



Universidade Federal do Maranhão
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde
Doutorado

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DO TRATAMENTO COM *Dysphania*
ambrosioides (L.) MOSYAKIN & CLEMANTS SOBRE O
DESENVOLVIMENTO DOS GRANULOMAS DE *Schistosoma mansoni*
EM DIFERENTES FASES DA INFECÇÃO**

MARIA GABRIELA SAMPAIO LIRA

**São Luís
2024**

MARIA GABRIELA SAMPAIO LIRA

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DO TRATAMENTO COM *Dysphania*
ambrosioides (L.) MOSYAKIN & CLEMANTS SOBRE O
DESENVOLVIMENTO DOS GRANULOMAS DE *Schistosoma mansoni*
EM DIFERENTES FASES DA INFECÇÃO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Maranhão como requisito para obtenção do título de Doutora em Ciências da Saúde.

Orientadora: Profa. Dra. Flávia Raquel
Fernandes do Nascimento

Coorientador: Prof. Dr. Rafael Cardoso
Carvalho

São Luís

2024

Ficha gerada por meio do SIGAA/Biblioteca com dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Diretoria Integrada de Bibliotecas/UFMA

Lira, Maria Gabriela Sampaio.

AVALIAÇÃO DO EFEITO DO TRATAMENTO COM *Dysphania ambrosioides* L. MOSYAKIN & CLEMANTS SOBRE O DESENVOLVIMENTO DOS GRANULOMAS DE *Schistosoma mansoni* EM DIFERENTES FASES DA INFECÇÃO / Maria Gabriela Sampaio Lira. - 2024.

190 f.

Coorientador(a) 1: Rafael Cardoso Carvalho.

Orientador(a): Flávia Raquel Fernandes Nascimento.

Tese (Doutorado) - Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde/ccbs, Universidade Federal do Maranhão, UFMA, 2024.

1. Efeito imunomodulador. 2. Esquistossomicida. 3. Mastruz. 4. Quimioterapia. I. Carvalho, Rafael Cardoso. II. Nascimento, Flávia Raquel Fernandes. III. Título.

MARIA GABRIELA SAMPAIO LIRA

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DO TRATAMENTO COM *Dysphania ambrosioides* (L.)
MOSYAKIN & CLEMANTS SOBRE O DESENVOLVIMENTO DOS
GRANULOMAS DE *Schistosoma mansoni* EM DIFERENTES FASES DA INFECÇÃO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Maranhão como requisito para obtenção do título de Doutora em Ciências da Saúde.

Aprovada em 27/02/2024

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Flávia Raquel Fernandes do Nascimento (Orientadora)
Universidade Federal do Maranhão - UFMA

Prof. Dr. Rafael Cardoso Carvalho (Coorientador)
Universidade Federal do Maranhão - UFMA

Prof. Dr. Hermes Ribeiro Luz (Examinador 1)
Universidade Federal do Maranhão - UFMA

Profa. Dra. Joicy Cortez de Sá Sousa (Examinador 2)
Universidade Federal do Maranhão - UFMA

Profa. Dra. Márcia Cristina Gonçalves Maciel (Examinador 3)
Universidade de Brasília - UnB

Prof. Dr. Guilherme Silva Miranda (Examinador 4)
Instituto Federal do Maranhão - IFMA

“O futuro pertence àqueles que acreditam na beleza de seus sonhos”
(Autor Desconhecido)

A minha família,
pelo incentivo, paciência e cuidados...

Dedico

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pela vida e pela trajetória que me permitiu percorrer, com força e saúde.

Aos meus pais, Wilson e Lúcia, por serem grandes apoiadores dos meus sonhos, sempre incentivando, dando suporte e prontos para acolher com amor e carinho. Agradeço ainda, pelos exemplos de honestidade e dedicação em tudo que fazem.

Ao meu esposo, Adamo Santos, expresso profunda gratidão por todo o amor e apoio dedicados. Agradeço por estar sempre ao meu lado, torcendo por meu sucesso, oferecendo conselhos valiosos e acreditando em meu potencial. Sua presença e encorajamento foram peças-chave para o êxito desta empreitada acadêmica.

Ao meu irmão, Gabriel Sampaio, por todo incentivo a mim dedicado, pelo apoio, pela alegria e pelo carinho transmitido.

À Profa. Dra. Flávia Nascimento, expresso meu sincero agradecimento por proporcionar a oportunidade de realização desta etapa crucial da minha formação. A possibilidade de pesquisar novamente sobre o parasito *S. mansoni* e explorar o universo da imunologia foi enriquecedora. Sua orientação foi fundamental nessa trajetória, e tenho imenso orgulho de ter sido sua aluna. Você é um exemplo inspirador de pessoa e profissional. Obrigada pela valiosa contribuição para o meu crescimento acadêmico e pessoal.

Ao Prof. Dr. Rafael Cardoso Carvalho, expresso meu profundo agradecimento por seu apoio e incentivo constantes. Sua crença em meu potencial e seus ensinamentos foram essenciais para este trabalho e para minha formação. Agradeço sinceramente por sua orientação valiosa.

A equipe dos Mansônicos, composta por Ranielly, Irrla, Gleycka, Gustavo e Vítor merece meu profundo agradecimento por terem compartilhado comigo esta jornada ao longo dos anos de doutorado. Enfrentamos juntos os desafios inerentes a esta etapa, e sem dúvida, fez toda a diferença, tornando a caminhada mais leve e significativa. Obrigada a cada um por fazer parte desta jornada extraordinária.

Aos queridos amigos Lorrane, Guilherme, Gustavo, Fernanda, Thiago e Roberta, expresso minha sincera gratidão por todo o apoio e amizade. Obrigada pela força incansável, pelos valiosos conselhos, conhecimentos e pelo constante incentivo que recebi de cada um de vocês. Saber que sempre estiveram na torcida pelas minhas conquistas tornou cada desafio mais superável.

Ao Laboratório de Imunofisiologia (LIF), expresso minha profunda gratidão por todo o suporte, acolhimento e valiosos conhecimentos compartilhados. Cada passo desta jornada acadêmica foi enriquecido pela colaboração e dedicação exemplar de todos os membros do laboratório.

À professora Dra. Lucilene, expresso minha sincera gratidão pelo imprescindível suporte fornecido nas análises histológicas das lâminas. Sua expertise e orientação foram fundamentais para o êxito desta pesquisa. Agradeço também ao André Vale pelo importante auxílio nas fotografias das lâminas, contribuindo significativamente para a documentação e compreensão visual dos resultados.

Ao professor Eduardo Martins, agradeço a valiosa colaboração na análise *in silico*, a qual foi fundamental para complementar resultados da pesquisa.

A professora Dra. Ana Lúcia e ao Leonardo, agradeço a valiosa contribuição nas colorações das lâminas histológicas, bem como pelos ensinamentos e conhecimentos compartilhados. A colaboração de vocês foi essencial para o progresso e a qualidade da pesquisa, e sou profundamente grata por poder contar com a expertise e apoio oferecidos.

Ao Instituto Federal do Maranhão, Campus Zé Doca, expresso minha sincera gratidão por proporcionar a possibilidade de conciliação entre o curso de doutorado e o trabalho, permitindo a organização dos meus horários laborais. Agradeço também pelas valiosas amizades que desenvolvi durante esse período, as quais desempenharam um papel crucial em tornar a caminhada mais leve e enriquecedora.

A turma de doutorado em Ciências da Saúde (2019-2023), agradeço pelo apoio e companheirismo.

Ao programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, a coordenação, a secretaria e a todos os docentes e funcionários, pela contribuição nesta etapa da minha formação. Obrigada por tornarem possível esta significativa jornada.

À Universidade Federal do Maranhão, agradeço a contribuição fundamental em minha formação acadêmica. Agradeço sinceramente por proporcionar um ambiente propício ao aprendizado e por seu papel crucial em minha jornada acadêmica.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Fundação de Amparo à Pesquisa e Desenvolvimento Científico do Maranhão (FAPEMA), agradeço o apoio financeiro do projeto maior, que permitiu a realização desta pesquisa.

