis, metabolicamente ativos e altamente antigênicos. Eles aderem ao endotélio dos vasos sanguíneos mesentéricos e devem induzir uma inflamação regulada no intestino, levando a uma resposta granulomatosa necessária para a translocação para o lúmen intestinal e a excreção bem-sucedida nas fezes (Hams; Aviello; Fallon, 2013).

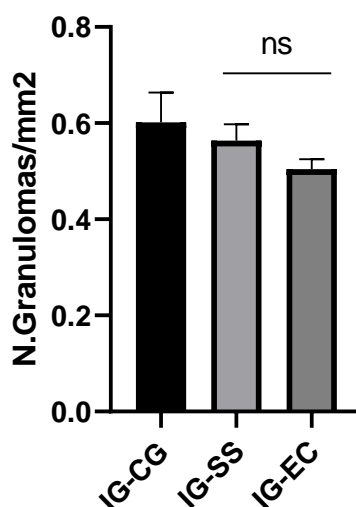
Foi observado por Turner e colaboradores que os ovos de *S. mansoni* são abundantes em áreas com placas de Peyer, onde as secreções de ovos causam perda de celularidade, facilitando a transição. De fato, em apoio a isso, camundongos sem placas de Peyer excretam menos ovos. Na figura 15C observa-se a formação de um granuloma em uma Placa de Peyer.

Vale ressaltar novamente que os granulomas intestinais são distintos dos granulomas hepáticos e terão características do que é visto nos granulomas hepáticos em estágio inicial (Mayer *et al.*, 2017) e são úteis tanto para o hospedeiro quanto para o parasita que necessitam manter o hospedeiro intacto. Um outro aspecto que diferencia os granulomas intestinais ocorre em relação à formação e degradação de colágeno. Enquanto a deposição de colágeno leva à imunopatologia no fígado, a degradação do colágeno pode ser mais importante em granulomas intestinais. Oito semanas após a infecção, o conteúdo de colágeno em granulomas hepáticos já está significativamente aumentado, mas apenas uma deposição mínima é observada no intestino, onde o colágeno só vai ser encontrado na fase crônica. Além disso, a estrutura do colágeno ocorre de forma concêntrica no fígado, enquanto uma deposição descontínua é observada no intestino. Considerando também que foram encontradas no cólon de camundongos cronicamente infectados metaloproteinases da matriz com expressão elevada de transcritos MMP-2, MMP-3 e MMP-8 todos os

quais possuem atividade de colagenase (Grimaud *et al.*, 1987; Schwartz; Fallon, 2018).

Em relação ao número de granulomas encontrados entre os diferentes grupos de animais no experimento o Gráfico 14 ilustra a média do número de granulomas.

Gráfico 14 - Número de granulomas/mm<sup>2</sup> no intestino de camundongos infectados com *S. mansoni*



Fonte: Da autora (2024)

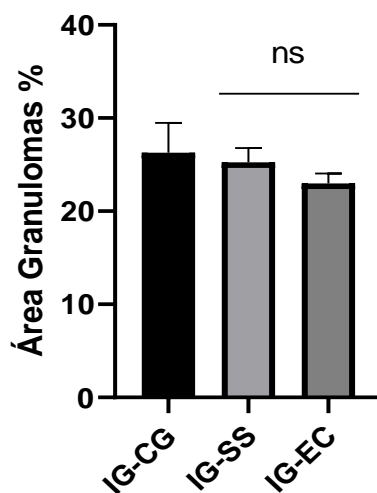
Legenda: IG-CG – Animais infectados com *S. mansoni*; IG-SS – Animais infectados com *S. mansoni* e tratados com Solução salina estéril; IG-EC - Animais infectados com *S. mansoni* e inoculados com a suspensão de *Escherichia coli*.

Observou-se que o grupo infectado (IG-CG) apresentou o maior número de granulomas/mm<sup>2</sup>, porém não houve diferença estatística quando comparado aos demais grupos experimentais (IG-SS e IG-EC). Porém é importante ressaltar que, devido ao curto tempo entre a infecção com a suspensão de *E. coli* e a eutanásia, não eram esperados resultados significativamente diferentes.

Em relação à área percentual dos granulomas, o que significa a área total ocupada pelos granulomas dentro uma determinada unidade de área de tecido intestinal (%), nota-se, no Gráfico 15, que não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos experimentais.



Gráfico 15 – Área percentual dos granulomas no intestino de camundongos infectados com *S. mansoni*

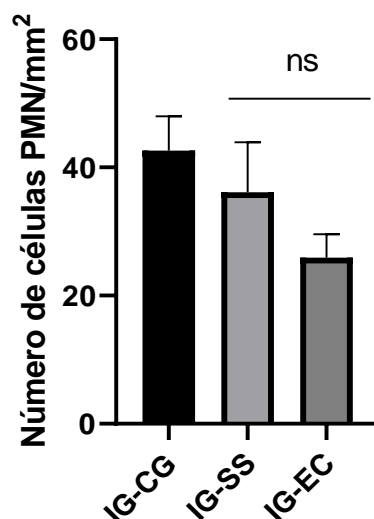


Fonte: Da autora (2024)

Legenda: IG-CG – Animais infectados com *S. mansoni*; IG-SS – Animais infectados com *S. mansoni* e tratados com Solução salina estéril; IG-EC - Animais infectados com *S. mansoni* e inoculados com a suspensão de *Escherichia coli*.

A estrutura celular do granuloma esquistossomótico é composta por eosinófilos, macrófagos, linfócitos, neutrófilos, mastócitos e fibroblastos (Souza *et al.*, 2011). Para observar a composição do infiltrado de células inflamatórias nos granulomas intestinais, no Gráfico 16 são apresentadas as médias de polimorfonucleares/mm<sup>2</sup>.

Gráfico 16 - Contagem de leucócitos polimorfonucleares/mm<sup>2</sup> no intestino de camundongos infectados com *S. mansoni*

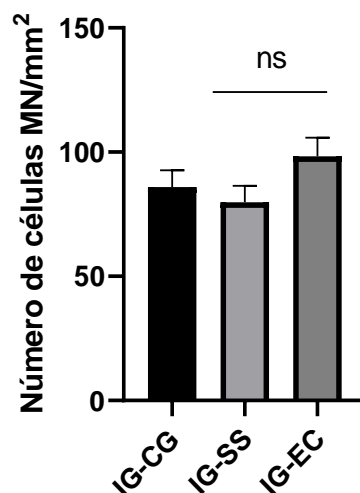


Fonte: Da autora (2024)

Legenda: IG-CG – Animais infectados com *S. mansoni*; IG-SS – Animais infectados com *S. mansoni* e tratados com Solução salina estéril; IG-EC - Animais infectados com *S. mansoni* e inoculados com a suspensão de *Escherichia coli*.

Observa-se que o grupo infectado (IG-CG) apresentou o maior número de células, enquanto o grupo inoculado com a suspensão de *E. coli* (IG-EC) exibiu o menor número de células, porém os resultados não diferiram estatisticamente entre si ( $p > 0,05$ ). No Gráfico 17, são comparadas as médias de mononucleares (monócitos e linfócitos).

Gráfico 17 - Contagem de leucócitos mononucleares/mm<sup>2</sup> no intestino de camundongos infectados com *S. mansoni*



Fonte: Da autora (2024)

Legenda: IG-CG – Animais infectados com *S. mansoni*; IG-SS – Animais infectados com *S. mansoni* e tratados com Solução salina estéril; IG-EC - Animais infectados com *S. mansoni* e inoculados com a suspensão de *Escherichia coli*.

Nota-se que não houve diferença significativa entre os grupos estudados; no entanto, os animais do grupo tratado com *E. coli* indicaram uma tendência para um maior número de células mononucleares, devendo-se também levar em consideração o fator temporal curto entre a intervenção com a suspensão de *E. coli* e a eutanásia, porém necessário para o intuito da pesquisa em analisar a microbiota após o aporte da bactéria *E. coli*.

O granuloma esquistossomótico tem sido estudado extensivamente durante décadas e há um consenso de que a composição do granuloma varia temporalmente e entre as espécies. Em um estudo de Warren e Domingo (1970), aos 16 dias após a injeção intravenosa de ovos de *S. mansoni* em camundongos, os eosinófilos responderam por 50% do granuloma, com o restante constituindo principalmente de macrófagos e neutrófilos. À medida que a infecção progride, experimentos mostraram que os granulomas em estágio avançado em camundongos são caracterizados por uma diminuição de macrófagos e neutrófilos e um aumento de células semelhantes a linfócitos e células plasmáticas na periferia da inflamação periportal. A presença de células plasmáticas sugere produção local de anticorpos, e lesões necróticas com

células polimorfonucleares sugerem reações mediadas por complexo antígeno-anticorpo.

Nesse mesmo sentido, em uma pesquisa de Silva e colaboradores (2000), durante a fase intermediária dos granulomas intestinais, os eosinófilos eram menos numerosos, enquanto os macrófagos e os fibroblastos tornaram-se mais proeminentes. Este fato demonstra que a resposta inflamatória e imunológica estão sendo moduladas do tipo Th1 para Th2, caracterizada pela produção de IL-4, IL-5 e IL-10 e IL-13 com baixos níveis de IFN- $\gamma$  (Araújo *et al.* 2004). Esta resposta do tipo Th2 passa então a ser predominante e é a responsável pela modulação da produção e das funções efetoras dos mediadores pró-inflamatórios (Cheever *et al.*, 2000), exercendo um papel protetor para o hospedeiro, resguardando-o dos antígenos tóxicos solúveis do ovo.

Adicionalmente, à respeito do papel da imunomodulação e a relação com bactérias, pode-se citar o que foi observado no trabalho de Drage *et al.* (2016) onde avaliou-se que concentrações elevadas de IL-10 na urina estão associadas à persistência de *Escherichia coli* em pacientes idosos suscetíveis a infecções recorrentes do trato urinário. Nesta pesquisa, notou-se que quando as concentrações de citocinas de amostras de urina negativas para *E. coli* foram comparadas àquelas contendo  $\geq 10^5$  UFC/ml de bactérias, um aumento significativo em IL-10 ( $6,45 \pm 12,26$  pg/ml versus  $10,57 \pm 20,85$  pg/ml ( $p = 0,04$ ) foi observado. O impacto do tratamento com antibióticos em relação à IL-10 não apresentou significância estatística. Essencialmente, o hospedeiro cria uma homeostase imunológica no trato urinário inferior que suporta a persistência bacteriana, ou seja, concentrações acentuadamente altas de IL-10 foram propostas para promover um ambiente imunossupressor.

Importante destacar também o papel de extrema importância na regulação da infecção por esquistossomose exercido pelas células T reguladoras (Tregs), que podem ser categorizadas em Tregs induzíveis (iTregs), que aumentam durante as infecções, e Tregs naturais (nTregs), que são uma forma endógena dessas células (Jonuleit e Schmitt, 2003). Frequências aumentadas de Tregs humanos foram descritas em infecções por *S. mansoni* e *S. japonicum*. Estudos murinos demonstraram que, após a infecção com *S. mansoni*, a porcentagem de nTregs (CD4<sup>+</sup>, CD25<sup>+</sup> e Foxp3<sup>+</sup>) aumentou durante o estágio crônico da doença, contrastando com o papel dos iTregs que estavam envolvidos na regulação por meio da produção

de IL-10. A transferência adotiva de células T CD25 e CD4<sup>+</sup> para camundongos deficientes em células B e T resultou em um aumento na patologia hepática e mortalidade durante a infecção por *S. mansoni*, sugerindo um importante papel regulador para Tregs durante a infecção murina. Além disso, o envolvimento de Treg em granulomas colônicos murinos perto do local da infecção demonstrou ser dinâmico ao longo do curso da doença. Durante os estágios crônicos da infecção, houve um aumento aproximado de quatro vezes em Tregs CD4<sup>+</sup>, CD25<sup>+</sup> e Foxp3<sup>+</sup> em granulomas colônicos. As Tregs CD4<sup>+</sup> e CD25<sup>+</sup> recrutados pelo cólon foram considerados fortes moduladores de respostas Th2, incluindo tamanho do granuloma e eosinofilia, sugerindo um papel na modulação da esquistossomose intestinal. O ambiente entérico também foi mais favorável ao desenvolvimento de Tregs CD4<sup>+</sup> e Foxp3<sup>+</sup> em relação ao ambiente hepático, o que pode explicar por que os granulomas colônicos foram modulados mais rapidamente do que os do fígado após a fase aguda e por que os granulomas hepáticos mantiveram seu tamanho e celularidade durante a fase crônica (Llanwarne; Helmsby, 2021).

Relativo ao outro aspecto a ser abordado nesta tese, que é investigar possíveis alterações causadas pela esquistossomose aguda na composição da microbiota intestinal dos camundongos BALB/c infectados em comparação aos não-infectados, pode-se inferir que a esquistossomose como agente facilitador de doenças bacterianas, já foi documentada na associação com bactérias Gram-negativas, principalmente *Escherichia coli* (Teixeira; Bina; Barreto, 1976; Farid; Trabolsi; Hafez, 1984). Assim como já foi descrita a interação da esquistossomose com bactérias Gram-positivas (Labertucci *et al.*, 1990). De maneira similar, estudos experimentais já documentaram maior ocorrência de abscesso hepático estafilocócico em camundongos portadores de esquistossomose quando comparados aos controles sem a doença (Teixeira *et al.*, 1995). Vale ressaltar que o processo granulomatoso intestinal, além da função de facilitar o processo de translocação do ovo para o lúmen gastrointestinal e proteger os tecidos do hospedeiro de respostas imunes exageradas contra os ovos antigênicos, também interferem na translocação bacteriana do intestino para a circulação do hospedeiro (Hams; Aviello; Fallon, 2013).

Acredita-se que, para que ocorra a passagem de microorganismos e endotoxinas da luz intestinal para a corrente sanguínea, haja a necessidade da existência isolada ou conjunta de danos na imunidade do paciente, alteração da microbiota ou quebra da barreira defensiva da mucosa intestinal (Dwinell *et al.*, 2003;

Wiest; Rath, 2003). Ainda existem muitas perguntas a respeito da associação de translocação bacteriana e esquistossomose mansônica, mesmo sabendo que o último provoca, além de alterações no sistema imunológico, dano ao intestino, sistema porta e linfonodos mesentéricos. Estas injúrias causadas no intestino estão associadas aos ovos do parasito que passam ou ficam presos nos tecidos intestinais, induzindo inflamação granulomatosa da mucosa com microulcerações, sangramento superficial e, às vezes, pseudopolipose. Pseudopólipos são massas projetadas de tecido inflamatório que se desenvolvem durante a fase de cicatrização em ciclos repetidos de ulceração (Mcmanus, 2018).

No caso das bactérias aeróbicas Gram-negativas, a translocação pode ocorrer com certa facilidade, até mesmo em indivíduos não injuriados, com enterócitos intactos. Bactérias anaeróbicas, translocam apenas em situações em que o intestino se encontra estruturalmente danificado. Estudos mostram que bactérias intestinais podem causar doença sistêmica em indivíduos imunodeprimidos sem outras condições associadas. Acredita-se que disfunções imunes sejam capazes de promover primariamente translocação bacteriana (Wiest; Rath, 2003).