Aos familiares, amigos, docentes, doutorandos, mestrandos e alunos de graduação, que não foram nominalmente mencionados, mas que de alguma forma contribuíram na conclusão de mais uma etapa na minha vida.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIACÕES	11
LISTA DE FIGURAS DO REFERENCIAL TEÓRICO.....	13
LISTA DE FIGURAS DO CAPÍTULO 1.....	14
LISTA DE FIGURAS DO CAPÍTULO 2.....	15
LISTA DE TABELAS DO CAPÍTULO 2	17
LISTA DE FIGURAS DO CAPÍTULO 3.....	18
RESUMO.....	20
ABSTRACT	21
1 INTRODUÇÃO	20
2 REFERENCIAL TEÓRICO	23
2.1 Distribuição da esquistossomose	23
2.2 Ciclo evolutivo de <i>Schistosoma mansoni</i>	24
2.3 Immunopatogênese da esquistossomose	27
2.4 Formação de granulomas e <i>Schistosoma mansoni</i>	31
2.4.1 Granulomas hepáticos.....	34
2.4.2 Granulomas intestinais	35
2.4.3 Granulomas pulmonares.....	36
2.5 Controle da esquistossomose mansoni e praziquantel	37
2.6 Produtos naturais como estratégia terapêutica	39
2.7 Produtos naturais no tratamento da esquistossomose	40
2.8 O gênero <i>Dysphania</i>	42
2.9 <i>Dysphania ambrosioides</i> (L.) Mosyakin & Clemants.....	44
3 OBJETIVOS	47
3.1 Geral	47
3.2 Específicos	47
4 RESULTADOS	48
4.1 CAPÍTULO 1 - Immunomodulating and Anti-parasitary Mechanisms of Plant Products in the Treatment of Schistosomiasis	48
4.2 CAPÍTULO 2 – Efeito de <i>Dysphania ambrosioides</i> (L.) Mosyakin & Clemants na oviposição e no desenvolvimento de granulomas de <i>Schistosoma mansoni</i>	81

4.3	CAPÍTULO 3 - Associações histomorfométricas e imunológicas da infecção por <i>S. mansoni</i> em animais tratados ou não com <i>Dysphania ambrosioides</i> (L.) Mosyakin & Clemants.....	136
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	166
	REFERÊNCIAS.....	167
	APÊNDICES	184
	APÊNDICE A - Produções durante o doutorado	185
	ANEXOS.....	188
	ANEXO A – Certificado de Aprovação do Comitê de Ética da UFMA	189
	ANEXO B – Comprovação de financiamento de pesquisa	190

LISTA DE ABREVIACÕES

- ALT** – Alanina aminotransferase
- AMM** – Administração anual de medicamentos em massa
- AST** – Aspartato aminotransferase
- BBBP** - Penetração da barreira hematoencefálica
- BSA** – Albumina bovina, do inglês *Bovine Serum Albumin*
- CEUA** – Comitê de Ética para o Uso de Animais
- CO₂** – Dióxido de carbono
- DMSO** – Dimetilsulfóxido
- DO** – Densidade Óptica
- ECMP** - Proteínas da Matriz Extracelular
- EHDA** – Extrato Hidroalcóolico de *Dysphania ambrosioides*
- EHDA1** – Grupo tratado com EHDA durante a fase cutânea
- EHDA2** – Grupo tratado com EHDA durante a fase pulmonar
- EHDA3** – Grupo tratado com EHDA durante a fase vermes imaturos
- EHDA4** – Grupo tratado com EHDA durante a fase vermes maduros
- ELISA** - Ensaio de Imunoabsorção Enzimática, do inglês *Enzyme Linked Immunoborbent Assay*
- g-GT** – Gama glutamiltransferase
- GIDE** – Grupo Interdepartamental de Estudos sobre a Esquistossomose
- GM-CSF** - fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos
- GSH-Px** – Glutathiona peroxidase
- H₂O₂** – Peróxido de hidrogênio
- H₂SO₄** – Ácido sulfúrico
- HE** – Hematoxilina-eosina
- HSCs** - Células estreladas hepáticas
- IC** – Concentração Inibitória
- IC₅₀** – 50% de concentração inibitória máxima
- ICAM-1** - Molécula de adesão intracelular 1
- IFN- γ** – Interferon gama
- IFPMA** - Federação internacional farmacêutica
- IgE** – Imunoglobulina E
- IgG** – Imunoglobulina G

IL – Interleucina
iNOS – Óxido nítrico sintase induzível
KOH – Hidróxido de potássio
LDH – Lactato desidrogenase
M1 – Macrófagos do tipo 1/ Classicamente Ativado
M2 – Macrófagos do tipo 2/ Alternativamente Ativado
MAR – Herbário do Maranhão
MHC-II – Complexo de Histocompatibilidade Maior de Classe II (MHC-II)
MMP-9 – Mmatrix metaloproteinases – 9
MP – Metaloproteinases
NaCl – Cloreto de sódio
NF-K β – Nuclear kappa B
OMS – Organização Mundial da Saúde
OPG – Ovos por Grama de Fezes
PASS – Software de espectro para substâncias
PBB – Ligação às proteínas plasmáticas
PBS – Salina Tamponada com Fosfato, do inglês *Phosphate Buffered Saline*
pH – Potencial hidrogeniônico
PZQ – Praziquantel
RENISUS – Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS
ROS – Espécies reativas de oxigênio
RMSD – Desvio médio quadrático
RPMI – Meio de Cultura desenvolvido pelo Roswell Park Memorial Institute
SEA – antígenos solúveis do ovo
SOD – Superóxido dismutase
SWAP - antígenos solúveis do verme
Th – Resposta *T helper*
TIMPs – Inibidores teciduais das metaloproteinases
TNF- α – Fator de Necrose tumoral alfa
TRL2 – Receptor do tipo Toll 2
Treg – Resposta T regulatória
UFMA – Universidade Federal do Maranhão
WHO – Organização Mundial de Saúde, do inglês Word Health Organization

LISTA DE FIGURAS DO REFERENCIAL TEÓRICO

Figura 1	Distribuição e situação da esquistossomose em humanos em nível global	23
Figura 2	Ciclo biológico de <i>Schistosoma mansoni</i>	26
Figura 3	Células T helper (Th) ativadas e diferenciadas nos subconjuntos Th1, Th2, Th17, Tfh, Th9 e Treg, que regulam a resposta imune durante a infecção por <i>Schistosoma mansoni</i>	27
Figura 4	Indução da resposta imune durante as semanas de infecção por <i>Schistosoma mansoni</i>	30
Figura 5	Representação da composição celular e desenvolvimento do granuloma ao redor dos ovos de <i>Schistosoma mansoni</i>	34
Figura 6	Características da composição do granuloma hepático e intestinal	36
Figura 7	Distribuição mundial e diversidade de espécies de <i>Dysphania</i>	43
Figura 8	Representação da espécie vegetal <i>Dysphania ambrosioides</i> e sua classificação científica	45

LISTA DE FIGURAS DO CAPÍTULO 1

Figure 1	Parasite life cycle	53
Figure 2	Representation of the signaling pathways of immunomodulation mechanisms induced by some chemical constituents present in plant species products and their effects during the treatment of schistosomiasis	67