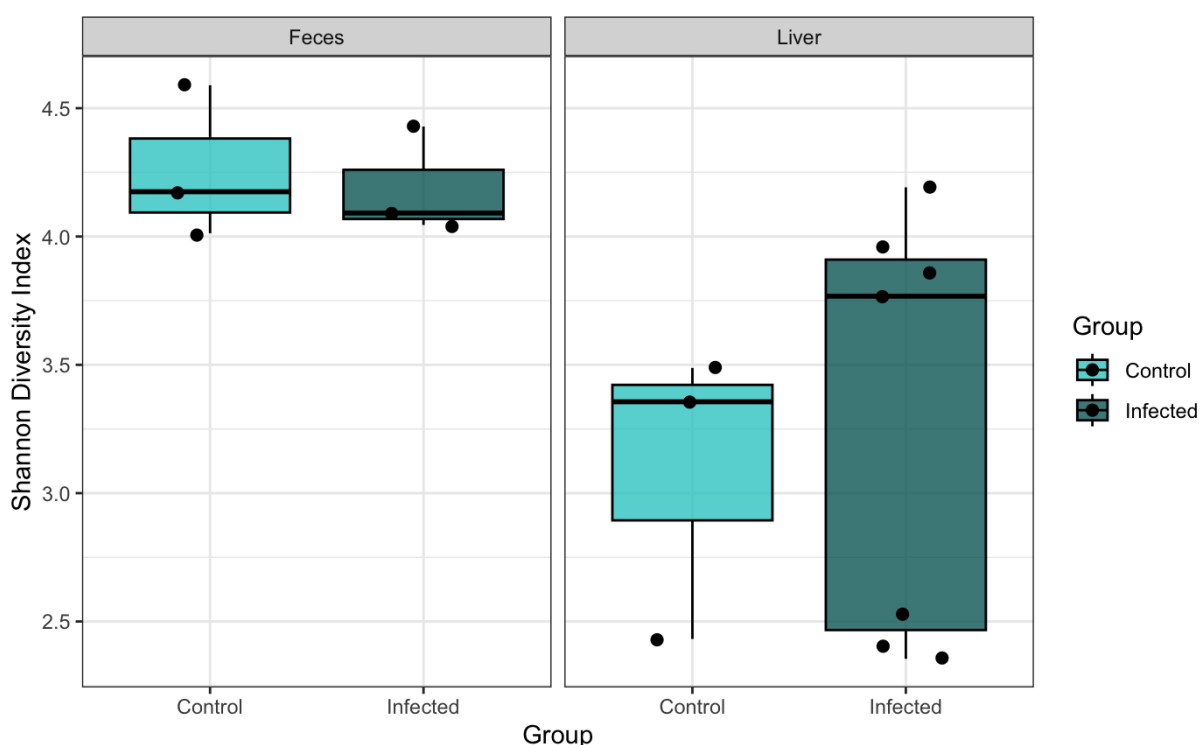
Em consonância com estudos que tem mostrado a presença de *E. coli* no fígado, quando obstruções ocorrem em ductos, como os vistos na infecção pelo *S. mansoni* (Jeyarajah *et al.*, 2006), outros autores também observaram que a infecção por *S. mansoni* é capaz de alterar quantitativamente e qualitativamente a microbiota de mamíferos (Jenkins *et al.*, 2018; Floudas *et al.*, 2019).

Desta forma, uma análise metataxonômica de fezes e fígado de animais controle não-infectado e de animais infectados por *S. mansoni* foi proposta neste estudo, visando avaliar esta inter-relação microbiota-parasito-hospedeiro. O sequenciamento de alto rendimento do gene 16S rRNA foi implementado para ilustrar as alterações nas composições bacterianas nas fezes e intestino buscando compreender as possíveis alterações causadas pelo *S. mansoni* na fase aguda da doença. Para avaliar a diversidade alfa das amostras, em nível de classe, foram utilizadas, neste trabalho, as métricas de Shannon, Chao1 e a uniformidade na distribuição das comunidades bacterianas pelo índice Evenness.

A figura 16 ilustra a diversidade da microbiota, quantificada pelo índice de Shannon. Este índice é uma medida quantitativa da variedade de diferentes espécies bacterianas presentes em uma amostra de fezes, considerando tanto o número quanto a uniformidade de sua distribuição. O valor do índice de Shannon aumenta

conforme aumenta o número de espécies na amostra e a distribuição equitativa Shannon é reconhecido como um indicador de diversidade. Quanto maior o valor do índice de Shannon, maior a diversidade da comunidade bacteriana analisada. Este índice também é interessante por ser sensível à espécies raras como também ser sensível a variações nas abundâncias (Kim *et al.*, 2017; Justus; 2011; Prodan *et al.*, 2020).

Figura 16 – Análise de diversidade alfa microbacteriana de fezes e fígado de camundongos não-infectados e co-infectados com *S. mansoni* e *E. coli* pelo índice de Shannon



Fonte: Da autora (2024)

Nota: Diferenças de diversidade alfa entre os grupos controle e infectados de fezes e fígado analisadas pelo índice Shannon. ( $p > 0,05$ )

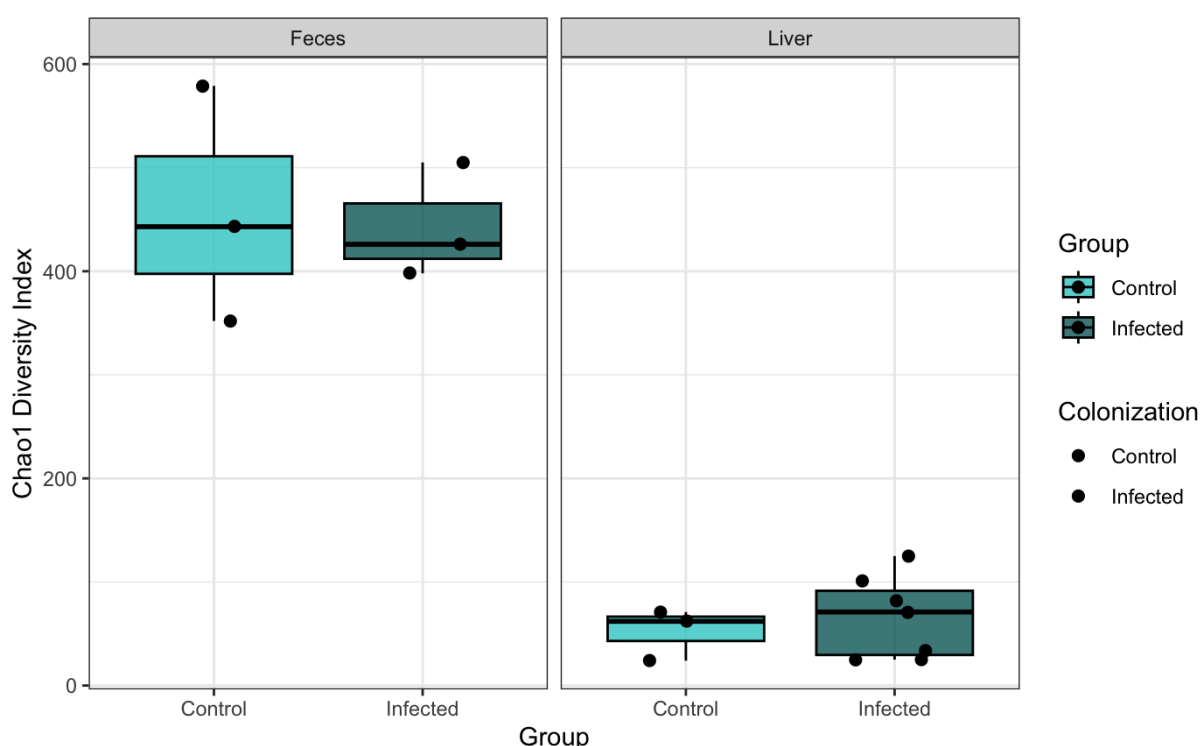
Na análise das fezes dos grupos controle e infectado, pode-se considerar que, pela métrica Shannon, as medianas altas indicam maior diversidade nas fezes do que a encontrada nas amostras de fígado para ambos os grupos. Porém entre os grupos controle e infectado para fezes ou fígado, ambos os grupos têm medianas próximas, indicando que a diversidade de Shannon é semelhante, demonstrando que a infecção, na oitava semana da fase aguda da doença, não parece alterar significativamente a

diversidade bacteriana nem nas fezes e nem no fígado. Não houve diferença estatística significativa (Fezes  $p = 0,756$  e fígado  $p = 0,667$ ). Este fato deve-se muito ao período da análise neste estudo, que foi a fase aguda da doença.

O índice de Chao, desenvolvido por Anne Chao (1984), é utilizado para estimar a riqueza total de espécies em uma comunidade a partir de dados de amostragem, especialmente quando as amostras podem não capturar todas as espécies presentes. Este índice é particularmente útil em estudos de biodiversidade onde pode ser difícil amostrar completamente todas as espécies, onde esta métrica ajuda a compensar a subestimação das espécies menos abundantes (Chao, A. 1984; Prodan *et al.*, 2020).

A análise de diversidade alfa, pelo índice Chao1, de fezes e fígado é apresentada na figura 17:

Figura 17 – Análise de diversidade alfa microbacteriana de fezes e fígado de camundongos não-infectados e co-infectados com *S. mansoni* e *E. coli* pelo índice de Chao1



Fonte: Da autora (2024)

Nota: Diferenças de diversidade alfa entre os grupos controle e infectados de fezes e fígado analisadas pelo índice Chao1. ( $p > 0,05$ )

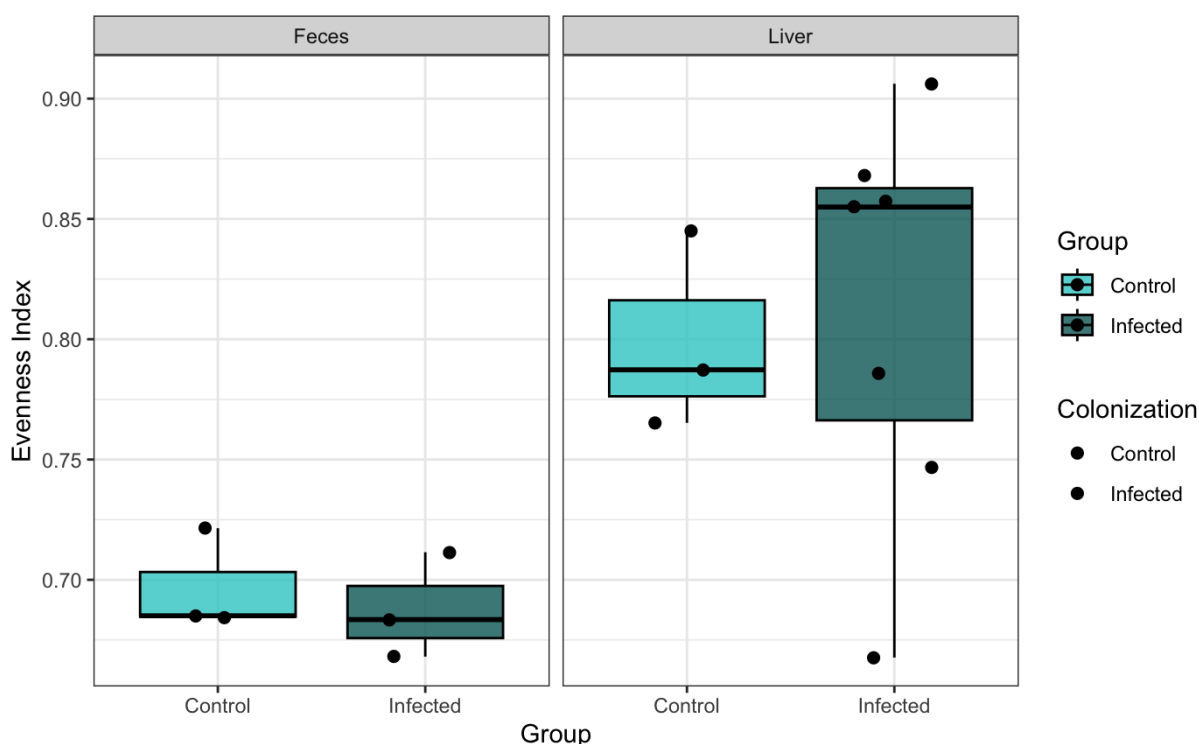


Pode-se notar que, tanto nas fezes como no fígado, a diversidade de Chao1 é semelhante entre os grupos controle e infectado, porém a riqueza total de espécies avaliada pela diversidade alfa nas fezes é muito maior do que a encontrada no fígado. Não foi encontrada nenhuma diferença estatística significativa para o Chao1 do índice de diversidade alfa nos grupos controle e infectados de fezes e fígado, sendo  $p=0,851$  para a análise de fezes e  $p=0,53$  para a análise de fígado.

Em análises de metataxonômica, o índice de Evenness é uma medida importante para avaliar a uniformidade na distribuição das populações taxonômicas dentro de uma comunidade microbiana. Ele complementa métricas de diversidade, como o índice de Shannon, fornecendo informações sobre a equitabilidade das diferentes espécies ou grupos taxonômicos presentes em uma amostra. Esse índice leva em consideração não apenas a riqueza de espécies, mas também a proporção com que cada espécie contribui para a comunidade, ajudando a caracterizar se a comunidade é dominada por algumas espécies (baixa Evenness) ou se as espécies estão distribuídas de forma mais uniforme (alta Evenness). O valor deste índice é definido entre 0 e 1, sendo que 1 representa uma comunidade com uniformidade perfeita e diminui para zero à medida que as abundâncias relativas das espécies divergem da uniformidade (Pielou, 1966).

Na figura 18 a diversidade alfa das amostras de fezes e fígado é avaliada pela métrica de uniformidade das amostras:

Figura 18 – Análise de diversidade alfa microbacteriana de fezes e fígado de camundongos não-infectados e co-infectados com *S. mansoni* e *E. coli* pelo índice Evenness



Fonte: Da autora (2024)

Nota: Diferenças de diversidade alfa entre os grupos controle e infectados de fezes e fígado analisadas pelo índice Evenness. ( $p > 0,05$ )

Neste trabalho, o índice de uniformidade nas amostras de fezes não mostra uma diferença significativa entre os grupos controle e infectado, sugerindo que a infecção não impacta substancialmente a uniformidade microbiana nas amostras de fezes. A mediana mais alta no fígado indica que há maior uniformidade das comunidades microbianas do que nas fezes, no entanto, para as amostras de fezes e fígado, não foi encontrada nenhuma diferença estatística na métrica de Evenness ( $p > 0,05$ ) entre o grupo controle não infectado e o grupo infectado por *S. mansoni* (Fezes:  $p = 0,4$ ; Fígado:  $p = 0,747$ ). Destaca-se que a uniformidade das amostras das fezes é mais divergente do que no fígado.

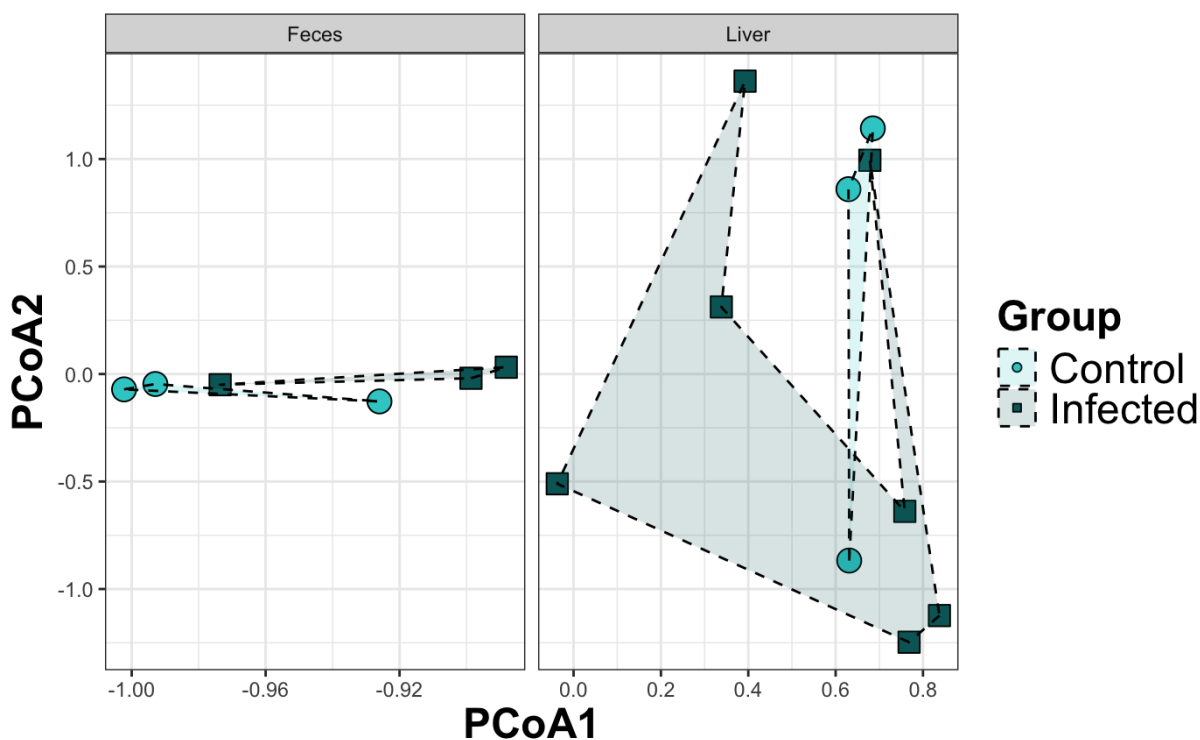
O Diagrama de Ordenação de Análise de Coordenadas Principais (PCoA, do inglês *Principal Coordinates Analysis*) é uma técnica multivariada amplamente utilizada em análises de dados biológicos e ambientais, incluindo estudos de metagenômica e metataxonômica. O PCoA é frequentemente empregado para

visualizar e explorar a variação entre unidades amostrais com base nas suas composições taxonômicas ou funcionais (Legendre; Legendre, 2012).