LISTA DE FIGURAS DO CAPÍTULO 2

Figura 1	Delineamento experimental ao longo da etapa de infecção dos camundongos e das etapas de tratamento dos diferentes grupos	91
Figura 2	Viabilidade de vermes machos adultos de <i>Schistosoma mansoni</i> durante 72 horas de exposição ao extrato hidroalcoólico de <i>Dysphania ambrosioides</i>	94
Figura 3	Número de ovos após exposição ao extrato hidroalcoólico de <i>Dysphania ambrosioides</i>	95
Figura 4	Estrutura 3D do ligante cristalográfico e enzima na melhor conformação prevista por docking molecular	98
Figura 5	Diagrama 2D de interações entre o ligante nativo e alvo de kaempferol	99
Figura 6	Análise do número (A) da morfometria da área (B) de granulomas no tecido hepático de camundongos infectados ou não por <i>Schistosoma mansoni</i> , e tratados ou não com extrato hidroalcoólico de <i>Dysphania ambrosioides</i>	101
Figura 7	Fotomicrografia de cortes histológicos hepáticos de camundongos infectados ou não por <i>Schistosoma mansoni</i> , e tratados ou não com extrato hidroalcoólico de <i>Dysphania ambrosioides</i> corados com HE (20x)	102
Figura 8	Fotomicrografia de cortes histológicos hepáticos de camundongos infectados ou não por <i>Schistosoma mansoni</i> , e tratados ou não com extrato hidroalcoólico de <i>Dysphania ambrosioides</i> corados Tricrômetro de Masson (40x)	104
Figura 9	Fotomicrografia de cortes histológicos hepáticos de camundongos infectados ou não por <i>Schistosoma mansoni</i> , e tratados ou não com extrato hidroalcoólico de <i>Dysphania ambrosioides</i> corados picrossirius red (20x)	105-106
Figura 10	Análise do número (A) e da da área (B) de granulomas no tecido intestinal de camundongos infectados ou não por <i>Schistosoma mansoni</i> , e tratados ou não com extrato hidroalcoólico de <i>Dysphania ambrosioides</i>	108

Figura 11	Fotomicrografia de cortes histológicos intestinais de camundongos infectados ou não por <i>Schistosoma mansoni</i> , e tratados ou não com extrato hidroalcoólico de <i>Dysphania ambrosioides</i> corados com HE (20x)	110
Figura 12	Fotomicrografia de cortes histológicos intestinais de camundongos infectados ou não por <i>Schistosoma mansoni</i> , e tratados ou não com extrato hidroalcoólico de <i>Dysphania ambrosioides</i> corados Tricrômero de Masson (20x)	111-112
Figura 13	Fotomicrografia de cortes histológicos intestinais de camundongos infectados ou não por <i>Schistosoma mansoni</i> , e tratados ou não com extrato hidroalcoólico de <i>Dysphania ambrosioides</i> corados picrosirius red (20x)	113-114
Figura 14	Fotomicrografia de cortes histológicos pulmonares de camundongos infectados ou não por <i>Schistosoma mansoni</i> , e tratados ou não com extrato hidroalcoólico de <i>Dysphania ambrosioides</i> corados com HE (20x)	116
Figura 15	Fotomicrografia de cortes histológicos pulmonares de camundongos infectados ou não por <i>Schistosoma mansoni</i> , e tratados ou não com extrato hidroalcoólico de <i>Dysphania ambrosioides</i> corados Tricrômero de Masson (40x)	117-118
Figura 16	Fotomicrografia de cortes histológicos pulmonares de camundongos infectados ou não por <i>Schistosoma mansoni</i> , e tratados ou não com extrato hidroalcoólico de <i>Dysphania ambrosioides</i> corados picrosirius red (20x)	119-120

LISTA DE TABELAS DO CAPÍTULO 2

Tabela 1	Valores das concentrações do extrato hidroalcoólico de <i>Dysphania ambrosioides</i> capazes de inibir 50% de viabilidade dos vermes machos de <i>S. mansoni</i> em diferentes horas	94
Tabela 2	Atividades biológicas de Kaempferol previstas pelo software de espectro para substâncias	96
Tabela 3	Predição ADME de Kaempferol	97
Tabela 4	Descrição da proteína alvo e receptor relacionados aos mecanismos de ação de kaempferol no estudo de docking molecular	97
Tabela 5	Energia de ligação e RMSD entre os complexos de ligação alvo-ligante	98-99
Tabela 6	Análise histopatológica do tecido hepático de camundongos infectados ou não por <i>Schistosoma mansoni</i> , e tratados ou não com extrato hidroalcoólico de <i>Dysphania ambrosioides</i>	100
Tabela 7	Análise histopatológica do tecido intestinal de camundongos infectados ou não por <i>Schistosoma mansoni</i> , e tratados ou não com extrato hidroalcoólico de <i>Dysphania ambrosioides</i>	107
Tabela 8	Análise histopatológica do tecido pulmonar de camundongos infectados ou não por <i>Schistosoma mansoni</i> , e tratados ou não com extrato hidroalcoólico de <i>Dysphania ambrosioides</i>	115

LISTA DE FIGURAS DO CAPÍTULO 3

Figura 1	Efeito do tratamento com extrato hidroalcoólico bruto de <i>Dysphania ambrosioides</i> sobre eosinófilos sanguíneos	145
Figura 2	Concentrações séricas de IgE total de camundongos infectados ou não por <i>Schistosoma mansoni</i> , e tratados ou não com extrato hidroalcoólico de <i>Dysphania ambrosioides</i>	146
Figura 3	Efeito do tratamento com extrato hidroalcoólico bruto de <i>Dysphania ambrosioides</i> nos níveis de citocinas de respostas Th1 (A), Th2 (B) e Th17 (C) em sobrenadante da cultura de células do baço de camundongos infectados com <i>Schistosoma mansoni</i>	147
Figura 4	Correlação entre citocinas de resposta Th1 e dados histomorfométricos de tecido hepático em animais infectados por <i>Schistosoma mansoni</i> e tratados ou não	148
Figura 5	Correlação entre citocinas de resposta Th2 e dados histomorfométricos de tecido hepático em animais infectados por <i>Schistosoma mansoni</i> e tratados ou não	149
Figura 6	Correlação entre citocinas de resposta Th17 e dados histomorfométricos de tecido hepático em animais infectados por <i>Schistosoma mansoni</i> e tratados ou não	149
Figura 7	Correlação entre citocinas de resposta Th1 e dados histomorfométricos de tecido intestinal em animais infectados por <i>Schistosoma mansoni</i> e tratados ou não	150
Figura 8	Correlação entre citocinas de resposta Th2 e dados histomorfométricos de tecido intestinal em animais infectados por <i>Schistosoma mansoni</i> e tratados ou não	151
Figura 9	Correlação entre citocinas de resposta Th17 e dados histomorfométricos de tecido intestinal em animais infectados por <i>Schistosoma mansoni</i> e tratados ou não	151
Figura 10	Correlação entre citocinas de resposta Th1 (A), Th2 (B) e Th17 (C) e dados histomorfométricos de tecido pulmonar em animais infectados por <i>Schistosoma mansoni</i> e tratados ou não	152

Figura 11	Correlação entre eosinófilos sanguíneos e dados histomorfométricos de tecido hepático em animais infectados por <i>Schistosoma mansoni</i> e tratados ou não	153
Figura 12	Correlação entre eosinófilos sanguíneos e dados histomorfométricos de tecido intestinal em animais infectados por <i>Schistosoma mansoni</i> e tratados ou não	153
Figura 13	Correlação entre eosinófilos sanguíneos e dados histomorfométricos de tecido pulmonar em animais infectados por <i>Schistosoma mansoni</i> e tratados ou não	154
Figura 14	Correlação entre os níveis de IgE Total e dados histomorfométricos de tecido hepático em animais infectados por <i>Schistosoma mansoni</i> e tratados ou não	154
Figura 15	Correlação entre os níveis de IgE Total e dados histomorfométricos de tecido intestinal em animais infectados por <i>Schistosoma mansoni</i> e tratados ou não	155
Figura 16	Correlação entre IgE Total e dados histomorfométricos de tecido pulmonar em animais infectados por <i>Schistosoma mansoni</i> e tratados ou não	155

RESUMO

A esquistossomose é uma doença negligenciada, de grande importância para a saúde pública no mundo, que pode ser causada pelo helminto da espécie *Schistosoma mansoni*. O tratamento da enfermidade baseia-se no uso do medicamento praziquantel. Porém, essa droga possui algumas desvantagens, como baixa eficácia nas fases jovens do parasito (esquistossômulos) e incapacidade de reverter lesões inflamatórias induzidas pela formação de granulomas. Por isso, há necessidade do desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas para controlar e evitar as formas graves da doença. Nesse sentido, o objetivo deste trabalho foi revisar o uso de produtos vegetais no tratamento da esquistossomose e investigar se o tratamento com extrato de *Dysphania ambrosioides* induz alterações imunológicas e histopatológicas no desenvolvimento de granulomas no fígado, intestino e pulmão de camundongos infectados e tratados em diferentes fases da infecção experimental. Os resultados desta tese foram apresentados em 03 (três) capítulos. No capítulo 1 fizemos uma revisão narrativa sobre os efeitos imunomoduladores e antiparasitários de produtos naturais, oriundos de espécies vegetais, e seus constituintes majoritários no tratamento da esquistossomose, realizado a partir de pesquisas encontradas nos bancos de dados PubMed, LILACs e MEDLINE no período de 2008 a 2021. Foi evidenciado que o tratamento com extratos de espécies vegetais atua diretamente no parasito, diminuindo as chances de sobrevivência, o que reduz o número de ovos e granulomas no hospedeiro vertebrado. O tratamento com os produtos naturais também reduz os níveis de citocinas pró-inflamatórias, além de ativar neutrófilos, macrófagos, linfócitos T e células B, o que melhora a patogênese da doença, garantindo a sobrevivência do hospedeiro. No capítulo 2 avaliamos o efeito do extrato hidroalcolico de *D. ambrosioides* (EHDA) sobre a oviposição e patologia da infecção. Para isso, foi avaliado *in vitro* a ação do extrato de *D. ambrosioides* sobre a mortalidade e a oviposição de vermes adultos de *S. mansoni*. Com o intuito de compreender as possíveis causas de inibição da oviposição do parasito, foram realizadas avaliações *in silico* a partir do constituinte majoritário do extrato, o kaempferol, sendo previstas suas atividades biológicas e seu potencial alvo molecular no parasito *S. mansoni*. Adicionalmente, foram feitas avaliações do tratamento *in vivo*, em cada uma das fases do desenvolvimento de *S. mansoni* (fase cutânea, pulmonar, vermes imaturos e vermes maduros) utilizando camundongos, infectados com 50 cercárias e eutanasiados com 60 dias pós-infecção. Nas avaliações *in vitro*, o EHDA apresentou atividade esquistossomicida e inibiu a oviposição dos vermes fêmeas. O tratamento com EHDA reduziu tamanho e número de granulomas, além de lesões histopatológicas nos tecidos hepático, intestinal e pulmonar, demonstrando uma melhor organização da resposta granulomatosa. Houve predominância de fibras colágenas do tipo I nos tecidos de camundongos tratados com EHDA. O capítulo 3 consistiu na avaliação sobre a dinâmica de associação imunológica e histomorfométrica em granulomas de camundongos infectados e tratados ou não com EHDA por meio de experimentações *in vivo*. O EHDA reduziu eosinófilos sanguíneos e níveis de IgE, embora sem associação significativa com a área e número de granulomas. Em relação aos níveis das citocinas, as de respostas Th2 e Th17 foram reduzidas ao longo das fases do desenvolvimento de *S. mansoni*. Notavelmente, ocorreu associação negativa entre as respostas Th1 e Th17 com a área e número de granulomas hepáticos e intestinais. Esses resultados demonstram que o EHDA possui potencial terapêutico contra a esquistossomose, atuando em diversos aspectos, desde a mortalidade do parasito até a modulação da resposta imunológica do hospedeiro. Portanto, são um passo importante para propor novas terapias para esquistossomose, em especial com os produtos naturais sobre a formação dos granulomas, que constituem a principal patologia da parasitose.

Palavras-chave: Efeito imunomodulador; Esquistossomicida; Mastruz; Quimioterapia.

ABSTRACT

Schistosomiasis is a neglected disease, of great importance for public health in the world, which can be caused by the helminth species *Schistosoma mansoni*. The treatment of the patient is based on the use of the drug praziquantel. However, this drug has some disadvantages, such as low efficacy in the young stages of the parasite (schistosomula) and inability to reverse inflammatory lesions induced by the formation of granulomas. Therefore, there is a need to develop new therapeutic alternatives to control and prevent severe forms of the disease. In this sense, the objective of this work was to review the use of plant products in the treatment of schistosomiasis and to investigate whether treatment with *Dysphania ambrosioides* extract induces immunological and histopathological changes in the development of granulomas in the liver, intestine and lung of mice infected and treated in different phases of experimental infection. The results of this thesis are presented in 03 (three) chapters. In chapter 1 we made a narrative review on the immunomodulatory and antiparasitic effects of natural products, originating from plant species, and their major constituents in the treatment of schistosomiasis, carried out based on research found in the PubMed, LILACs and MEDLINE databases in the period 2008 to 2021. It was shown that treatment with extracts from plant species acts directly on the parasite, reducing the chances of survival, which reduces the number of eggs and granulomas in the vertebrate host. Treatment with natural products also reduces the levels of pro-inflammatory cytokines, in addition to activating neutrophils, macrophages, T lymphocytes and B cells, which improves the pathogenesis of the disease, ensuring host survival. In chapter 2 we evaluate the effect of the hydroalcoholic extract of *D. ambrosioides* (EHDA) on oviposition and infection pathology. To this end, the effect of the *D. ambrosioides* extract on the mortality and oviposition of adult *S. mansoni* worms was evaluated *in vitro*. In order to understand the possible causes of inhibition of parasite oviposition, *in silico* evaluations were carried out using the majority constituent of the extract, kaempferol, and its biological activities and potential molecular target in the *S. mansoni* parasite were predicted. Additionally, *in vivo* treatment evaluations were carried out in each of the development phases of *S. mansoni* (cutaneous, pulmonary, immature worms and mature worms) using mice, infected with 50 cercariae and euthanized 60 days post-infection. *In vitro* evaluations, EHDA showed schistosomicidal activity and inhibited the oviposition of female worms. Treatment with EHDA reduced the size and number of granulomas, as well as histopathological lesions in the liver, intestinal and lung tissues, demonstrating a better organization of the granulomatous response. There was a predominance of type I collagen fibers in the tissues of mice treated with EHDA. Chapter 3 consisted of the evaluation of the dynamics of immunological and histomorphometric association in granulomas from mice infected and treated or not with EHDA through *in vivo* experiments. EHDA reduced blood eosinophils and IgE levels, although without significant association with the area and number of granulomas. Regarding cytokine levels, Th2 and Th17 responses were reduced throughout the development phases of *S. mansoni*. Notably, there was a negative association between Th1 and Th17 responses with the area and number of hepatic and intestinal granulomas. These results demonstrate that EHDA has therapeutic potential against schistosomiasis, acting in several aspects, from parasite mortality to modulation of the host's immune response. Therefore, they are an important step towards proposing new therapies for schistosomiasis, especially with natural products on the formation of granulomas, which constitute the main pathology of schistosomiasis.

Keywords: Immunomodulatory effect; Schistosomicide; Mastruz; Chemotherapy; Immune response.

1 INTRODUÇÃO

A esquistossomose é uma doença tropical negligenciada, causada por trematódeos do gênero *Schistosoma*, que afeta aproximadamente 240 milhões de pessoas em escala global, predominantemente em regiões da África, Ásia, Oriente Médio e América do Sul (MCMANUS et al., 2018; WHO, 2022). No Brasil, a espécie *S. mansoni* é a única responsável pela transmissão da esquistossomose, com estimativas de que 25 milhões de pessoas vivem em áreas endêmicas (NASCIMENTO; OLIVEIRA, 2014). No Nordeste brasileiro, o Maranhão está entre os estados endêmicos, com casos comprovados em 20 dos 217 municípios e, em 29 deles, foram relatados focos da parasitose (SANTOS; MELO, 2011; CANTANHEDE et al., 2014).