No PCoA, a posição relativa das unidades amostrais no gráfico reflete suas similaridades ou dissimilaridades. Unidades amostrais próximas no diagrama são mais semelhantes entre si em termos de composição taxonômica ou funcional, enquanto unidades distantes são mais dissimilares. A correlação entre as unidades amostrais pode ser interpretada visualmente no PCoA, onde a proximidade ou distância entre os pontos no gráfico indica o grau de similaridade ou diferença entre as amostras (Borcard; Gillet; Legendre, 2018).

Na figura 19 observa-se os diagramas de ordenação de Análise de Coordenadas Principais (PCoA) detalhando a correlação entre unidades amostrais, ou seja, da análise global de amostras fecais e hepáticas de camundongos não-infectados e infectados com *S. mansoni*.

Figura 19 - Análises de ordenação de amostras de fezes e fígado de camundongos não-infectados e co-infectados com *S. mansoni* e *E. coli*



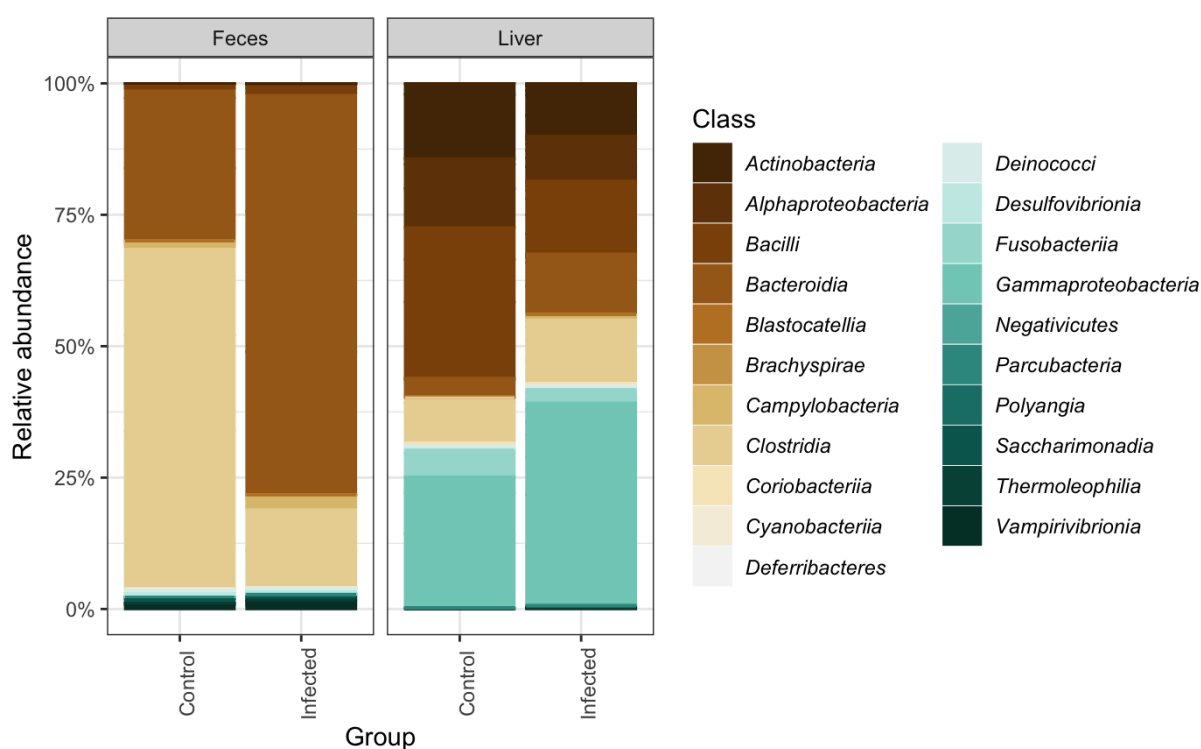
Fonte: Da autora (2024)

Nota: Diferenças de diversidade beta entre os grupos controle e infectados de fezes e fígado avaliadas pela Análise de Coordenadas Principais (PCoA). ( $p > 0,05$ )

A análise de PCoA, onde avalia-se a diversidade beta entre os grupos e entre fezes e fígado, indicou a variação na comunidade microbiana entre as amostras. A pouca variação entre os grupos controle e infectado nas fezes sugere que a infecção não altera significativamente a diversidade microbiana beta nas fezes. Comparando-se a diversidade beta entre fezes e fígado observa-se que há uma distinção entre a composição entre os dois, utilizando-se a análise permutacional Permanova. No entanto, vale ressaltar que não foram detectadas diferenças estatísticas significativas.

Para observar os efeitos da infecção por *S. mansoni* na microbiota intestinal e hepática de camundongos BALB/c, gráficos de barras foram gerados de acordo com a abundância relativa das classes bacterianas intestinais mais abundantes e os resultados estão na figura 20:

Figura 20 - Análises de abundância relativa por grupo de amostras de fezes e fígado de camundongos não-infectados e co-infectados com *S. mansoni* e *E. coli*



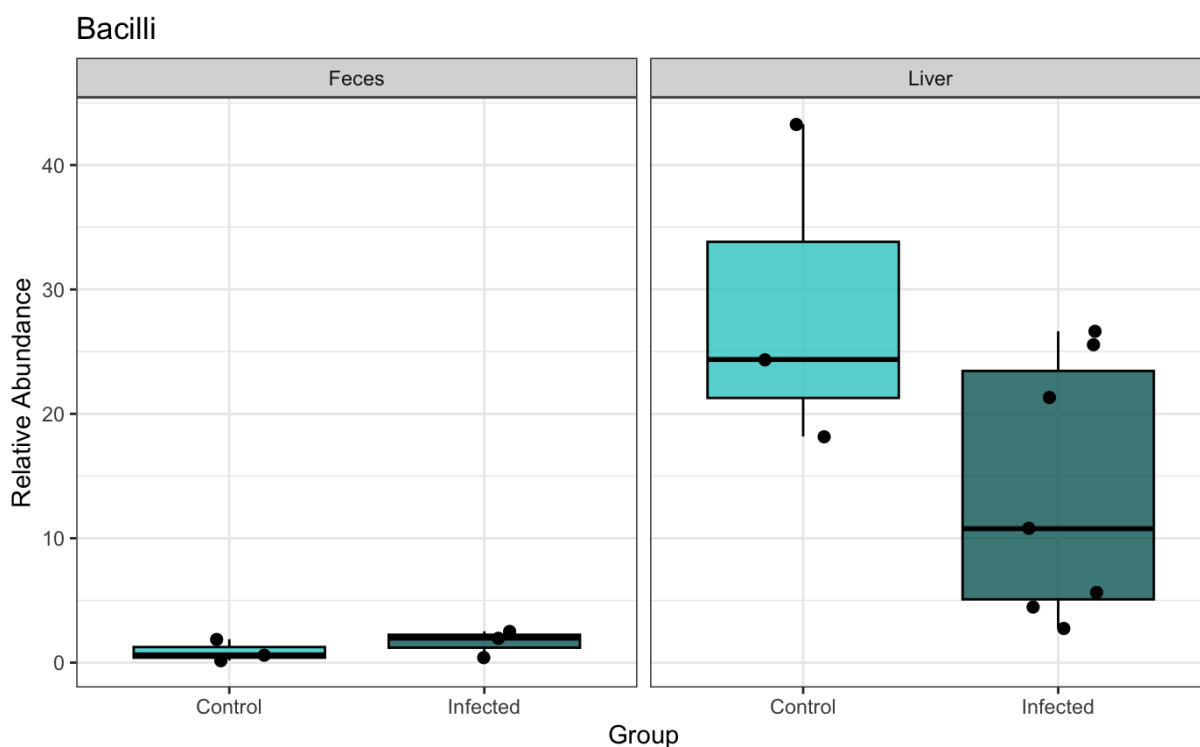
Nas amostras de fezes, observamos que, no nível de classe, as comunidades microbianas intestinais predominantes foram *Bacteroidia* (filo *Bacteroidetes*) e

*Clostridia* (filo *Firmicutes*), onde observa-se que a infecção favorece a abundância relativa de *Bacteroidia* enquanto limita a abundância de *Clostridia*.

Nas amostras de fígado, as classes predominantes incluem *Actinobacteria*, *Alphaproteobacteria*, *Bacilli*, *Bacteroidia*, *Clostridia*, *Desulfovibrionia* e *Gammaproteobacteria*. Notavelmente, a classe *Gammaproteobacteria* está presente em uma proporção significativa no fígado de animais infectados. Observa-se uma maior diversidade de classes bacterianas comparado às amostras de fezes. Assim, a infecção parece ter um impacto na composição bacteriana do fígado, com uma mudança significativa na presença de diferentes classes bacterianas, sugerindo um impacto potencial no desenvolvimento da esquistossomose e na resposta imunológica.

Com base nesses gráficos, as seguintes classes se destacaram por estarem diferencialmente abundantes: *Bacilli*, *Bacteroidia*, *Clostridia* e *Gammaproteobacteria*. Essas classes foram plotadas individualmente e submetidas a análises estatísticas e os resultados estão nas Figuras 21, 22, 23 e 24:

Figura 21 - Análises de abundância relativa da classe *Bacilli* de amostras de fezes e fígado de camundongos não-infectados e co-infectados com *S. mansoni* e *E. coli*

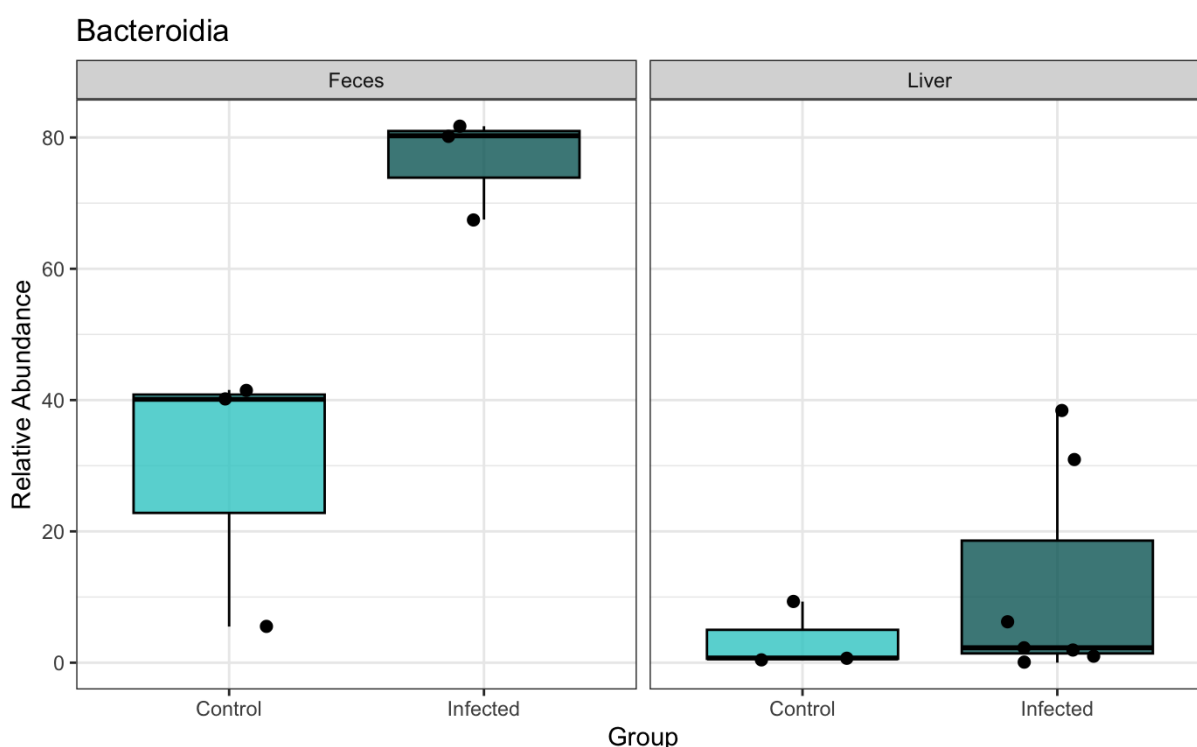


Tanto os grupos controle quanto infectado nas fezes mostram baixa abundância relativa de *Bacilli*, pois a mediana da abundância relativa está próxima de zero para ambos os grupos.

Em relação ao fígado, há uma diferença notável, porém sem significância estatística ( $p = 0,178$ ) na abundância relativa de *Bacilli* entre os grupos controle e infectado, sendo que o grupo controle tem uma mediana da abundância relativa maior que no grupo infectado.

A baixa abundância de *Bacilli* nas fezes em ambos os grupos, controle e infectado, pode sugerir que *Bacilli*, como um componente do microbioma fecal, pode ser efetivamente regulado neste ambiente e não há alteração com a infecção. A maior e mais variável abundância relativa de *Bacilli* no fígado pode indicar uma perturbação da população microbiana normal devido à infecção.

Figura 22 - Análises de abundância relativa da classe *Bacteroidia* de amostras de fezes e fígado de camundongos não-infectados e co-infectados com *S. mansoni* e *E. coli*

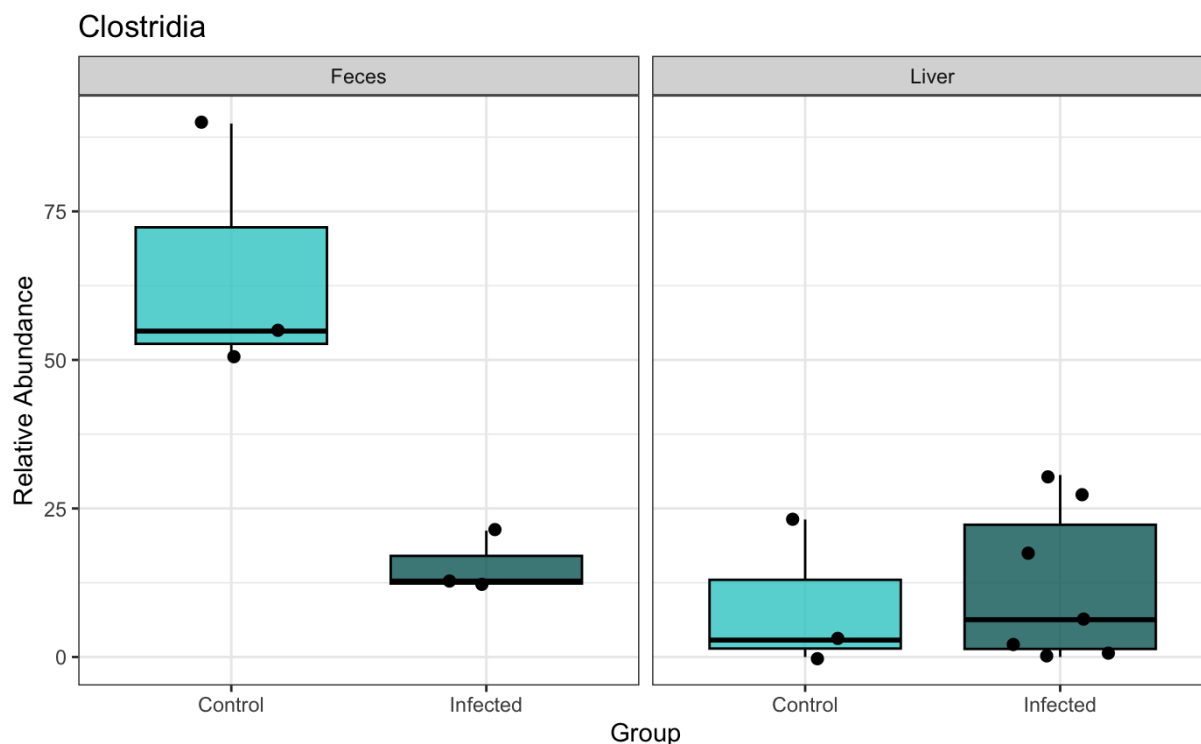


Analisando esta classe nas fezes, observa-se que o grupo controle apresenta uma abundância relativa de *Bacteroidia* variada, com uma mediana em torno de 40%. O grupo infectado mostra uma abundância relativa de *Bacteroidia* significativamente

maior ( $p < 0,05$ ), com valores concentrados em torno de 80% ( $p = 0,0427$ ), indicando que a infecção por *S. mansoni* provocou o aumento desta classe pertencente ao filo *Bacteroidetes*. A abundância relativa de *Bacteroidia* no fígado é baixa para ambos os grupos, controle e infectado, sendo que no controle é próxima de zero.

Vários estudos demonstram que a abundância relativa de filos e famílias dominantes mostra variação notável durante os processos infecciosos. A exposição à cercárias de *S. japonicum* e *S. mansoni* geralmente está relacionada a um aumento relativo de *Bacteroidetes* e *Proteobacteria* nas fezes em comparação com camundongos não tratados (Jenkins *et al.*, 2018; ZHAO *et al.*, 2019; Zamani *et al.*, 2020; Zafar; Saier Jr., 2021; Zhou *et al.*, 2022). No entanto, Zhao e colaboradores (2019) notaram uma alteração nas comunidades microbianas intestinais em resposta ao tratamento com *S. japonicum*, que é mais proeminente em camundongos C57BL/6 do que em BALB/c. Isso demonstra que há uma diferença considerável no microbioma intestinal entre as duas linhagens de camundongos após a infecção, sendo este um fato que deve ser também levado em consideração ao avaliar os resultados do presente estudo.