O ciclo de vida de *S. mansoni* ocorre pela penetração ativa de larvas cercárias do parasito na pele do hospedeiro vertebrado, que inclui o ser humano (HAMS et al., 2013). As cercárias se diferenciam em esquistossômulos e migram, via circulação sanguínea, até a veia porta hepática, onde se tornam vermes adultos e entram em maturação para oviposição (SCHWARTZ; FOLLON, 2018). Os ovos podem ser eliminados nas fezes do hospedeiro ou ficarem retidos na mucosa intestinal, sendo, em grande parte, carregados para o fígado, induzindo uma intensa resposta inflamatória, conhecida por granuloma, que contribui para evolução dos casos graves da doença (HAMS et al., 2013).

Como resposta a infecção por *S. mansoni* nos vertebrados, são acionados complexos mecanismos imunológicos (HAMS et al., 2013). Nas primeiras 12 horas após a penetração das larvas cercárias, ocorre uma reação inflamatória dérmica e subdérmica, conhecida por dermatite cercariana, principalmente em indivíduos de áreas endêmicas (SOUZA et al., 2011). Posteriormente, na fase pré-postural do parasito, também conhecida como fase toxêmica, há predominância de uma resposta imune tipo T *helper*-1 (Th1), caracterizada pela produção de citocinas pró-inflamatórias como IL-1, IL-2, IL-6, IL-12, TNF- α e IFN- γ , que ativam células imunes inatas, dentre elas os macrófagos de perfil M1, produtor de óxido nítrico (NO) (TURNER et al., 2011). Com a oviposição de *S. mansoni*, são secretados antígenos responsáveis pela polarização da resposta imune para o tipo Th2, que induz a produção de citocinas como IL-4, IL-5 e IL-13, que são responsáveis pela modulação da resposta Th1, pela formação de granulomas e pela produção de anticorpos IgG4 e IgE, além da diferenciação de eosinófilos e macrófagos alternativamente ativados (M2) (BARRON; WIN, 2011; HAMS et al., 2013; SOUZA et al., 2011). Entre 11 e 12 semanas pós-infecção, a fase crônica da esquistossomose começa a ser estabelecida, sendo caracterizada pela redução da resposta Th2 e diminuição da inflamação granulomatosa em torno dos ovos, emergindo uma rede regulatória de células,

especialmente linfócitos T e B (Treg/Breg), envolvendo a produção de IL-10 e levando a redução da produção de citocinas de respostas Th1 e Th2 (CHUAH et al., 2014; VAN DER VLUGT et al., 2012).

Em relação a quimioterapia esquistossomótica, o medicamento Praziquantel (PQZ) tem sido a droga de escolha há mais de 30 anos (NOGUEIRA et al., 2023). No entanto, estudos concentrados em entender os mecanismos de ação do PZQ demonstram que parasitos jovens são menos suscetíveis ao medicamento do que os vermes adultos e que existem problemas relacionados a redução de suscetibilidade dos esquistossomos em diversas regiões endêmicas (SETO et al., 2011; WANG et al., 2012). Além do fato da droga não ser capaz de reverter sequelas patológicas promovidas pela parasitose, como a formação de granulomas e fibrose periportal (COLLEY et al., 2014). Diante da problemática, a busca por novas abordagens terapêuticas para a esquistossomose é necessária.

Extratos de espécies vegetais vêm sendo amplamente avaliados para a terapia da esquistossomose e parecem ser uma alternativa promissora (MOLGAARD et al., 2001; YOUSIF et al., 2012). O nosso grupo de pesquisa do Laboratório de Imunofisiologia – UFMA, já vem estudando há alguns anos a espécie vegetal *Dysphania ambrosioides*, designada comumente como mastruz, que é largamente utilizada pela população do estado do Maranhão para diversos fins (NASCIMENTO, 2014), e possui uma grande variedade de atividades biológicas comprovadas, tais como: efeito analgésico (SOUSA et al., 2012), anti-inflamatório (PEREIRA, 2009), antisséptico (RIOS et al., 2017) e cicatrizante (NASCIMENTO, 2014). O efeito antiparasitário do extrato hidroalcólico de *D. ambrosioides* (EHDA) já foi evidenciado no tratamento de leishmaniose (PATRÍCIO et al., 2008), malária (CYSNE et al., 2016) e esquistossomose (RODRIGUES et al., 2020).

No estudo de Rodrigues et al. (2020) foi demonstrado, por meio de avaliações *in vivo*, que o tratamento com extrato hidroalcólico de *D. ambrosioides* induziu mudanças favoráveis no hospedeiro vertebrado em termos parasitológicos e imunopatológicos. Os autores evidenciaram que o tratamento com *D. ambrosioides* em animais infectados contribuiu para a redução da área do granuloma e em sua quantidade sobre o tecido hepático, modulando favoravelmente a resposta imune granulomatosa, não causando danos exacerbados ao tecido dos animais (RODRIGUES et al., 2020). Estes resultados foram verificados mesmo quando o tratamento foi realizado ainda no início da infecção, sugerindo fortemente que o mastruz possui efeito esquistossomicida mesmo quando o tratamento é realizado nos estágios iniciais da infecção, diferente do PZQ.

Entretanto, os dados de Rodrigues et al. (2020) não demonstraram a ação de EHDA sobre a oviposição de *S. mansoni*, nem possíveis mudanças conformacionais e celulares nos granulomas de tecidos intestinais, hepáticos e pulmonares, além dos mecanismos de resposta imunológica que podem promover essas alterações granulomatosas, proporcionadas pelo tratamento com o extrato vegetal. Baseado nessas lacunas, ficou evidente a necessidade de melhor explorar os efeitos de EHDA sobre a oviposição de *S. mansoni in vitro* e sobre as alterações histopatológicas nos tecidos hepáticos, intestinais e pulmonares associados aos mecanismos de modulação da resposta imune induzidos pelo tratamento com o extrato.

Por isso, elaboramos a hipótese que o tratamento oral com extrato hidroalcólico das folhas de *D. ambrosioides* reduz a oviposição de *S. mansoni* e o tamanho dos granulomas hepáticos, intestinais e pulmonares, associado à alteração de sua celularidade e deposição de fibras colágenas, via indução de mecanismos imunes regulatórios na fase aguda da infecção por *S. mansoni*.

Este conhecimento pode fornecer uma abordagem terapêutica valiosa para a esquistossomose mansoni, uma doença endêmica no Maranhão e de grande relevância no contexto de saúde pública mundial, contribuindo para melhorar as medidas de controle e tratamento da infecção em humanos, e para a elucidação de mecanismos imunoparasitológicos envolvidos na formação dos granulomas da infecção por *S. mansoni*.