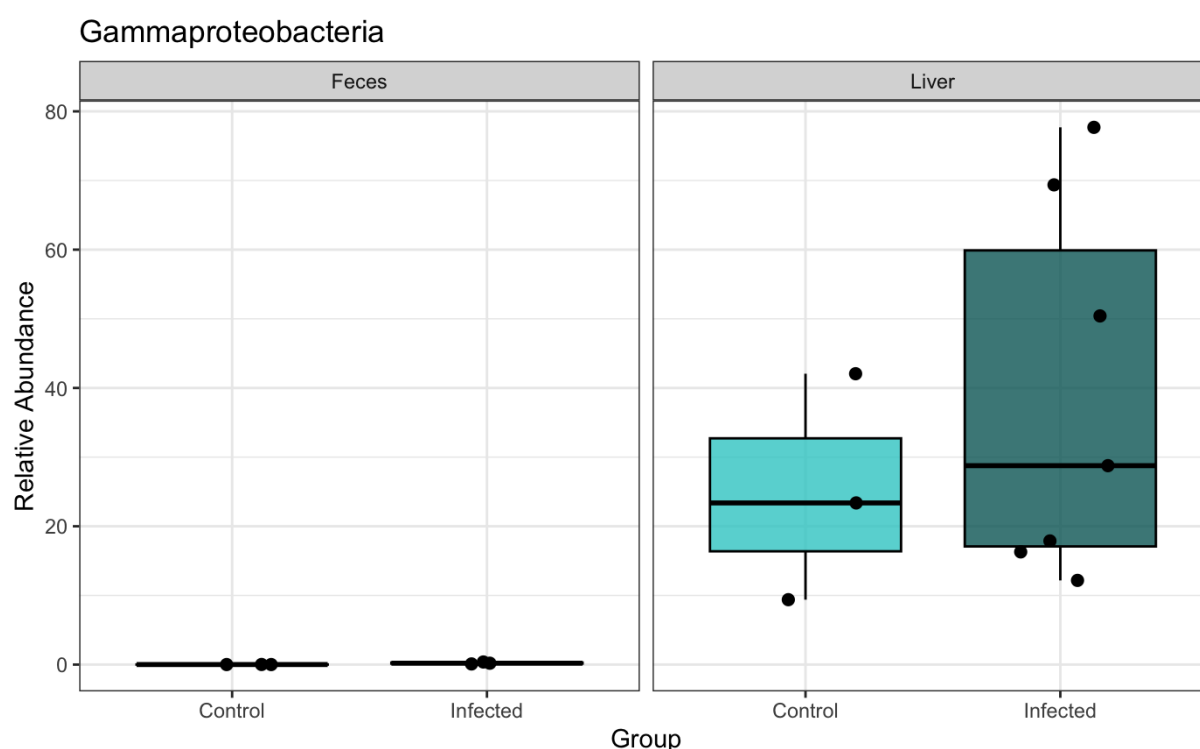
Figura 23 - Análises de abundância relativa da classe *Clostridia* de amostras de fezes e fígado de camundongos não-infectados e co-infectados com *S. mansoni* e *E. coli*



O grupo controle para as fezes apresenta uma alta abundância relativa de *Clostridia*, com uma mediana em torno de 50%. Já o grupo infectado mostra uma abundância relativa de *Clostridia* menor, com valores concentrados em torno de 10% ( $p = 0,503$ ).

A abundância relativa de *Clostridia* no fígado é baixa para ambos os grupos. No grupo controle, a mediana é próxima de zero, com pouca variação e alguns pontos individuais ligeiramente acima de zero. O grupo infectado mostra uma maior variação na abundância relativa de *Clostridia*, com uma mediana mais alta do que no grupo controle, mas ainda assim baixa em comparação com as fezes.

Figura 24 - Análises de abundância relativa da classe *Gammaproteobacteria* de amostras de fezes e fígado de camundongos não-infectados e co-infectados com *S. mansoni* e *E. coli*



Nos grupos Controle e Infectado das amostras de fezes não há abundância relativa de *Gammaproteobacteria*. Nas amostras de fígado, a abundância relativa de *Gammaproteobacteria* é maior no fígado do grupo infectado, porém sem significância estatística ( $p = 0,517$ ).



Diante destes resultados apresentados, observa-se que as microbiotas de fezes e fígado sofreram algumas variações, principalmente foram notadas alterações na abundância relativa de algumas classes de bactérias. É importante salientar que este trabalho focou na fase aguda da esquistossomose, portanto as alterações estão em fase inicial. O avanço das modificações na microbiota fecal de acordo com a fase da patologia da esquistossomose foi documentada no estudo de Zhou e colaboradores (2023), onde estes autores comprovaram que a microbiota intestinal e os metabólitos foram alterados em pacientes com diferentes estágios de infecção por *S. japonicum*. Comparado com o grupo de controle saudável, a diversidade microbiana intestinal em pacientes com infecção crônica por *S. japonicum* foi significativamente reduzida. Conforme a doença progrediu, *Firmicutes* foi ainda mais reduzido em pacientes com infecção avançada por *S. japonicum*, enquanto *Proteobacteria* foi ainda mais aumentada. Além disso, os metabólitos mais alterados em pacientes com infecção por *S. japonicum* foram lipídios e moléculas semelhantes a lipídios, bem como compostos organo-heterocíclicos, correlacionados com as manifestações clínicas e o progresso da doença da esquistossomose.

É notável que, no presente estudo, nas fezes, houve um desequilíbrio entre as classes *Bacteroidia*, pertencente ao filo *Bacteroidetes* e *Clostridia*, provindos do filo *Firmicutes*, sendo que a infecção provocou, já na fase aguda, um aumento estatisticamente diferente ( $p = 0,0427$ ) de *Bacteroidetes* e diminuição de *Firmicutes*.

Os resultados aqui apresentados estão de acordo com a pesquisa conduzida por Schneeberger *et al.* (2018), com amostras de fezes de 34 crianças pré-escolares na Costa do Marfim infectadas por *S. mansoni* e tratadas com praziquantel (60 mg/kg), onde foi relatado que nem a infecção por *S. mansoni* nem a administração de praziquantel desencadearam um efeito significativo na composição microbiana, embora algumas modificações sutis no microbioma intestinal tenham sido observadas.

Outros trabalhos observaram mudanças mais significativas na composição da microbiota intestinal do hospedeiro, como este de Jenkins e colaboradores (2018) onde foi relatado que a infecção de camundongos por *S. mansoni* está associada à alterações na composição microbiana que refletem uma disbiose resultante da migração de ovos através da parede intestinal e da formação de granulomas. Em particular, foi observada uma redução geral na diversidade alfa microbiana intestinal, juntamente com um aumento significativo na diversidade beta microbiana caracterizada por populações expandidas de *Akkermansia muciniphila* (filo

*Verrucomicrobia*) e *Lactobacillus* (Filo *Firmicutes*). Muitas das mudanças específicas observadas na microbiota durante a infecção envolvem grupos taxonômicos bacterianos relacionados à regulação imunológica do hospedeiro ou à inflamação, sugerindo que o equilíbrio entre bactérias reguladoras imunológicas e pró-inflamatórias durante a esquistossomose é crucial para determinar tanto o estabelecimento da infecção quanto a gravidade da doença, influenciada pelas respostas imunológicas do hospedeiro.

Não somente no decorrer da esquistossomose, mas alterações e perda de diversidade microbiana no intestino também é mostrada em vários distúrbios intestinais e extraintestinais humanos, incluindo doença inflamatória intestinal, câncer colorretal, doenças hepáticas crônicas, diabetes tipo 2 e asma (Tilg *et al.*, 2018).

Zhao e colaboradores (2019) também observaram que a infecção por *S. japonicum* está conectada com uma diminuição relativa de *Firmicutes* nas fezes em comparação com camundongos não infectados. Em contraste, a exposição à cercária por *S. japonicum* está relacionada a um aumento relativo de *Bacteroidetes* e *Proteobacteria* nas fezes em comparação com camundongos infectados. Também Zhang e colaboradores (2020) observaram que os dados de sua pesquisa indicaram que a diversidade da microbiota intestinal foi reduzida em camundongos com infecção por *S. japonicum* em comparação com camundongos normais. As análises taxonômicas mostraram que a abundância do filo *Firmicutes* diminuiu, enquanto a do filo *Bacteroidetes* aumentou com a infecção.

Uma microbiota alterada, com sobreposição de algumas espécies sobre outras e as associações com doenças é um fato que a ciência vem desvendando a cada dia. Estudos recentes indicam que níveis elevados de *Bacteroides* podem contribuir para o desenvolvimento de tumores colorretais (Zafar; Saier Jr., 2021; Zamani *et al.*, 2020). Esse achado é consistente com o aumento da incidência de câncer colorretal em pacientes com infecção avançada por *S. japonicum* (Almoghrabi; Mzaik; Attar, 2021). À medida que os estudos metagenômicos avançam, a composição da microbiota tem se tornado alvo de novos marcadores para doenças (Liu *et al.*, 2023), como, por exemplo, os *Bacteroides* teriam o potencial de atuar como um marcador de estadiamento para a infecção por *S. japonicum* (Zhou *et al.* 2022) como também podem servir como um marcador potencial para a avaliação do risco de câncer (Zamani *et al.*, 2020).

Na literatura, em um estudo de Hu *et al.* (2020) onde se buscou demonstrar mudanças na estrutura da comunidade do microbioma intestinal durante a progressão da esquistossomose (3, 7, 14, 21, 28 e 42 dias pós-infecção), analisando as interações funcionais entre as bactérias intestinais e a infecção por *S. japonicum* em camundongos BALB/c e as alterações metabólicas dinâmicas do hospedeiro, os resultados mostraram que os metabólitos foram significativamente alterados em diferentes momentos após a infecção. A diminuição da riqueza e da diversidade, bem como a composição diferente da microbiota intestinal, foram observadas no estado infectado quando comparado com o estado não infectado, especialmente no estágio tardio. No nível do filo, as comunidades microbianas intestinais em todas as amostras foram dominadas por *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Proteobacteria* e *Deferribacteres*, enquanto no nível do gênero, *Lactobacillus*, grupo *Lachnospiraceae*, *Bacteroides*, *Staphylococcus* e *Alloprevotella* foram os mais abundantes. Após a infecção, *Roseburia* e *Ruminococcaceae* diminuíram, enquanto *Staphylococcus*, *Alistipes* e *Parabacteroides* aumentaram, o que poderia aumentar o risco de infecções. Neste estudo, embora nenhuma diferença significativa tenha sido encontrada no nível do filo, diferenças significativas foram observadas no nível do gênero, e a tendência de mudança de diferentes gêneros do mesmo filo foi consistente no curso da infecção. Estes autores concluíram que, a abundância de algumas bactérias que poderiam produzir Ácidos Graxos de Cadeia Curta (SCFA) foi diminuída, enquanto aquelas de alguns patógenos oportunistas que poderiam aumentar o risco de infecções foram aumentadas.

Na mesma perspectiva de analisar o desenvolvimento da esquistossomose com o tempo de infecção, Zhou *et al.* (2022) descobriram, ao usar a tecnologia de sequenciamento 16S rRNA, que havia diferenças na microbiota intestinal entre pacientes em estágios crônico e avançado por *S. japonicum*. Nos estágios mais avançados da doença, os pacientes apresentaram menor diversidade alfa e maior diversidade beta quando comparados a pacientes com infecção crônica por *S. japonicum*. A proporção de *Bacteroides* no intestino de pacientes com esquistossomose avançada foi maior. Outra observação interessante, neste estudo, foi que as funções da flora em pacientes com infecção crônica por *S. japonicum* são focadas principalmente no ciclo celular e na morte celular, enquanto aquelas em pacientes com infecção mais avançada por *S. japonicum* são focadas principalmente no metabolismo. Neste trabalho, *Escherichia coli* e *Bacteroides fragilis* aumentaram

significativamente em pacientes com infecção avançada por *S. japonicum* em nível de espécie, indicando que a estrutura da microbiota intestinal foi alterada quando a infecção crônica por *S. japonicum* progrediu para infecção avançada. Estes autores concluem que as alterações na microbiota intestinal em diferentes estágios da infecção por *S. japonicum* desempenham um papel potencial na patogênese da transição da infecção crônica para a avançada por *S. japonicum*.

Em um trabalho de Zhang e colaboradores (2020) para explorar a função reguladora da microbiota intestinal na esquistossomose intestinal, eles utilizaram tratamento com antibióticos (Ampicilina, Metronidazol, Neomicina e Vancomicina) e transferência da microbiota intestinal de camundongos normais para infectados para investigar a relação entre a alteração da microbiota intestinal e a progressão patológica da infecção por *S. japonicum*. Eles perceberam que estas intervenções atenuaram as respostas patológicas intestinais. A depleção da microbiota intestinal por antibióticos ou a transferência da microbiota intestinal de camundongos normais para infectados diminuiu os níveis de IL-4, IL-5 e IL-13 e promoveu a produção de citocinas e níveis de IL-10 e TGF- $\beta$  em camundongos infectados. Eles concluíram que existem potenciais associações entre a microbiota intestinal, respostas imunes e lesões patológicas no contexto da esquistossomose intestinal.

Em relação aos resultados do presente trabalho do sequenciamento 16S rRNA no fígado, observa-se a presença da classe *Gammaproteobacteria* (Filo *Proteobacteria*) no grupo infectado. À este filo pertencem *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Salmonella typhimurium* e *Pseudomonas aeruginosa*, importantes bactérias já associadas em casos de translocação documentadas na presença da esquistossomose (Lambertucci *et al.*, 1998; Farid; Trabolsi; Hafez, 1984; Lima *et al.*, 2012; Santana *et al.*, 2013; Zhu *et al.*, 2017). No entanto, os desvios observados na comunidade microbiana entre as amostras do fígado, neste estudo, não foram impactantes a nível de gerar variações estatisticamente significativas, muito embora por corresponder à fase aguda da esquistossomose. Porém, estas alterações sinalizam o provável caminho no desenvolvimento para a fase crônica, embora a fase tardia da esquistossomose não era o foco deste estudo. A importância de fixar este estudo na fase aguda baseia-se no objetivo de fornecer uma nova compreensão quanto à associação de medicamentos no tratamento da esquistossomose, que deve ocorrer o mais precocemente possível para evitar os danos causados pela esquistossomose crônica.

Na pesquisa de Lambertucci *et al.* (1998), foi sugerido que lesões inflamatórias hepáticas ao redor de ovos e vermes mortos de *S. mansoni* podem fornecer focos para multiplicação bacteriana. Além disso, a incidência de abscessos hepáticos foi duplicada em um modelo murino de esquistossomose quando os animais foram inoculados com a bactéria 60 dias após a infecção com *S. mansoni*.

Em um recente trabalho de Champion e colaboradores (2023), onde estes autores relatam a primeira evidência da existência de uma microbiota hepática e que abre rotas alternativas para novas estratégias terapêuticas, uma vez que bactérias específicas podem estar envolvidas no processo de fibrose hepática. Estes autores salientam que a microbiota intestinal está envolvida no desenvolvimento de doenças hepáticas, como a fibrose. Neste trabalho foram identificados conjuntos selecionados de DNA bacteriano intestinal e bactérias translocadas para tecidos, principalmente o fígado, para estabelecer uma microbiota tecidual não infecciosa composta de DNA microbiano e bactérias vivas de baixa frequência.

Estas bactérias observadas no fígado, advindas da translocação bacteriana podem se manter com baixa frequência e pouco ou não-infecciosas justificadas por pesquisas que mostraram que, alguns helmintos e artrópodes parasitários têm atividade antibacteriana, liberando produtos antimicrobianos. Notavelmente, descobriu-se que as proteases de cisteína produzidas por *S. mansoni* conferem proteção em um modelo murino de choque séptico mediado por lipopolissacarídeo (LPS) devido à supressão de gatilhos pró-inflamatórios, como óxido nítrico, TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-12 e outros produtos de macrófagos, destacando as propriedades antimicrobianas dos antígenos do esquistossomo. Este estudo, portanto, descreve um novo meio pelo qual os parasitos alteram a função das células imunes inatas e impedem o estabelecimento de potentes respostas inflamatórias induzidas por Th1 que levariam à sua eliminação (Donnelly *et al.* 2010).

Outros autores que pesquisaram a expressão de TLR4 que detecta LPS de bactérias Gram-negativas e TLR2 em células B CD19<sup>+</sup> circulantes em uma coorte de lavadores de carros e pescadores expostos no oeste do Quênia também indicaram que a atividade imunossupressora de *S. mansoni* evoluiu para preservar o estabelecimento do parasito e proteger o hospedeiro durante a exposição da inflamação excessiva que pode se desenvolver pela exposição às imensas cargas de produtos bacterianos translocados decorrentes principalmente da movimentação do ovo (Onguru *et al.* 2011).

De modo similar, em um estudo em crianças em idade escolar que vivem em uma área no Gabão, onde a esquistossomose é endêmica, indicou que os efeitos anti-inflamatórios da esquistossomose são evidentes também em pessoas, porque monócitos e linfócitos de pacientes infectados exibiram responsividade reduzida aos lipopolissacarídeos (LPS) (Van Der Kleij *et al.*, 2004).

Outro exemplo é o da coinfeção com *S. japonicum* e *Salmonella typhimurium*, que foi usado por Zhu *et al.* (2017) como modelo para investigar as respostas metabólicas e imunológicas sistêmicas usando técnicas de metabonômica e imunológicas baseadas em RMN. Os resultados deste trabalho mostram que a infecção por *Salmonella typhimurium* reduziu o número de ovos e vermes adultos e também diminuiu a mortalidade de camundongos infectados por *Schistosoma japonicum*. Além disso, a infecção por *Salmonella typhimurium* neutralizou os distúrbios metabólicos associados à esquistossomose, o que foi refletido pelos níveis revertidos de metabólitos em camundongos coinfectados, em comparação com os camundongos infectados por *Schistosoma japonicum*. Além disso, análises imunológicas também indicaram que a mudança da resposta imune aos diferentes patógenos foi resultado de interações indiretas entre *S. japonicum* e *Salmonella typhimurium* dentro do hospedeiro. Em síntese, conforme afirmam Bajinka e colaboradores (2022) a co-infecção de *Schistosoma* com *Salmonella typhimurium* pode melhorar a esquistossomose nas alterações metabólicas associadas à infecção, uma vez que a resposta imune do hospedeiro é manipulada pela infecção bacteriana secundária e por outro lado, a *Salmonella* pode escapar dos efeitos dos antibióticos por meio da adesão ao *Schistosoma*, podendo se fixar na cutícula externa dos esquistosomas adultos. Nesse estado, são resistentes aos antibióticos por meio de um mecanismo de proteção (Bajinka *et al.*, 2022).

Importante trazer para esta discussão o resultado de Pereira (2021), no qual, pelo resultado de redução da resazurina, foi comprovada a adesão de bactérias em vermes adultos e ovos e as espécies *Escherichia coli* e *Lactococcus gaviae* foram as que apresentaram maior adesão ao parasito e ovos. Neste trabalho também foi detectada a presença e isoladas quatro bactérias no fígado de camundongos BALB-c infectados por *S. mansoni*. As bactérias foram analisadas por MALDI-TOF, obtendo-se o seguinte resultado, de acordo com o *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) – do Filo *Proteobacteria*: *Bordetella hinzii*, *Haemophilus haemolyticus* e *Escherichia coli* e do Filo *Firmicutes*: *Lactococcus garviea*.

Vale ressaltar que os platelmintos do gênero *Schistosoma* possuem duas superfícies epiteliais, o tegumento e a gastroderme, ambas as quais interagem com o hospedeiro durante a evasão imune e na absorção de nutrientes. Em um trabalho de Gobert e colaboradores (2022), onde camundongos ARC Swiss fêmeas (4-6 semanas de idade) foram infectados por via percutânea com cercárias de *Schistosoma japonicum* e posteriormente perfundidos, utilizou-se a técnica de hibridização fluorescente *in situ* (FISH). Usando o DNA total extraído dessas amostras foi possível demonstrar que bactérias estão presentes nas superfícies epiteliais de parasitos adultos, onde gêneros bacterianos específicos, incluindo *Anoxybacillus* e *Escherichia*, foram elevados no tegumento. Essas bactérias associadas à superfície do esquistossomo, que são distintas do microambiente sanguíneo do hospedeiro, devem ser consideradas como um novo e importante componente da interação hospedeiro-esquistossomo.

Embasados principalmente por pesquisas como o de Pereira (2021) e Gobert (2022) que comprovam a associação de bactérias ao ovo e ao parasito *S. mansoni* observa-se que o parasito *S. mansoni* e a deposição maciça de ovos que são carregados até o fígado podem não ser os únicos atores no desenvolvimento da patologia da esquistossomose que, se não tratados, podem avançar até a fase crônica, quando acontece os grandes danos hepáticos como a fibrose e a hipertensão periportal. São os atores principais, mas podem não ser os únicos a atuarem. Levar em consideração o papel que bactérias associadas aos ovos ou aos parasitos pode desempenhar, seja na modulação imunitária, da qual o desfecho da esquistossomose depende fortemente, como também ajudando o parasito no jogo do escape imunológico, dificultando a ação de células de defesa do próprio hospedeiro ou afetando a ação do único medicamento disponível, o Praziquantel.

Conforme observado em um estudo de revisão como o conduzido por Ashour e Othman (2020), parasitos e bactérias têm evoluído junto com a humanidade e se interagem constantemente de diversas maneiras. Por exemplo, algumas infecções bacterianas ocorrem devido a bactérias presentes em parasitos, como a *Salmonella* na esquistossomose, onde esta bactéria pode residir no tegumento e no trato intestinal de todas as espécies de *Schistosoma*, e se tornam focos de multiplicação bacteriana (Muniz-Junqueira *et al.* 2009; Barnhill *et al.* 2011). Em outros casos, há sinergia entre bactérias e parasitos na evolução de doenças humanas, como a interação entre as bactérias endossimbiontes *Wolbachia* e nematoides filariais (Hansen *et al.*, 2011), e

entre bactérias Gram-negativas e *Schistosoma haematobium* na patogênese do câncer de bexiga (Barda *et al.* 2017). Em outros casos, infecções bacterianas secundárias podem complicar doenças parasitárias, como leishmaniose visceral e malária, devido à imunossupressão causada pelo parasito (Pasyar *et al.* 2012).

Segundo estes mesmos autores (Ashour; Othman, 2020) parasitos, incluindo helmintos, protozoários e artrópodes, interagem na maior parte do tempo com bactérias, direta ou indiretamente, de várias maneiras possíveis. Essa interação pode ser benéfica ou, ocasionalmente, prejudicial para um ou ambos os tipos de patógenos. Em contraste, para o hospedeiro humano, a interação parasito-bactéria é frequentemente prejudicial, mas pode, ocasionalmente, ser benéfica, como no uso de bactérias probióticas para modular infecções parasitárias (Chen *et al.*, 2024). A elucidação da extensão e do significado dessa interação, bem como dos mecanismos subjacentes, pode ser traduzida na melhor compreensão da biologia do parasito e melhor gerenciamento de casos clínicos também.

Compreender a dinâmica de como ocorrem estas inter-relações parasito-bactéria-hospedeiro pode cooperar com os esforços para a prevenção e tratamento de uma série de doenças infecciosas e, além disso, estudos futuros que busquem a identificação da base molecular destas interações pode revelar novos alvos de medicamentos para terapia de ambos os tipos de patógenos (Ashour; Othman, 2020).

Com base nos resultados apresentados, este estudo busca contribuir com *insights* sobre como a associação de antibióticos ao tratamento convencional da esquistossomose – Praziquantel – pode ter influenciado, de maneira positiva ou negativa, o desenvolvimento da doença (Capítulo 1), onde a associação de Praziquantel com Doxiciclina e Gentamicina foi capaz de alterar a modulação do processo granulomatoso, sendo que a Doxiciclina agravou a inflamação associada ao processo granulomatoso e a Gentamicina acelerou a resolução da esquistossomose em modelo experimental de infecção aguda por *S. mansoni*. Desta forma, espera-se que este trabalho contribua para novos estudos que busquem novas abordagens para o tratamento desta doença negligenciada, levando-se também em consideração as populações de bactérias com papéis ativos nas complexas interações hospedeiro-parasito-microbiota.



## 6 CONCLUSÕES

A análise histopatológica do intestino dos grupos experimentais demonstrou que os granulomas que se desenvolveram em torno de ovos maduros no intestino apresentavam uma combinação de proliferação e características exsudativas, acompanhadas por um infiltrado extenso de células inflamatórias e que a estrutura básica da mucosa colônica é danificada pelos granulomas induzidos por ovos.

Analisando-se a contagem do número de granulomas intestinais, a área percentual ocupada por estes, a contagem de células polimorfonucleares e mononucleares não foram observadas diferenças estatísticas significantes entre os grupos experimentais.

Em relação à composição da microbiota intestinal, durante a fase aguda da esquistossomose em camundongos BALB/c, utilizando técnicas de Sequenciamento de 16S rRNA observou-se que, nas amostras de fezes, no nível de classe, as comunidades microbianas intestinais predominantes foram *Bacteroidia* (filó *Bacteroidetes*) e *Clostridia* (filó *Firmicutes*), onde observa-se que a infecção provocou um aumento significativo ( $p=0,0427$ ) na abundância relativa de *Bacteroidia* (filó *Bacteroidetes*) enquanto diminuiu a abundância de *Clostridia* (filó *Firmicutes*).

Analisando-se as métricas para estudo de diversidade (Shannon), riqueza total (Chao1) e uniformidade na distribuição (Evenness), não foram encontradas distinções estatisticamente diferentes na comunidade microbiana entre as amostras analisadas.

Foram notadas algumas variações leves na composição bacteriana hepática, como a presença da classe *Gammaproteobacteria*, à qual pertencem importantes bactérias associadas ao *S. mansoni* e à translocação bacteriana tais como: *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Salmonella typhimurium* e *Pseudomonas aeruginosa*.

## REFERÊNCIAS

- ABATH, F. G. C. *et al.* Immunopathogenic mechanisms in schistosomiasis: what can be learnt from human studies? **Trends in Parasitology**, v. 22, n. 2, p. 85-91, 2006.
- AGHAMOHAMMAD, S.; MAHDI, R. Antibiotic resistance and the alternatives to conventional antibiotics: The role of probiotics and microbiota in combating antimicrobial resistance. **Microbiological Research**, v. 267, p. 127275, 2023. doi:10.1016/j.micres.2022.127275.
- AHLER, E. *et al.* Doxycycline alters metabolism and proliferation of human cell lines. **PLoS One**, v. 31, n. 8, 2013. doi: 10.1371/journal.pone.0064561.
- AHMED, W. *et al.* Detection of virulence genes in Escherichia coli of an existing metabolic fingerprint database to predict the sources of pathogenic E. coli in surface waters. **Water Research**, v. 41, n. 16, p. 3785-3791, 2007.
- ALMEIDA, Raquel das Neves. **Caracterização do papel do sistema de secreção do tipo VI bacteriano sobre a resposta imunológica inata de células de mamíferos infectados por *Escherichia coli***. 2016. 91 f., il. Dissertação (Mestrado em Biologia Molecular) - Universidade de Brasília, Brasília, DF, 2016.
- ALMOGHRABI, A.; MZAIK, O.; ATTAR, B. *Schistosoma japonicum* associated with colorectal cancer. **ACG Case Reports Journal**, v. 8, n. 5, p. e00572, 2021.
- ALTSCHUL *et al.* Basic local alignment search tool. **J. Mol. Biol.**, v. 215, n. 3, p. 403-410, 1990.
- ÁLVAREZ, J. *et al.* Gut microbes and health. **Gastroenterologia y Hepatología** v. 44, n. 7, p. 519-535, 2021 doi:10.1016/j.gastrohep.2021.01.009.
- ALVES, L. de F. *et al.* Metagenomic approaches for understanding new concepts in microbial science. **International Journal of Genomics**, v. 2018, p. 1–15, 2018.
- AMARAL, K. B. *et al.* Histological assessment of granulomas in natural and experimental *Schistosoma mansoni* infections using whole slide imaging. **PloS One**, v. 1, p. 1-20, 2017.
- ANDRADE, Z. A. A patologia da esquistossomose humana. In: CARVALHO, O. S.; COELHO, P. M. Z.; LENZI, H. L. (Org.) **Schistosoma mansoni e esquistossomose: uma visão multidisciplinar** [online]. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2008. p. 546-568.
- ANDREWS, P. D. J.; DYCKA, J.; FRANK, G. Effect of praziquantel on clinical-chemical parameters in healthy and schistosome-infected mice. **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, v. 74, n. 2, p. 167-177, 1980. doi:10.1080/00034983.1980.11687327.

ANTUNES, L. C. *et al.* Effect of antibiotic treatment on the intestinal metabolome. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 55, n.4, p. 1494-503, 2011. doi: 10.1128/AAC.01664-10

APAER, S. *et al.* Subcutaneous inoculation of *Echinococcus multilocularis* induces delayed regeneration after partial hepatectomy. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1-11, 2019.

ARAÚJO, N. *et al.* Oxamniquine, praziquantel and lovastatin association in the experimental Schistosomiasis mansoni. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 103, p. 450-454, 2008.

ARAÚJO, M. P. de. **Análise da microbiota em fase aguda da esquistossomose hepática e intestinal e a possível interação de espécies de *Schistosoma* e bactérias**. 2021. 99 f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Curso de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2021.

ARAÚJO FIUZA, J. *et al.* The role of environmental enteric dysfunction in the pathogenesis of *Schistosoma mansoni*-associated morbidity in school-aged children. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 16, n. 10, p. e0010837, 2022. doi:10.1371/journal.pntd.0010837.

ARBOLEYA, S. *et al.* Intestinal microbiota development in preterm neonates and effect of perinatal antibiotics. **The Journal of Pediatrics**, v. 166, n. 3, p. 538-544, 2015.

ASHOUR, D. S.; OTHMAN, A. A. Parasite–bacteria interrelationship. **Parasitol. Res.**, v. 119, p. 3145–3164, 2020. <https://doi.org/10.1007/s00436-020-06804-2>.

AYRES, J. S.; TRINIDAD, N. J.; VANCE, R. E. Lethal inflammasome activation by a multidrug-resistant pathobiont upon antibiotic disruption of the microbiota. **Nat. Med.**, v. 18, p. 799–806, 2012.

BAJINKA, O. *et al.* Pathogenicity of *Salmonella* during *Schistosoma*-*Salmonella* co-infections and the importance of the gut microbiota. **Current Microbiology**, v. 79, p. 1-10, 2022.

BAPTISTA, A. P.; ANDRADE, Z. A. Angiogenesis and schistosomal granuloma formation. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 100, n. 2, p. 183-1855, 2005.

BARDA, B. *et al.* Ultrasonographic evaluation of urinary tract morbidity in school-aged and preschool-aged children infected with *Schistosoma haematobium* and its evolution after praziquantel treatment: a randomized controlled trial. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 2, p. e0005400, 2017.

BARNHILL, A. E. *et al.* Schistosoma-associated Salmonella resist antibiotics via specific fimbrial attachments to the flatworm. **Parasites & Vectors**, v. 4, p. 1-8, 2011.

BÉLANGER, L. *et al.* *Escherichia coli* from animal reservoirs as a potential source of human extraintestinal pathogenic *E. coli*. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, v. 62, n.1, p. 1-10, 2011.

BERG, R. D. Bacterial translocation from the gastrointestinal tract. **Trends Microbiol.**, v. 3, p. 149-154, 1995.

BERGQUIST, R.; ELMORSHEDY, H. Artemether and praziquantel: origin, mode of action, impact, and suggested application for effective control of human schistosomiasis. **Tropical Medicine and Infectious Disease**, v. 3, n. 4, p. 125, 2018.

BEZIRTZOGLU, E.; ALEXOPOULOS, A.; VOIDAROU, C. **Microbial Ecology in Health and Disease**, v. 20, n. 4, p. 197-198, 2008.

BODE, C. *et al.* Antibiotics regulate the immune response in both presence and absence of lipopolysaccharide through modulation of Toll-like receptors, cytokine production and phagocytosis in vitro. **International Immunopharmacology**, v. 18, p. 27-34, 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. **Vigilância da esquistossomose mansônica**: diretrizes técnicas. 4. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2014.

BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Coordenação-Geral de Desenvolvimento da Epidemiologia. **Guia de vigilância em saúde**. 3. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2019.

BUFFIE, C. G. *et al.* Profound alterations of intestinal microbiota following a single dose of clindamycin results in sustained susceptibility to *Clostridium difficile*-induced colitis. **Infect. Immun.**, v. 80, p. 62-73, 2012.

BURKE, M. L. Immunopathogenesis of human schistosomiasis. **Parasite Immunol.**, v. 31, p. 163-176, 2009. doi: 10.1111/j.1365-3024.2009.01098.x.