Os resultados obtidos com esta pesquisa, encontram-se apresentados na forma de três artigos. O primeiro é uma revisão narrativa sobre os efeitos imunomodulador e antiparasitários de extratos de espécies vegetais no tratamento da esquistossomose, que foi publicado no Brazilian Journal of Pharmacognosy, de Qualis A3 e fator de impacto 2.464. O segundo aborda uma investigação *in vitro* sobre os efeitos esquistossomicida e inibitório de oviposição de EHDA sobre *S. mansoni*; avaliações *in silico* a partir do constituinte majoritário do extrato, o kaempferol, para entender as possíveis causas de inibição da oviposição; além de uma abordagem *in vivo* sobre parâmetros imunológicos e histopatológicos nos tecidos hepáticos, intestinais e pulmonares. O capítulo 3 buscou analisar a dinâmica da infecção em relação aos parâmetros imunológicos e histomorfométricos nos animais tratados em diferentes fases do ciclo evolutivo de *S. mansoni*.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Distribuição da esquistossomose

A esquistossomose é uma infecção parasitária causada por trematódeos do gênero *Schistosoma*, sendo uma das mais negligenciadas doenças tropicais e um grande problema de saúde pública em 78 países em desenvolvimento localizados nos trópicos e subtropicais (BRUUN; AAGAARD-HANSEN, 2008; WHO, 2022). O número de indivíduos infectados varia, possivelmente, entre 391 e 587 milhões, ao levar em consideração as subnotificações e erros no diagnóstico, sendo a esquistossomose responsável por cerca de 300.000 mortes por ano (BUSTINDUY; KING, 2014; DIAS JURBERG et al., 2018). Ela é de particular importância na África e América do Sul, devido à sua endemicidade, alta prevalência e taxas de morbidade em países como a Nigéria, Tanzânia, República Democrática do Congo, Gana, Suriname, Venezuela, Caribe e Brasil (ALEBIE et al., 2014; WHO, 2022) (Figura 1).

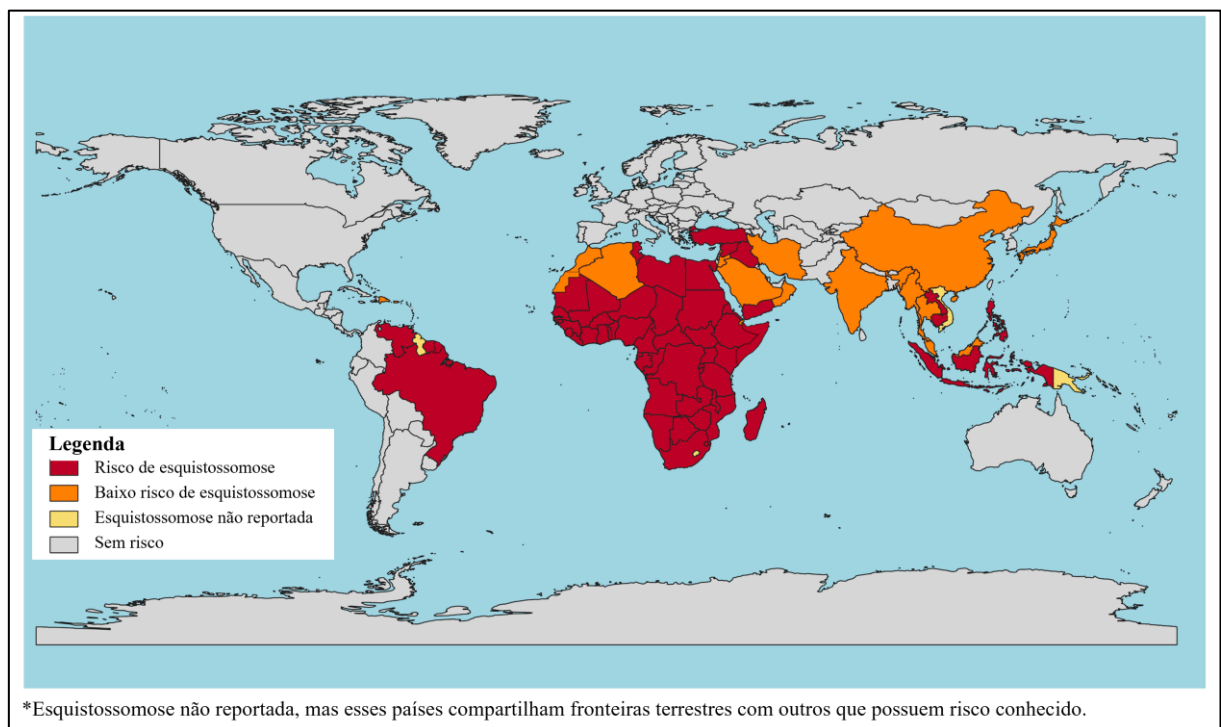


Figura 1. Distribuição e situação de risco da esquistossomose em humanos em nível global. Fonte: Adaptado de WHO, 2022.

Existem sete espécies de *Schistosoma* que podem infectar o homem, são elas: *S. mansoni* Sambon, 1907, *S. hematobium* Bilhartz, 1852, *S. japonicum* Katsurada, 1904, *S. intercalatum* Fischer, 1934, *S. mekongi* Voge & Bruce, 1978, *S. malayensis* Greer & Yong, 1988 e *S.*

guineensis, Page`s et al., 2003; porém somente a primeira tem ocorrência registrada na região brasileira (BROWN, 2014).

No Brasil, provavelmente a esquistossomose foi introduzida a partir do tráfico de escravos da África oriundos da costa da Guiné, Angola, Moçambique e antigo Congo, que em razão do fluxo migratório, propagou-se para o restante do continente asiático, Oriente Médio e hemisfério ocidental, em regiões da América do Sul e em algumas ilhas caribenhas (GENTILE et al., 2010). Hoje, sabe-se que a esquistossomose ocorre amplamente em todo o Brasil, afetando aproximadamente 6 milhões de habitantes com suas formas mais graves (ROLLEMBERG et al., 2011). Além disso, aproximadamente 25 milhões de pessoas vivem em áreas onde há risco de transmissão (NASCIMENTO; OLIVEIRA, 2014; ROLLEMBERG et al., 2011), localizadas principalmente no Nordeste brasileiro (PARAENSE, 2001; WHO, 2020).

A esquistossomose *mansoni* nos estados brasileiros está disseminada em uma vasta área endêmica, que vai do Maranhão ao Espírito Santo e Minas Gerais (NOYA et al., 2015). Existem focos registrados exclusivamente isolados no Distrito Federal e nos estados do Pará, Piauí, Goiás, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul (BRASIL, 2017). Há, também, casos importados de área endêmica registrados em quase todo território nacional, em especial nos estados que são considerados pontos de migração, como Rondônia (COURA; AMARAL, 2004).

No Maranhão, esta parasitose constitui-se como um grave problema de saúde pública, exibindo focos em 29 municípios do estado (CANTANHEDE et al., 2014). Na região, a doença apresenta endemicidade, especialmente na Baixada Maranhense, onde são encontradas localidades com altas prevalências, tanto em humanos como em hospedeiros não humanos, representados por roedores (CANTANHEDE et al., 2014; LIRA et al., 2017). Além do mais, é uma das regiões economicamente mais pobres do Maranhão (WHO, 2020), apresentando comunidades agrícolas e pesqueiras que não têm acesso a água potável e saneamento básico.

2.2 Ciclo evolutivo de *Schistosoma mansoni*

O parasito *S. mansoni* apresenta um ciclo de vida complexo (Figura 2), envolvendo hospedeiros definitivos vertebrados e intermediários invertebrados, além do ambiente externo (HAMS et al., 2013). O ciclo inclui uma reprodução sexuada dos vermes adultos no sistema vascular humano e uma fase assexuada nos caramujos, que são os hospedeiros intermediários (SAH et al., 2015; MCMANUS et al., 2018)

O ciclo de transmissão do parasito inicia-se quando, em contato com a água doce, ovos viáveis de *S. mansoni* contidos nas fezes, eclodem, liberando larvas ciliadas de natação livre chamadas miracídios, infectantes para os caramujos (NELWAN, 2019). Os hospedeiros intermediários de *S. mansoni* são representados pelos caramujos pertencentes ao gênero *Biomphalaria* Preston, 1910 (JARNE et al., 2011), e somente três espécies: *B. glabrata* Say, 1818, *B. tenagophila* Orbigny, 1835 e *B. Straminea* Dunker, 1848, foram encontradas naturalmente infectadas e são de importância na transmissão da esquistossomose no território nacional (PARAENSE, 1972; PARAENSE, 2004). Nos caramujos, os miracídios transformam-se em esporocistos I, onde cada um por poliembrionia originam 150 a 200 esporocistos II (MOUAHID et al., 2018; NELWAN, 2019), que migram para as glândulas digestivas e ovoteste do molusco, dando origem as cercárias, larvas de cauda bifurcada, infecciosas para o ser humano, que são libertadas a partir dos moluscos na água em torno de 30 dias pós-infecção (BUSTINDUY; KING, 2014). As cercárias nadam ativamente em direção a um hospedeiro humano, ondem penetram diretamente na pele (BUSTINDUY; KING, 2014).

No processo de penetração na pele do hospedeiro vertebrado, as cercárias perdem a cauda e permanecem na derme ou tecido conjuntivo por dois ou três dias, sofrendo modificações e, posteriormente, dando origem ao esquistossômulo de pele (ROSS et al., 2007; WHITFIELD et al., 2003). Esse esquistossômulo atinge a corrente sanguínea, sendo conduzido para o lado direito do coração, de onde será bombeado para os pulmões, passando a ser denominado de esquistossômulo pulmonar (LEE et al., 2014; SANTOS, 2011).

Aproximadamente duas semanas após a infecção, os esquistossômulos retornam ao coração e podem ser conduzidos rapidamente ao sistema porta-hepático, ou permanecer circulando sistemicamente por vários órgãos antes de atingirem artérias que derivam no mesmo sistema (LENZI et al., 2008; LEE et al., 2014).

Após cerca de 30 dias, os esquistossômulos tornam-se vermes adultos e acasalam-se, migrando para as veias mesentéricas, onde realizam a oviposição (ANDRADE et al., 2014; BUSTINDUY, KING, 2014). Esquistossomos fêmeas produzem cerca de 300 ovos por dia que são colocados na circulação mesentérica (SANTOS, 2011; ANDRADE et al., 2014; BUSTINDUY; KING, 2014; STEINAUER, 2009). Em média, depois de 40 dias de infecção, os ovos que ficam retidos no intestino induzem respostas inflamatórias que facilitam a passagem dos mesmos por meio da parede intestinal diretamente para o lúmen, favorecendo sua saída para o ambiente externo inseridos nas fezes, reiniciando o ciclo (LEE et al., 2014; MCMANUS et al., 2018). Ovos que passam pela parede intestinal e são eliminados nas fezes, podem ser depositados em água doce. No entanto, a maioria dos ovos também podem se alojar

no intestino, fígado ou outros órgãos, ocasionando morbidade e mortalidade associadas à esquistossomose mansoni (SAH et al., 2015; SANTOS, 2011; TURNER et al., 2013).

Os ovos que ficam aprisionados nos tecidos induzem inflamação, a formação de granulomas e fibrose, caracterizando o quadro clínico que inclui lesões vasculares obstrutivas, hepatoesplenomegalia, fibrose hepática, hipertensão portal, ascite e sangramento fatal de lesões esofagogástricas (WILSON et al., 2007). A gravidade do quadro clínico é proporcional à carga parasitária e à resposta imune do hospedeiro vertebrado aos antígenos do parasito (JAURÉGUIBERRY et al., 2010).

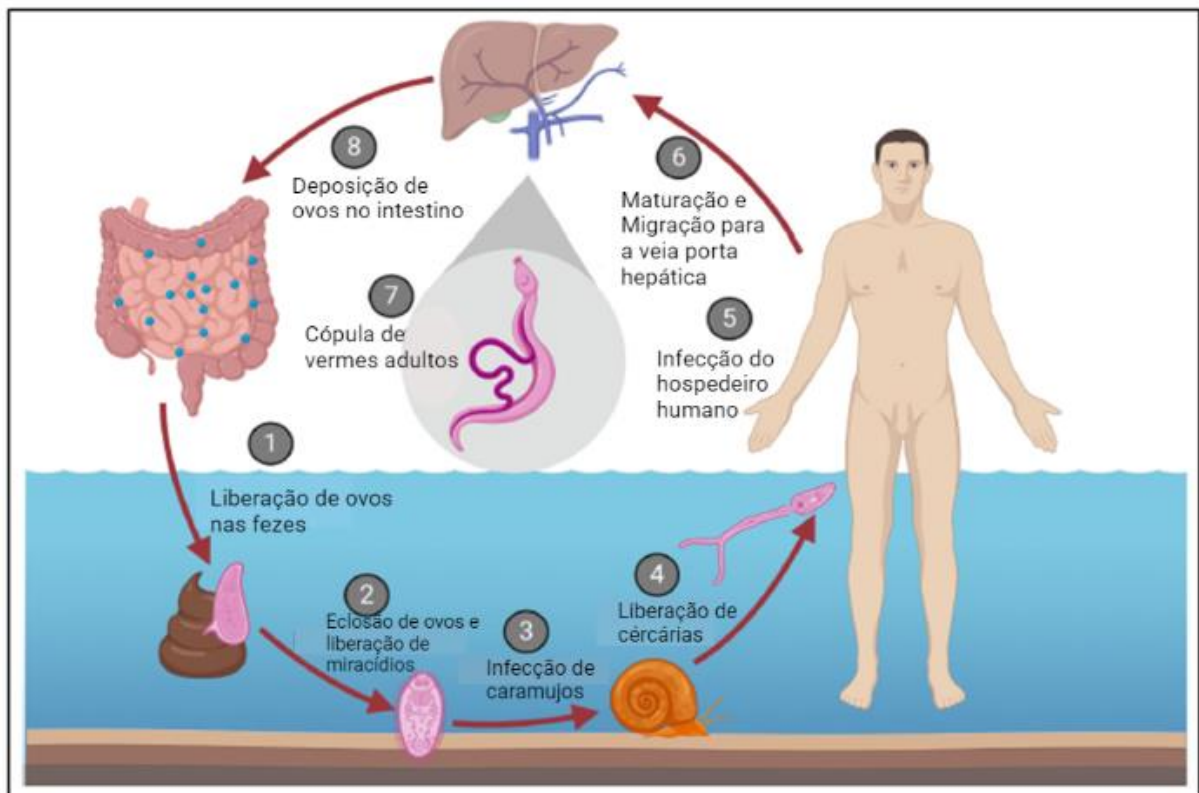


Figura 2. Ciclo biológico de *Schistosoma mansoni*. Ovos viáveis de *S. mansoni* são liberados nas fezes de um hospedeiro definitivo (1), quando em contato com a água, os ovos eclodem e liberam as larvas miracídeos (2) que infectam os caramujos (*Biomphalaria* spp.) (3). No interior dos caramujos, os miracídeos transformam-se em esporocistos I, que por poliembrião produzem esporocistos II. Após aproximadamente 30 dias pós-infecção, os esporocistos II produzem cercárias, que são eliminadas dos caramujos por estimulação luminosa e térmica (4). As cercárias nadam ativamente para infectar o hospedeiro vertebrado, penetrando na pele e nas membranas mucosas e, posteriormente, se transformando em esquistossômulos (5). Os esquistossômulos atingem a corrente sanguínea, sendo conduzidos passivamente ao coração e depois aos pulmões. Após, os vermes migram para o sistema porta hepático e se tornam adultos (6). Os vermes adultos acasalam (7) e seguem para o intestino, onde depositam ovos que podem ser eliminados nas fezes (8), completando o ciclo de vida do parasito. Fonte: Adaptado de Cleenewerk et al. (2020).

2.3 Imunopatogênese da esquistossomose

O processo patológico básico da esquistossomose inclui fases aguda e crônica, que estão associadas à migração, maturação, postura dos ovos do parasito e evolução dos granulomas teciduais (CALDAS et al., 2008; GRYSEELS, 2012). A infecção aguda da esquistossomose se caracteriza por fases pré-patente (antes do aparecimento dos ovos nas fezes) e fase pós-postural. Durante a progressão da doença, para a regulação da resposta imune, as células Th são ativadas e diferenciadas em subconjuntos efetores distintos, incluindo células Th1, Th2, Th17, Tfh, Th9 e Treg (ZHENG et al., 2020) (Figura 3).