CARVALHO, F. A. *et al.* Transient inability to manage proteobacteria promotes chronic gut inflammation in TLR5-deficient mice. **Cell Host Microbe**, v. 12, p. 139-152, 2012.

CASTRO, M. M. *et al.* Matrix metalloproteinase inhibitor properties of tetracyclines: therapeutic potential in cardiovascular diseases. **Pharmacol. Res.**, v. 64, p. 551-560, 2011.

CHAMPION, C. *et al.* Human liver microbiota modeling strategy at the early onset of fibrosis. **BMC Microbiology**, v. 23, n. 1, p. 34, 2023.

CHANCHAROENTHANA, W. *et al.* The leaky gut and the gut microbiome in sepsis - targets in research and treatment. **Clinical Science**, v. 137, n. 8, p. 645-662, 2023. doi:10.1042/CS20220777.

CHAO, A. Nonparametric estimation of the number of classes in a population. **Scandinavian Journal of Statistics**, v.11, n.4, p. 265-270, 1984.

CHAVES, B. J.; TADI, P. **Gentamicin**. Treasure Island/FL: StatPearls, 2022.

CHAYÉ, M. A. M et al. *Schistosoma mansoni* egg-derived thioredoxin and Sm14 drive the development of IL-10 producing regulatory B cells. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 17, n. 6, p. e0011344, 2023.

CHEN, X. et al. Gut dysbiosis induces the development of pre-eclampsia through bacterial translocation. **Gut**, v. 69, n. 3, p. 513-522, 2020. doi:10.1136/gutjnl-2019-319101.

CHEN, H. et al. Metagenomic analysis of the intestinal microbiome reveals the potential mechanism involved in *Bacillus Amyloliquefaciens* in treating schistosomiasis japonica in mice. **Microbiology Spectrum**, v. 12, n. 4, p. e0373523, 2024.

CHIARAMONTE, M. G. et al. Studies of murine schistosomiasis reveal interleukin-13 blockade as a treatment for established and progressive liver fibrosis. **Hepatology**, v. 34, n. 2, p. 273-282, 2001.

CHISSOCA, António Ribeiro Chissululo. **Influência da microbiota intestinal nas propriedades imunológicas de uma vacina recombinante**. 2016. 105 p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia e Biociências) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, 2016.

CINOVA, J. et al. Role of intestinal bacteria in gliadin-induced changes in intestinal mucosa: study in germ-free rats. **PLoS One**, v. 6, p. e16169, 2011.

CLYDE, D. F.; GILMAN, R. H.; MCCARTHY, V. C. Antimalarial effects of clindamycin in man. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 24, n. 2, p. 369–370, 1975.

COBURN, B.; GUTTMAN, D. S. The human microbiome. **CMAJ**, v. 187, p. 825, 2015.

COCK, P.J. A et al. Biopython: freely available Python tools for computational molecular biology and bioinformatics. **Bioinformatics**, v. 25, n. 11, p. 1422–1423, 2009.

CORTÉS, A. et al. Baseline gut microbiota composition is associated with *Schistosoma mansoni* infection burden in rodent models. **Frontiers in Immunology**, v. 11, p. 593838, 2020.

CORTÉS-HERNÁNDEZ, A. et al. Highly purified alloantigen-specific tregs from healthy and chronic kidney disease patients can be long-term expanded, maintaining a suppressive phenotype and function in the presence of inflammatory cytokines. **Frontiers in Immunology**, v. 12, p. 686530, 2021.

COSTAIN, A. H.; MACDONALD, A. S.; SMITS, H. H. Schistosome egg migration: mechanisms, pathogenesis and host immune responses. **Frontiers in Immunology**, v. 20, n. 9, p. 3042, 2018. doi: 10.3389/fimmu.2018.03042.

COUTINHO, E. M. Patologia da esquistossomíase na má-nutrição: uma visão abrangente. *In*: CARVALHO, O. S.; COELHO, P. M. Z.; LENZI, H. L., (Org.). **Schistosoma mansoni e esquistossomose**: uma visão multidisciplinar [online]. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2008. p. 655-685. ISBN 978- 85-7541-370-8.

CUNHA, B. A. Minocycline versus doxycycline in the treatment of lyme neuroborreliosis. **Clin. Infect. Dis.**, v. 30, p. 237-238, 2000.

DAVENPORT, E. R. *et al.* The human microbiome in evolution. **BMC Biol.**, v. 15, p. 127, 2017.

DAVID, L. A. *et al.* Host lifestyle affects human microbiota on daily timescales. **Genome biology**, v. 15, n. 7, p. R89, 2014.

DAVIS, A. Schistosomiasis. *In*: COOK, G. C.; ZUMLA, A. I. (Org.). **Manson's Tropical Diseases**. Saunders: Elsevier, 2009. p.1425–1460.

DE LA FUENTE, M. *et al.* *Escherichia coli* isolates from inflammatory bowel diseases patients survive in macrophages and activate NLRP3 inflammasome. **Int. J. Med. Microbiol.**, v. 304, p. 384–392, 2014.

DESANTIS, T. Z. *et al.* Greengenes, a Chimera-Checked 16S rRNA Gene Database and Workbench Compatible with ARB. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 72, n. 7, p. 5069-5072, 2006.

DESIDÉRIO, J. A. **Tópicos especiais em genética aplicada**. Jaboticabal: Funep, 2022. v. 7.

DIAS, M. V. *et al.*, Doxycycline hyclate: a schistosomicidal agent in vitro with immunomodulatory potential on granulomatous inflammation in vivo. **International Immunopharmacology**. v. 70, p. 324-337, 2019.

DICKSVED, J. *et al.* Susceptibility to *Campylobacter* infection is associated with the species composition of the human fecal microbiota. **MBio.**, v. 5, p. e01212–e01214, 2014.

DOENHOFF, M. J., *et al.* Resistance of *Schistosoma mansoni* to praziquantel: is there a problem? **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 96, p. 465-469, 2002

DOENHOFF, M. J.; CIOLI, D.; UTZINGER, J. Praziquantel: mechanism of action, resistance and new derivatives for schistosomiasis. **Current Opinion in Infectious Diseases.**, v. 21, p. 659 – 667, 2008.

- DONNELLY, S. *et al.* Helminth cysteine proteases inhibit TRIF-dependent activation of macrophages via degradation of TLR3. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 5, p. 3383-3392, 2010.
- DOS REIS, L. F. C. *et al.* Alternate-day fasting, a high-sucrose/caloric diet and praziquantel treatment influence biochemical and behavioral parameters during *Schistosoma mansoni* infection in male BALB/c mice. **Experimental Parasitology**, v. 240, p. 108316, 2022.
- DOS SANTOS, V. H. B. *et al.* Effects of the probiotic *Bacillus cereus* GM on experimental schistosomiasis mansoni. **Parasitology Research**, v. 123, n. 1, p. 72, 2023. doi:10.1007/s00436-023-08090-0.
- DRAGE, L. K. L. *et al.* Elevated urine IL-10 concentrations associate with *Escherichia coli* persistence in older patients susceptible to recurrent urinary tract infections. **Immunity & Ageing: I & A**, v. 16, 2019. doi:10.1186/s12979-019-0156-9.
- DUARTE, A. F. *et al.* Generalized granuloma annulare: response to doxycycline. **J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.**, v. 23, p. 84-85, 2009.
- DUNCAN, A. W. Aneuploidy, polyploidy and ploidy reversal in the liver. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 24, n. 4, p. 347-356, 2013. doi:10.1016/j.semcdb.2013.01.003.
- EZENWA, V. O. Interactions among host diet, nutritional status and gastrointestinal parasite infection in wild bovids. **Int. J. Parasitol.**, v. 34, p. 535-542, 2004. doi: 10.1016/j.ijpara.2003.11.012.
- FALLANI, M. *et al.* Determinants of the human infant intestinal microbiota after the introduction of first complementary foods in infant samples from five European centres. **Microbiology**, v. 157, p. 1385-1392, 2011.
- FARID, Z.; TRABOLSI, B.; HAFEZ, A. *Escherichia coli* bacteraemia in chronic schistosomiasis. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v. 78, p. 661-662, 1984.
- FERRAZ, A. A. B. *et al.* Modelo de peritonite experimental em camundongos esquistossomóticos. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 8, p. 28-31, 1993.
- FERRAZ, A. A. B. *et al.* Gut bacterial translocation and postoperative infections: a prospective study in schistosomal patients. **Surgical Infections**, v. 6, p. 197-201, 2005.
- FERREIRA, J. M. Febre tifóide. **Revista de Medicina**, v. 38, p. 181-198, 1954.
- FIDELIS, T. A. A., *et al.* *Schistosoma mansoni* granulomas in the skeletal striated muscles in the murine model of neuroschistosomiasis: histological findings. **Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 115, p. e190383, 2020.

FLOUDAS, A.; AVIELLO, G.; SCHWARTZ, C.; *Schistosoma mansoni* worm infection regulates the intestinal microbiota and susceptibility to colitis. **Infect. Immun.**, v. 87, p. e00275-19, 2019.

FORMENTI, F. *et al.* Helminth microbiota profiling using bacterial 16S rRNA gene amplicon sequencing: from sampling to sequence data mining. *In*: DE PABLOS, L. M.; SOTILLO, J. (ed.). Parasite genomics. **Methods in Molecular Biology**. New York: Humana, 2021. [https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1681-9\\_15](https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1681-9_15).

FRANK, D. N. *et al.* Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases. **Proc. Natl. Acad.**, v.104, p.13780–13785, 2007.

FURCH, B. D. *et al.* Contribution of *Schistosoma mansoni* to systemic inflammation and microbial translocation among people with HIV in Zambia. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene** v. 116, n. 2, p. 179-186, 2022. doi:10.1093/trstmh/trab103.

FURRIE, E. A molecular revolution in the study of intestinal microflora. **Gut**, v. 55, n. 2, p. 141-143, 2006. doi:10.1136/gut.2005.081695.

GALIPEAU, H. J. *et al.* Intestinal microbiota modulates gluten-induced immunopathology in humanized mice. **The American Journal of Pathology**, v. 185, n. 11, p. 2969-2982, 2015.

GALVÃO, B. H. A. **Translocação bacteriana em camundongos infectados com *Schistosoma mansoni* submetidos à desnutrição neonatal**. 2014. 120f. Tese (Doutorado em Medicina Tropical) – Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, 2014.

GARRIDO-MESA N.; ZARZUELO A.; GALVEZ J. Minocycline: far beyond na antibiotic. **British Journal of Pharmacology**, v. 26, p. 12139, 2013.

GAYEN, P. *et al.* A double-blind controlled field trial of doxycycline and albendazole in combination for the treatment of bancroftian filariasis in India. **Acta Trop.**, v. 125, p. 150 – 156, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.ijpddr.2014.07.002>.

GENCAY, C. *et al.* Effect of honey on bacterial translocation and intestinal morphology in obstructive jaundice. **World J. Gastroenterol.**, v. 14, n. 21, p. 3410-3415. PubMed PMID: 18528939.

GLENDINNING, L. *et al.* The microbiota and helminths: sharing the same niche in the human host. **Parasitology**, v. 141, n. 10, p. 1255–71, 2014.

GOBERT, G. N. *et al.* Adult schistosomes have an epithelial bacterial population distinct from the surrounding mammalian host blood. **PloS One**, v. 17, n. 1, p. e0263188, 2022. doi:10.1371/journal.pone.0263188.

GOMES, D. S. *et al.* Intestinal schistosomiasis-related mortality in Minas Gerais, Brazil, 2000-2019: Temporal trends and spatial patterns for determining priority



areas. **Trop. Med. Int. Health**, v. 28, n. 3, p. 215-225, 2023. doi:10.1111/tmi.13850.

GOMIDES, T. A. R. *et al.* Expression of SmATPDases 1 and 2 in *Schistosoma mansoni* eggs favours IL-10 production in infected individuals. **Parasite Immunology**, v. 46, n. 1, p. e13017, 2024.

GONÇALVES, R. V. *et al.* Trans-fatty acids aggravate anabolic steroid-induced metabolic disturbances and differential gene expression in muscle, pancreas and adipose tissue. **Life Sciences**, v. 232, p. 116603, 2019.

GONZALEZ F. H. D; SILVA S. C. **Introdução à bioquímica clínica veterinária**. 2 ed. Porto Alegre: Editora da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2006. cap. 8, p. 318-337.

GONZÁLEZ-LIZÁRRAGA, F., *et al.* Repurposing doxycycline for synucleinopathies: remodelling of  $\alpha$ -synuclein oligomers towards non-toxic parallel beta-sheet structured species. **Sci. Rep.**, v. 7, p. 41755, 2017.

GONZÁLES LOZANO, K. J. **Influência da infecção crônica por *Schistosoma mansoni* na resposta à quimioterapia específica contra a infecção experimental aguda por *Trypanosoma cruzi***. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2021.

GOODMAN, Louis Sanford *et al.* **As bases farmacológicas da terapêutica**. 11. ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2007. 1821 p.

GREENWOOD, C. *et al.* Early empiric antibiotic use in preterm infants is associated with lower bacterial diversity and higher relative abundance of Enterobacter. **J. Pediatr.**, v. 165, n. 1, p. 23-29, 2014.

GRIFFIN, M. O. *et al.* Tetracyclines: a pleiotropic family of compounds with promising therapeutic properties. Review of the literature. **Am. J. Physiol. Cell. Physiol.**, v. 299, p. C539-548, 2010.

GRIMAUD, J. A. *et al.* Collagen isotypes, laminin, and fibronectin in granulomas of the liver and intestines of *Schistosoma mansoni*-infected mice. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 37, n. 2, p. 335-344, 1987. doi: 10.4269/ajtmh.1987.37.335

HAMS, E.; AVIELLO, G.; FALLON, P. G. The schistosoma granuloma: friend or foe?. **Front. Immunol.**, v. 4, p. 89, 2013. doi:10.3389/fimmu.2013.00089.

HAN, H.; YAN, H.; KING, K. Y. Broad-spectrum antibiotics deplete bone marrow regulatory T cells. **Cells**, v. 10, n. 2, p. 277, 2021.

HANSEN, R. D. E. *et al.* A worm's best friend: recruitment of neutrophils by *Wolbachia* confounds eosinophil degranulation against the filarial nematode *Onchocerca ochengi*. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 278, n. 1716, p. 2293-2302, 2011.

HAYASHI, H. *et al.* Molecular analysis fecal microbiota in elderly individuals using 16S rRNA library and T-RFLP. **Microbiol. Immuno.**, v. 47, n. 8, p. 557-570, 2003.

HAYES, K. S. *et al.* Exploitation of the intestinal microflora by the parasitic nematode *Trichuris muris*. **Science**, v. 328, p. 1391–1394, 2010. doi: 10.1126/science.1187703.

HEIMESAAT, M. M. *et al.* Gram-negative bacteria aggravate murine small intestinal Th1-type immunopathology following oral infection with *Toxoplasma gondii*. **J Immunol.**, v. 177, p. 8785–8795, 2006.

HOFFMANN, K. F. *et al.* IL-10 and the dangers of immune polarization: excessive Type 1 and Type 2 cytokine responses induce distinct forms of lethal immunopathology in murine Schistosomiasis. **J. Immunol.**, v. 164, n. 12, p. 6406-6416, 2000.

HOLZSCHEITER, M. *et al.* Lack of host gut microbiota alters immune responses and intestinal granuloma formation during schistosomiasis. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 175, p. 246–257, 2014.

HOULDEN, Ashley *et al.* Chronic *Trichuris muris* infection in C57BL/6 mice causes significant changes in host microbiota and metabolome: effects reversed by pathogen clearance. **PloS One**, v. 10, n. 5, p. e0125945, 2015.

HU, Y. *et al.* Alterations of gut microbiome and metabolite profiling in mice infected by *Schistosoma japonicum*. **Frontiers in immunology**, v. 11, p. 569727, 2020. doi:10.3389/fimmu.2020.569727.

IANIRO, G.; TILG H.; GASBARRINI A. Antibiotics as deep modulators of gut microbiota: between good and evil. **Gut**, v. 65, n. 11, p. 1906-1915, 2016. doi:10.1136/gutjnl-2016-312297.

IRHAM, L. M. *et al.* Worldwide publication trends of drug repurposing and drug repositioning in the science of medicine (2003-2022). **Research Journal of Pharmacy and Technology**, v. 16, n. 3, p. 1333-1341, 2023.

JANDA, J. M.; ABBOTT, S. L. 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: pluses, perils, and pitfalls. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, n. 9, p. 2.761–2.764, 2007.

JENKINS, T. P. *et al.* *Schistosoma mansoni* infection is associated with quantitative and qualitative modifications of the mammalian intestinal microbiota. **Scientific Reports**. v. 8, n.1, p. 12072, 2018. doi:10.1038/s41598-018-30412-x.

JEYARAJAH, D. R. *et al.* Impact of bile duct obstruction on hepatic *E. coli* infection: role of IL-10. **Am. J. Physiol. Liver Physiol.**, v. 291, p. G91-G94, 2006.

JONULEIT, H.; SCHMITT, E. The regulatory T cell family: distinct subsets and their interrelations. **J Immunol**. v. 171, n. 12, p. 6323-6327, 2003.

JUNQUEIRA, L. C. U.; COSSERMELLI, W.; BRETANI, R. Differential staining of collagens type I, II and III by Sirius Red and polarization microscopy. **Archives of Histology and Cytology**, v. 41, n. 3, p. 267-274, 1978.

JUSTUS, J. A. Case study in concept determination: ecological diversity. *In*: DOV, M.; GABBAY, P. T.; WOODS, J. (Org.). **Handbook of the philosophy of science: Philosophy of ecology**. San Diego: North Holland, 2011. p. 147-168. ISBN: 978-0-444-51673-2.

KAY, G. L. *et al.* Differences in the faecal microbiome in *Schistosoma haematobium* infected children vs. uninfected children **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 9, p. e0003861, 2015.

KATZ N. Experiência com quimioterapia em grande escala no controle da esquistossomose no Brasil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, n. 22, p. 40-51, 1980.

KATZ, N. **Inquérito nacional de prevalência da esquistossomose mansoni e geo-helminthoses**. Belo Horizonte: Instituto René Rachou, 2018.

KIM, W. R. *et al.* Serum activity of alanine aminotransferase (ALT) as an indicator of health and disease. **Hepatology**, Orlando, v. 47, n. 4, p. 1363-1370, 2008.

KIM, B. R. *et al.* Deciphering diversity indices for a better understanding of microbial communities. **J. Microbiol Biotechnol**, n. 27, v. 12, p. 2089–2093, 2017.

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.

KING, C. H. Toward the elimination of schistosomiasis. **N. Engl. J. Med.**, v. 360, p. 106–109, 2009. doi: 10.1056/NEJMp0808041.

KNOWLES, S. C. L. *et al.* Stability of within-host–parasite communities in a wild mammal system. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 280, n. 1762, p. 20130598, 2013.

KOENIG, J. E. *et al.* Succession of microbial consortia in the developing infant gut microbiome. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 108, n. 1, p. 4578–4585, 2011.

KONSTANTINIDIS, T. Effects of antibiotics on the gut microbiome: a review of the literature. **Biomedicinas**, v. 8, p. 11, p. 502, 2020. Doi: 10.3390 / biomedicines811.

LAMBERTUCCI, J. R. *et al.* Liver abscess and schistosomiasis: A new association. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 23, p. 239-240, 1990.

LAMBERTUCCI, J. R. *et al.* Schistosomiasis and associated infections. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 93, p. 135-139, 1998.

LAMBERTUCCI, J. R. Revisiting the concept of hepatosplenic schistosomiasis and its challenges using traditional and new tools. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 47, n. 2, p. 130-136, 2014.

LANGE, K. *et al.* Effects of antibiotics on gut microbiota. **Digestive diseases (Basel, Switzerland)**, v. 34, n. 3, p. 260-268, 2016. doi:10.1159/000443360.

LEAL, O. *et al.* Resposta clínico-parasitológica ao tratamento com quinino associado à doxiciclina em casos de malária falciparum não-complicada. **Revista Da Sociedade Brasileira De Medicina Tropical**, v. 36, n. 6, p. 751–754, 2003.

LEE, S. C. *et al.* Helminth colonization is associated with increased diversity of the gut microbiota. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 8, n. 5, p. e2880, 2014.

LEGENDRE, P.; LEGENDRE, L. **Ecologia numérica**. 3. ed. Amsterdã: Elsevier, 2012.

LEI, Y. M. K.; NAIR, L.; ALEGRE, M. The interplay between the intestinal microbiota and the immune system. **Clinics and Research in Hepatology and Gastroenterology**, v. 39, n. 1, p. 9-19, 2015.

LENZI, H. L. *et al.* Histoarchitecture of schistosomal granuloma development and involution: morphogenetic and biomechanical approaches. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 93, n. 1, p. 141-51, 1998. doi:10.1590/s0074-02761998000700020.

LENZI, H. L. *et al.* Patologia Experimental com enfoque no granuloma esquistosomótico. *In*: COELHO, P. M. Z.; LENZI, H. L. (Org.). **Schistosoma mansoni & esquistossomose: uma visão multidisciplinar**. Rio de Janeiro: Ed. Fiocruz, 2008a. p. 569-654.

LENZI, H. L. *et al.* Migração e desenvolvimento de *Schistosoma mansoni* no hospedeiro definitivo. *In*: CARVALHO, O. S.; COELHO, P. M. Z.; LENZI, H. L. (Org.). **Schistosoma mansoni e esquistossomose: uma visão multidisciplinar** [online]. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2008b. p. 85-145. ISBN 978-85-7541-370-8.

LEMA, N. K.; GEMEDA, M. T.; WOLDESEMAYAT, A. A. Recent advances in metagenomic approaches, applications, and challenges. **Curr. Microbiol.**, v. 80, n. 347, 2023.

LEUNG, J. M.; GRAHAM, A. L.; KNOWLES, S. C. L. Parasite-microbiota interactions with the vertebrate gut: synthesis through an ecological lens. **Front. Microbiol.**, v. 9, p. 843, 2018. doi:10.3389/fmicb.2018.00843.

LEVY, S. E.; MYERS, R. M. Advancements in Next-Generation Sequencing. **Annual Review of Genomics and Human Genetics**, v. 17, n. 1, p. 95–115, 2016.

LEVY, M. *et al.* Dysbiosis and the immune system. **Nature Reviews Immunology**, v. 17, n. 4, p. 219, 2017.

LI, D. *et al.* The gut microbiota: A treasure for human health. **Biotechnol. Adv.**, v. 34, p. 1210-1224, 2016.

LI, H. L. *et al.* Effect of Doxycycline on intrinsic apoptosis of myeloma cell line H929 and its mechanism. **Journal of Experimental Hematology**, v. 6, p. 441-448, 2022.

LI, J. *et al.* Gentamicin promoted the production of CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Tregs via the STAT5 signaling pathway in mice sepsis. **BMC Immunology**, v. 23, n. 1, p. 47, 2022.

LI, Z. *et al.* Gut microbiota and liver fibrosis: one potential biomarker for predicting liver fibrosis. **BioMed Research International**, v. 2020, n. 1, p. 3905130, 2020.

LICÁ, I. C. L. *et al.* Immunological mechanisms involved in macrophage activation and polarization in schistosomiasis. **Parasitology**, v. 150, n. 5, p. 401-415, 2023. doi:10.1017/S0031182023000021.

LIMA, K. M. *et al.* Fatores que influenciam a translocação bacteriana em camundongos com esquistossomose crônica. **Acta Gastroenterológica Latinoamericana**, v. 42, n. 4, p. 309-320, 2012.

LIMA, K. *et al.* Post-splenectomy infections in chronic schistosomiasis as a consequence of bacterial translocation. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 48, p. 314–320, 2015.

LIMA, K. M.; TELES, R. B.; CASTRO C. M. Schistosomiasis mansoni and bacterial translocation: Is there an association? **Brazilian Journal of Clinical Analyses**, v. 48, n. 2, p. 110-117, 2016.

LINARES, D. M.; ROSS, P.; STANTON, C. Beneficial Microbes: The pharmacy in the gut. **Bioengineered**, v. 7, p. 11-20, 2016.

LINS, R. A. B. *et al.* Distribution of eosinophils at different stages of hepatic granuloma evolution in mice infected with *Schistosoma mansoni*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.**, v. 41, n. 2, p. 173-178, 2008. doi:10.1590/s0037-86822008000200008.

LIU, J. *et al.* Metagenomic sequencing for identifying pathogen-specific circulating DNAs and development of diagnostic methods for schistosomiasis. **Iscience**, v. 26, n. 9, 2023.

LLANWARNE, F; HELMBY, H. Granuloma formation and tissue pathology in *Schistosoma japonicum* versus *Schistosoma mansoni* infections. **Parasite Immunol.**, v. 43, p. e12778, 2021.

LUPP, C. *et al.* Host-mediated inflammation disrupts the intestinal microbiota and promotes the overgrowth of Enterobacteriaceae. **Cell Host Microbe**, v. 2, p.119–129, 2007.

MACFIE J. Current status of bacterial translocation as a cause of surgical sepsis. **Br. Med. Bull.**, v. 71, p. 1-11, 2004.

MACFIE, J. Enteral Versus Parenteral Nutrition: the significance of bacterial translocation and gut-barrier function. **Nutrition**, v. 16, p. 606-611, 2000.

MALTA, K. K. *et al.* Schistosomiasis mansoni-recruited eosinophils: An overview in the granuloma context. **Microorganisms**, v. 10, n. 10, p. 2022, 2022.

MANSOUR, S.; ASRAR, T.; ELHENAWY, W. The multifaceted virulence of adherent-invasive *Escherichia coli*, **Gut Microbes**, v. 15, n. 1, 2023. DOI: 10.1080/19490976.2023.2172669.

MARCHESI, J. R. *et al.* The gut microbiota and host health: a new clinical frontier. **Gut**, v. 65, p. 330-339, 2016.

MATZARAS, R. *et al.* Gut Microbiota Modulation and Prevention of Dysbiosis as an Alternative Approach to Antimicrobial Resistance: A Narrative Review. **The Yale Journal of Biology and Medicine**, v. 95, n. 4, p. 479-494, 2022. PMCID: PMC9765331.

MAYER, J. U. *et al.* Different populations of CD11b<sup>+</sup> dendritic cells drive Th2 responses in the small intestine and colon. **Nature Communications**, v. 8, n. 1, p. 15820, 2017.

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

MASELLA, A. P. *et al.* PANDAseq: paired-end assembler for illumina sequences. **BMC Bioinformatics**, v. 13, n. 31, 2012.

MIRANDA, V. H. S. *et al.* Liver damage in schistosomiasis is reduced by adipose tissue-derived stem cell therapy after praziquantel treatment. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 14, n. 8, p. e0008635, 2020.

MIZOCK, B. A. Probiotics. **Disease-a-month: DM**, v. 61, n. 7, p. 259-290, 2015.

MIYAUCHI, E. *et al.* The impact of the gut microbiome on extra-intestinal autoimmune diseases. **Nature Reviews Immunology**, v. 23, n. 1, p. 9-23, 2023. Doi:10.1038/s41577-022-00727-y.

MOHAMED, A. H. *et al.* Effect of *Lactobacillus Sporogenes* (Probiotic) on certain parasitological and molecular aspects in *Schistosoma mansoni* infected mice. **Journal of Parasitic Diseases**, v. 40, n. 3, p. 823–832, 2016.

MUNIZ-JUNQUEIRA, M. I. *et al.* Schistosoma-associated chronic septicemic salmonellosis: evolution of knowledge and immunopathogenic mechanisms. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 42, n. 4, 2009.

MUTAPI, F. The gut microbiome in the helminth infected host. **Trends Parasitol.**, v. 31, n. 9, p. 405–406, 2015.

NAABER, P. *et al.* Translocation of indigenous microflora in an experimental model of sepsis. **J. Med. Microbiol.**, v. 1, n. 49, p. 431-439, 2000.

NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH [NIH]. **Guide for the care and use of laboratory animals**, Washington DC: The National Academy Press, 2011.

NAVARRO-TRIVINO, F. J.; PÉREZ-LÓPEZ, I.; RUÍZ-VILLAVERDE, R. Doxiciclina, ¿antibiótico o antiinflamatorio? Usos más frecuentes en dermatología. **Actas Dermosifiliogr.**, v. 111, p. 561-566, 2020.

NAVEED, A.; ABDULLAH, S. Impact of parasitic infection on human gut ecology and immune regulations. **Transl. Med Commun**, v. 6, n. 11, 2021.

NEVES, J. Salmonelose septicêmica prolongada em face às doutrinas de Kiel e de Monteví-deu. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 1, p. 59-68, 1967.

NEVES, D. P. **Parasitologia humana**. 13. ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 2016. 588 p.

NEVES, B.J. *et al.* In silico repositioning-chemogenomics strategy identifies new drugs with potential activity against multiple life stages of *Schistosoma mansoni*. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 1, p. e3435, 2015. doi:10.1371/journal.pntd.0003435

NIKITENKO, V. I.; STADNIKOV, A. A.; KOPYLOV, V. A. Bacterial translocation from the gastrointestinal tract in healthy and injured rats. **J. Wound Care**, v. 20, n. 3, p. 114-122, 2011.

NOVAES, R. D. *et al.* Effect of bark extract of *Bathysa cuspidata* on hepatic oxidative damage and blood glucose kinetics in rats exposed to paraquat. **Toxicologic Pathology**, v. 40, n. 1, p. 62-70, 2012.

OLIVEIRA, F. A. S. *et al.* Valores de referência de parâmetros bioquímicos e hematológicos de *Rattus norvegicus* (Wistar) da Unidade de Produção Animal do Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos da Universidade Federal da Paraíba. **Scientia Plena**, [S. l.], v. 17, n. 3, 2021. DOI:10.14808/sci.plena.2021.034901. Disponível em: <https://www.scientiaplenua.org.br/sp/article/view/5955>. Acesso em: 13 fev. 2023.

ONGURU, D. *et al.* Human schistosomiasis is associated with endotoxemia and Toll-like receptor 2-and 4-bearing B cells. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 84, n. 2, p. 321, 2011.

OTTENS H.; DICKERSON G. Studies on the effects of bacteria on experimental schistosomiasis infections in animals. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 66, p. 85-107, 1972.

PADHY, B. M.; GUPTA, Y. K. Drug repositioning: re-investigating existing drugs for new therapeutic indications. **Journal of Postgraduate Medicine** v. 57, n. 2, p. 153-160, 2011. doi:10.4103/0022-3859.81870.

PALM, N. W.; DE ZOETE, M. R.; FLAVELL, R. A. Immune–microbiota interactions in health and disease. **Clinical immunology**, v. 159, n. 2, p. 122-127, 2015.

PANIC, G. *et al.* Repurposing drugs for the treatment and control of helminth infections. **International Journal for Parasitology: Drugs And Drug Resistance** v. 4, n. 3, p. 185-200, 2014. doi:10.1016/j.ijpddr.2014.07.002.

PASYAR, N. *et al.* Evaluation of serum procalcitonin levels for diagnosis of secondary bacterial infections in visceral leishmaniasis patients. **The American Journal Of Tropical Medicine And Hygiene**, v. 86, n. 1, p. 119, 2012.

PAZ, W. S. *et al.* Spatiotemporal clusters of schistosomiasis mortality and association with social determinants of health in the Northeast region of Brazil (1980–2017). **Acta Tropica**, v. 212, p. 105668, 2020.

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

PEDERSEN, A. B., ANTONOVICS, J. Anthelmintic treatment alters the parasite community in a wild mouse host. **Biol. Lett.**, v. 9, p. 20130205, 2013. doi: 10.1098/rsbl.2013.0205.

PFARR, K. M. *et al.* The pipeline for drugs for control and elimination of neglected tropical diseases: 2. Oral anti-infective drugs and drug combinations for off-label use. **Parasites & Vectors**, v. 16, n. 1, p. 394, 2023.

PIELOU, E. C. The measurement of diversity in different types of biological collections. **Journal of Theoretical Biology**. v. 13, p. 131–144, 1966. doi:10.1016/0022-5193(66)90013-0.

PRODAN, A. *et al.* Comparing bioinformatic pipelines for microbial 16S rRNA amplicon sequencing. **PLoS ONE**, v. 15, n. 1, p. e0227434, 2020.

QUAST, C. *et al.* The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. **Nucl. Acids Res.**, v. 41, n. D1, p. D590-D596, 2013.

QUINCE, C. *et al.* Shotgun metagenomics, from sampling to analysis. **Nature Biotechnology**, v. 35, n. 9, p. 833, 2017.

RAFEY, A. *et al.* Antibiotics associated with *Clostridium difficile* infection. **Cureus**, v. 15, n. 5, p. e39029, 2023. doi:10.7759/cureus.39029.

RAJENDRAN, V. *et al.* Improved efficacy of doxycycline in liposomes against *Plasmodium falciparum* in culture and *Plasmodium berghei* infection in mice. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**. v. 3, p. 1-8, 2018.

RAMADORI, G., SAILE, B. Portal tract fibrogenesis in the liver. **Lab Invest**. v. 84, n. 2, p. 153-159, 2004.

RAMANAN, D. *et al.* Helminth infection promotes colonization resistance via type 2 immunity. **Science**, v. 352, p. 608–612, 2016. doi: 10.1126/science.aaf3229.



RAMIREZ, J. *et al.* Antibiotics as major disruptors of gut microbiota. **Front. Cell. Infect. Microbiol.**, v. 10, p. 572912, 2020. doi: 10.3389 / fcimb.2020.572912.

RIECKMANN, K.H. *et al.* Effects of tetracycline against chloroquine-resistant and chloroquine-sensitive *Plasmodium falciparum*. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 20, n. 6, p. 811–815, 1971.

RINALDI, G. *et al.* An antibiotic selection marker for schistosome transgenesis. **International Journal for Parasitology**, v. 42, n. 1, p. 123-30, 2012. doi:10.1016/j.ijpara.2011.11.005.

ROCHA, H. *et al.* Atividade antibacteriana do soro de pacientes com forma hepatoesplênica da esquistossomose mansônica. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 10, p. 364-370, 1968.

ROCHA, T. J. M. *et al.* Ultrastructural study of morphological changes in *Schistosoma mansoni* after in vitro exposure to the monoterpene rotundifolone. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 50, n. 1, p. 86-91, 2017.

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

ROSETO, O. *et al.* Bacterial translocation: gap in the shield. **Orvosi Hetilap**, v. 155, n. 8, p. 304-312, 2014. doi:10.1556/OH.2014.29836.

ROSS, A. G. *et al.* Neuroschistosomiasis. **Journal of Neurology**, v. 259, n. 1, p. 22–32, 2012. doi: 10.1007/s00415-011-6133-7.

RUNDLES, C.; LIN D. H. Nutrition and the immune system of the gut. **Nutrition**, v. 14, p. 573-579, 1998.

SALIH, O. A. M. *et al.* Artemether and Praziquantel a green light to treat the resistance schistosomiasis: A case Report. **Omdurman Journal of Pharmaceutical sciences.**, v. 2, n. 3, p. 239-246, 2022. Disponível em: <http://journal.oiu.edu.sd/index.php/ojps/article/view/2870/2203>. Acesso em: 14 fev. 2023.

SANTANA, D. S. *et al.* Infecções bacterianas na esquistossomose mansônica: revisão sistemática. **Caderno de Graduação-Ciências Biológicas e da Saúde-UNIT-PERNAMBUCO**, v. 1, n. 2, p. 43-57, 2013.

SANTOS, M. P. *et al.* Doxycycline aggravates granulomatous inflammation and lung microstructural remodeling induced by *Schistosoma mansoni* infection. **International Immunopharmacology**, v. 94, p. 107462, 2021.

SAPADIN, A.; FLEISCHMAJER, R. Tetracyclines: nonantibiotic properties and their clinical implications. **J. Am. Acad. Dermatol.**, v. 54, n. 2, p. 258-65, 2006.

SARTOR, R. B. Microbial Influences in Inflammatory Bowel Diseases, **Gastroenterology**, v. 134, n. 2, p. 577–594, 2008.

SCHNEEBERGER, P. H. H. *et al.* Investigations on the interplays between *Schistosoma mansoni*, praziquantel and the gut microbiome. **Parasites & Vectors**, v. 11, n. 1, p. 168, 2018.

SCHWARTZ, C.; FALLON, P. G. *Schistosoma* “eggs-iting” the host: granuloma formation and egg excretion. **Frontiers in Immunology**, v. 9, p. 2492, 2018.

SCHOCH, C. L. *et al.* Nuclear ribosomal *internal transcribed spacer* (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 16, p. 6.241–6.246, 2012.

SILVA, L. M. *et al.* Significance of schistosomal granuloma modulation. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 95, n. 3, p. 353-361, 2000. doi:10.1590/s0074-02762000000300010.

SILVA, F. L. *et al.* Alterations in the lipid profiles and circulating liver enzymes in individuals infected by *Schistosoma mansoni*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 51, p. s/p, 2018.

SILVA, K. E. R. *et al.* Alternativas terapêuticas no combate à esquistossomose mansônica. **Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.**, v. 33, n. 1, p. 9-16, 2012.

SMYTH, R. P. *et al.* Reducing chimera formation during PCR amplification to ensure accurate genotyping. **Gene**, v. 469, p. 45–51, 2010.

SOKOLOVA, T. S. *et al.* The impact of *Opisthorchis felinus* infection and praziquantel treatment on the intestinal microbiota in children. **Acta Trop**, v. 217, p.105835, 2021. doi:10.1016/j.actatropica.2021.105835.

SOUZA, F. P. C. *et al.* Esquistossomose mansônica: aspectos gerais, imunologia, patogênese e história natural. **Ver. Bras. Clin. Med.**, v. 9, n. 4, p. 300-307, 2011.

STARK, K. A. *et al.* The role of the host gut microbiome in the pathophysiology of schistosomiasis. **Parasite Immunol.**, v. 45, n. 4, p. e12970, 2023. doi:10.1111/pim.12970.

STECHER B. *et al.* Gut inflammation can boost horizontal gene transfer between pathogenic and commensal *Enterobacteriaceae*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 4, p. 1269-1274, 2012.

STREIT, W. R.; SCHMITZ, R. A. Metagenomics – the key to the uncultured microbes. **Current Opinion in Microbiology**, v. 7, n. 5, p. 492–498, 2004.

TAKAKI, K. *et al.* *Schistosoma mansoni* eggs modulate the timing of granuloma formation to promote transmission. **Cell Host & Microbe**, v. 29, n. 1, p. 58-67, 2021. doi:10.1016/j.chom.2020.10.002.

TEIXEIRA, R. S.; BINA, J. C.; BARRETO, S. H. Bacterial infection of long duration due to genus *Escherichia* in a patient with *Schistosoma mansoni*. **Revista Médica da Bahia**, v. 22, p. 70-74, 1976.

THÉTIOT-LAURENT, S. A. L. *et al.* Schistosomiasis chemotherapy. **Angew. Chem. Int. Ed.**, v. 52, p. 7936-7956, 2013.

THRALL, M. A. *et al.* **Hematologia e bioquímica clínica veterinária**. 2. ed. São Paulo: Roca, 2015. 688p.

TILG, H. *et al.* The intestinal microbiota in colorectal cancer. **Cancer Cell**, v. 33, p. 954–964, 2018. doi: 10.1016/j.ccell.2018.03.004

TJADERHANE, L. *et al.* The effect of chemical inhibition of matrix metalloproteinases on the size of experimentally induced apical periodontitis. **Int. Endodontic. J.**, v. 40 n. 4, p. 282-289, 2007.

TURNER, J. D. *et al.* Blood flukes exploit Peyer's Patch lymphoid tissue to facilitate transmission from the mammalian host. **PLoS Pathogens**, v. 8, n. 12, p. e1003063, 2012.

VAN DER KLEIJ, D. *et al.* Responses to Toll-like receptor ligands in children living in areas where schistosome infections are endemic. **The Journal of infectious diseases**, v. 189, n. 6, p. 1044-1051, 2004.

VAN DER MEULEN, T. A. *et al.* The microbiomesystemic diseases connection. **Oral Dis**, v. 22, p. 719-734, 2016.

VAISHNAVI, C. Translocation of gut flora and its role in sepsis. **Indian Journal of Medical Microbiology**, v. 31, n. 4, p. 334-342, 2013. doi:10.4103/0255-0857.118870.

VILLAMIZAR-MONSALVE, M. A. *et al.* Current drug strategies for the treatment and control of schistosomiasis. **Expert Opinion on Pharmacotherapy**, v. 25, n. 4, p. 409-420, 2024. doi:10.1080/14656566.2024.2333372.

WANG, B., *et al.* The Human Microbiota in Health and Disease. **Engineering**, v. 3, p. 71-82, 2017.

WARREN, K. S.; DOMINGO, E. O. Granuloma formation around *Schistosoma mansoni*, *S. haematobium*, and *S. japonicum* eggs. Size and rate of development, cellular composition, cross-sensitivity, and rate of egg destruction. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 19, n. 2, p. 292-304, 1970.

WEINSTOCK, J. V.; BOROS, D. L. Organ-dependent differences in composition and function observed in hepatic and intestinal granulomas isolated from mice with *Schistosomiasis mansoni*. **J. Immunol.**, v. 130, n. 1, p. 418–22, 1983. pmid:6600190.

WIEGAND, R. E. *et al.* Associations between infection intensity categories and morbidity prevalence in school-age children are much stronger for *Schistosoma*

*haematobium* than for *S. mansoni*. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 15, n. 5, p. e0009444, 2021.

WIEST, R.; RATH, H. C. Bacterial translocation in the gut. **Best Practice and Research Clinical Gastroenterology**, v. 17, p. 397-425, 2003.

WILKINSON, P. D. *et al.* Polyploid hepatocytes facilitate adaptation and regeneration to chronic liver injury. **The American Journal of Pathology**, v. 189, n. 6, p. 1241-1255, 2019. doi:10.1016/j.ajpath.2019.02.008.

WILKINSON, P. D.; DUNCAN, A. W. Differential roles for diploid and polyploid hepatocytes in acute and chronic liver injury. **Seminars in Liver Disease**, v. 41, n. 1, p. 42-49, 2021. doi:10.1055/s-0040-1719175.

WILSON, M. S. *et al.* Immunopathology of schistosomiasis. **Immunol. Cell. Biol.**, v. 85, p. 148-154, 2007.

WILSON, R. A. The saga of schistosome migration and attrition. **Parasitology**, v. 136, n. 12, p. 1581-92, 2009.

WYNN, T. A. *et al.* Immunopathogenesis of schistosomiasis. **Immunol. Rev.**, v. 201, n. 1, p. 156-67, 2004.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Schistosomiasis**. Geneva: WHO, 2019. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/schistosomiasis>. Acesso em: 27 nov. 2019.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Schistosomiasis**. Geneva: WHO, 2023. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/schistosomiasis>. Acesso em: 16 de mar. de 2023.

XU, F.; CHENG, R.; MIAO, S. *et al.* Prior *Toxoplasma gondii* infection ameliorates liver fibrosis induced by *Schistosoma japonicum* through inhibiting Th2 response and improving balance of intestinal flora in mice. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 21, p. 2711, 2020.

YANG, C. A., *et al.* Impact of *Enterobius vermicularis* infection and mebendazole treatment on intestinal microbiota and host immune response. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 1, n. 9, p. e0005963, 2017. doi:10.1371/journal.pntd.0005963.

YANG, L., *et al.* The varying effects of antibiotics on gut microbiota. **AMB. Expr.**, v. 11, p. 116, 2021. <https://doi.org/10.1186/s13568-021-01274-w>.

ZAFAR, H.; SAIER JR., M. H. Gut Bacteroides species in health and disease. **Gut Microbes**, v. 13, n. 1, p. 1-20, 1848158, 2021. doi:10.1080/19490976.2020.1848158.

ZAMANI, S. *et al.* Enterotoxigenic Bacteroides fragilis: a possible etiological candidate for bacterially-induced colorectal precancerous and cancerous lesions. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 9, p. 449, 2020.

ZANONI, F. L. *et al.* Mesenteric microcirculatory dysfunctions and translocation of indigenous bacteria in a rat model of strangulated small bowel obstruction. **Clinics**, v. 64, p. 911-919, 2009.

ZAPARINA, O. *et al.* Antioxidants resveratrol and SkQ1 attenuate praziquantel adverse effects on the liver in *Opisthorchis felinus* infected hamsters. **Acta Tropica**, v. 220, p. 105954, 2021.

ZENG, M. Y.; INOHARA, N.; NUÑEZ, G. Mechanisms of inflammation-driven bacterial dysbiosis in the gut. **Mucosal Immunology**, v. 10, n. 1, p. 18-26, 2017. doi:10.1038/mi.2016.75.

ZHANG, B. *et al.* Gut microbiota modulates intestinal pathological injury in *Schistosoma japonicum*-infected mice. **Frontiers in Medicine**, v. 7, p. 588928, 2020.

ZHANG, W. *et al.* Comprehensive assessment of 16S rRNA gene amplicon sequencing for microbiome profiling across multiple habitats. **Microbiology Spectrum**, v. 11, n. 3, p. e0056323, 2023. doi:10.1128/spectrum.00563-23.

ZHANG, X. *et al.* Polymeric nanoparticles containing rapamycin and autoantigen induce antigen-specific immunological tolerance for preventing vitiligo in mice. **Human Vaccines & Immunotherapeutics**, v. 17, n. 7, p. 1923-1929, 2021a.

ZHANG, X. *et al.* An antibiotic-impacted microbiota compromises the development of colonic regulatory T cells and predisposes to dysregulated immune responses. **MBio.**, v. 12, n. 1, p. 10.1128/mbio. 03335-20, 2021b.

ZHAO, Y. *et al.* Alterations of the mice gut microbiome via *Schistosoma japonicum* ova-induced granuloma. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, p. 352, 2019. doi:10.3389/fmicb.2019.00352.

ZHENG, B. *et al.* T lymphocyte-mediated liver immunopathology of schistosomiasis. **Front. Immunol.**, v. 11, p. 61, 2020.

ZHOU, C. *et al.* Alterations in gut microbiome and metabolite profile of patients with *Schistosoma japonicum* infection. **Parasites & Vectors**, v. 16, n. 1, p. 346, 2023.

ZHOU, C. *et al.* Comparison of intestinal flora between patients with chronic and advanced *Schistosoma japonicum* infection. **Parasites & Vectors**, v. 15, n. 1, p. 413-417, 2022. doi:10.1186/s13071-022-05539-6.

## ANEXOS

## ANEXO A – Aprovação do CEUA – Comissão de Ética no uso de animais da UNIFAL-MG

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
 Universidade Federal de Alfenas - UNIFAL-MG  
 Lei nº 11.154, de 29 de julho de 2005

Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA/UNIFAL-MG

# Certificado

Certificamos que a proposta intitulada **Efeito da manipulação da microbiota intestinal no desenvolvimento da infecção com *Schistosoma mansoni* e tratamento com praziquantel**, registrada com o nº **0024/2020**, sob a responsabilidade de **Marcos José Marques**, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de **pesquisa científica**, com vigência de **17/08/2020 a 31/12/2022**, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA-UNIFAL) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS.

Espécie/linhagem/raça	Total de animais	Total de machos	Total de fêmeas	Origem
Roedor / Balb/c	42	42	0	Cebio - ufmg

Alfenas, 26 de Maio de 2021

**Prof(a). Dr(a). Pollyanna Francielli de Oliveira**  
 Coordenador(a) do CEUA/UNIFAL - MG

## ANEXO B – Artigo submetido

### Acta Tropica

#### Impact of gentamicin and doxycycline in association with praziquantel on acute hepatic and intestinal schistosomiasis in mice

--Manuscript Draft--

<b>Manuscript Number:</b>	
<b>Article Type:</b>	Research Paper
<b>Section/Category:</b>	Helminths, epidemiology, diagnostics, chemotherapy + control programs (incl. vectors); models; immun
<b>Keywords:</b>	Schistosoma mansoni; antibiotics; praziquantel; granulomas; histology
<b>Corresponding Author:</b>	Cláudio Daniel Cerdeira Federal University of Alfenas BRAZIL
<b>First Author:</b>	Marisa de O. Lopes
<b>Order of Authors:</b>	Marisa de O. Lopes Luis F. C. dos Reis Matheus P. de Araújo Aline P. Castro Cláudio Daniel Cerdeira Juliana B. Nunes Raquel L. M. Souza Luiz F. L. Coelho Marcos J. Marques
<b>Abstract:</b>	<p>Background and aims</p> <p>Marked divergences in the immunological mechanisms that regulate the pathophysiology of acute and chronic schistosomiasis have a direct influence on pathological outcomes and antiparasitic chemotherapy responses at different stages of <i>Schistosoma mansoni</i> infection. Thus, this study evaluated the impact of gentamicin (GEN) and doxycycline (DOX) in association with praziquantel (PZQ) on the development of acute hepatic and intestinal schistosomiasis in mice.</p> <p>Methods</p> <p>BALB/c mice were randomized into five experimental groups, and the formation of hepatic and intestinal granulomas was evaluated by histopathological and histomorphometric analyses, leukocyte count, quantification of hepatic parasite load (real time PCR and parasite eggs count), and biochemical parameters (ALT, AST, ALP, and albumin).</p> <p>Main findings</p> <p>PZQ+DOX association potentiated hepatic granulomatous inflammation, diffuse fibrosis and ALT circulating levels, indicating greater morphofunctional liver damage. AST levels were increased in PZQ+GEN-treated animals. This response corroborated the histopathological findings, indicating an accelerated modulation towards the chronic phase as manifested by reduced granuloma size compared to infected untreated animals.</p> <p>Conclusion</p> <p>PZQ association with DOX and GEN induced differential modulation of the granulomatous inflammation, with DOX aggravating this process and GEN exerting</p>