No estágio pré-patente, conhecido como febre de Katayama ou fase toxêmica, ocorre sinais inespecíficos como febre repentina, fadiga, urticária, eosinofilia e sensibilidade abdominal, que aparecem com mais frequência em paciente primo-infectados, e geralmente antes do aparecimento de ovos nas fezes (COLLEY et al., 2014; ROSS et al., 2007). Nesse período ocorre a maturação e migração dos esquistossômulos pela pele, e posteriormente coração e pulmão, por meio da corrente sanguínea. Este período pode variar entre 40 e 60 dias (GRYSEELS, 2012; HAMS et al., 2013).

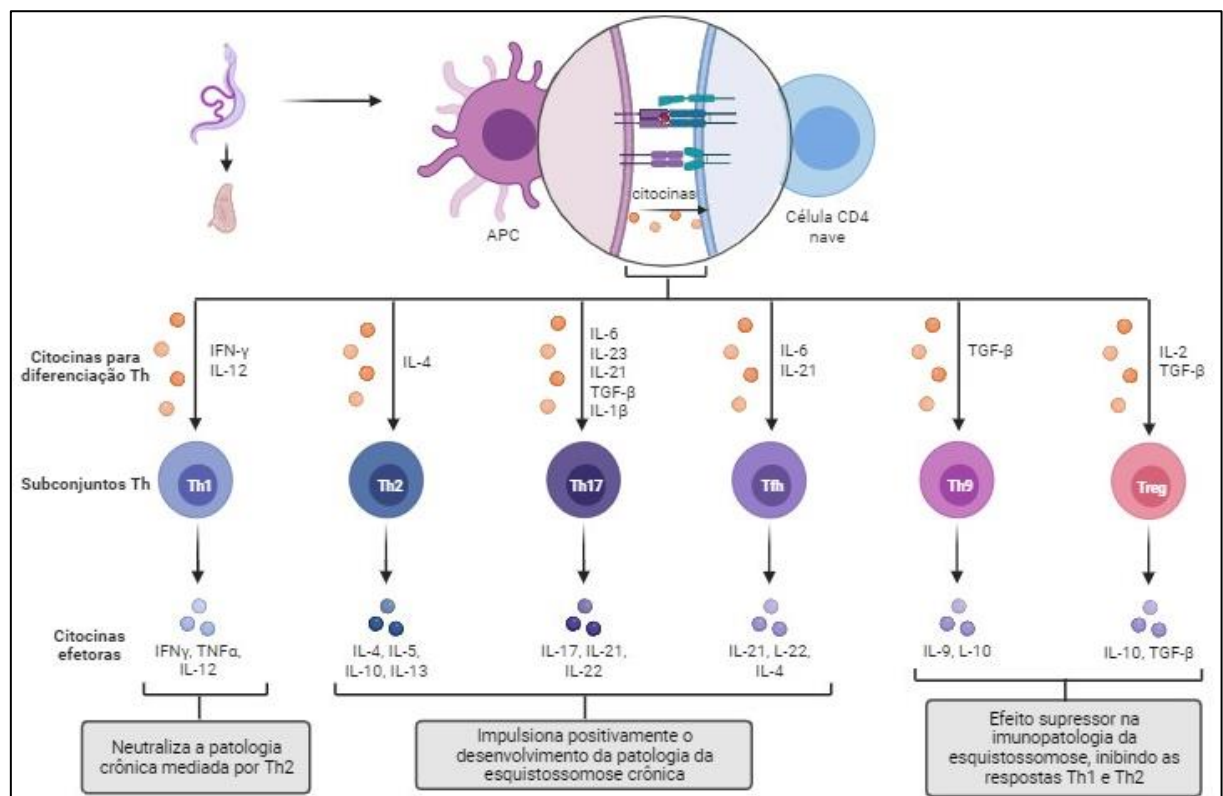


Figura 3. Células T helper (Th) ativadas e diferenciadas nos subconjuntos Th1, Th2, Th17, Tfh, Th9 e Treg, que regulam a resposta imune durante a infecção por *Schistosoma mansoni*. As citocinas liberadas pelos

subconjuntos desempenham importantes papéis na imunopatogênese da esquistossomose, podendo neutralizar a patologia crônica da doença (Th1), impulsionar positivamente o desenvolvimento do estágio crônico da esquistossomose (Th2, Th17, Tfh e Th9) ou exercer efeito supressor por meio da inibição das respostas Th1 e Th2 (Tregs). Fonte: Adaptado de Aziz et al., 2022.

Por volta da 3ª e 5ª semana, período em que o hospedeiro vertebrado infectado está exposto à migração de parasitos imaturos, transcorre a ativação de uma resposta imune com predomínio do perfil de linfócitos Th1, havendo a liberação de citocinas pro-inflamatórias, como interleucina-1 (IL-1), IL-2, IL-6, IL-12, fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α) e interferon-gama (IFN- γ), que ativam células imunes inatas, especialmente macrófagos (Figura 4) (HELMY et al., 2005; PEARCE et al., 2004). Estes macrófagos classicamente ativados (M1) possuem grande capacidade de apresentação antigênica e, neste primeiro momento, ocorre aumento da atividade fagocitária dessas células e alta produção de derivados de oxigênio e nitrogênio, como óxido nítrico (NO), que podem atuar no controle do desenvolvimento do parasito, bem como na lesão tecidual e na indução de sinais inflamatórios sistêmicos (BARRIE et al., 2012; MANTOVANI, 2013).

Quando o parasito amadurece e começa a produzir ovos, por volta da 5ª a 6ª semanas pós-infecção, os antígenos derivados dos ovos do parasito são indutores potentes e independentes das respostas de células T do tipo 2 (LAYLAND et al., 2010). A indução dessa resposta, é responsável por uma mudança de perfil das respostas sistêmicas das células T durante a infecção do esquistossomo, que passa de um perfil Th1, a um predomínio do perfil Th2, em 8 semanas pós-infecção (PEARCE; MACDONALD, 2002). Na resposta Th2 ocorre a produção de citocinas como IL-4, IL-5, IL-13 e IL-10, responsáveis pela regulação negativa da resposta Th1 e pelo estímulo para produção de anticorpos IgG4 e IgE (PEARCE; MACDONALD, 2002), maturação de eosinófilos e macrófagos alternativamente ativados (M2) (Figura 4) (SCHWARTZ et al., 2014).

Por volta da 6ª a 8ª semanas, ocorre o pico da fase pós-postural, que é caracterizada pela formação de granulomas em torno de ovos nos tecidos, geralmente no fígado e intestino, o que induz a principal patologia associada a esquistossomose em hospedeiros vertebrados (PEARCE; MACDONALD, 2002; BURKE et al., 2009; LUNDY; LUKACS, 2013). Granulomas são caracterizados por um crescimento central de células mononucleares, como macrófagos alternativamente ativados (M2), com uma borda circundante contendo fibroblastos e linfócitos (ALMEER et al., 2018). A formação granulomatosa é principalmente orquestrada por células T CD4, no entanto, células T CD8, células B, macrófagos M2 e eosinófilos também

tem papel em sua formação (HAMS et al., 2013; ZHU et al., 2015). A reação granulomatosa tem uma função protetora vital nos tecidos hospedeiros, pois é capaz de sequestrar os antígenos liberados pelos ovos evitando sua ação tóxica nos tecidos (HAMS et al., 2013). No entanto, se a resposta imune do tipo 2 não for bem modulada, pode ocorrer acúmulo de colágeno nos tecidos, seguido pela evolução da fibrose e mortalidade durante a fase crônica da infecção (HESSE et al., 2001). Desse modo, o perfil Th2 induz uma resposta celular tecidual rica em macrófagos, eosinófilos e fibroblastos em torno dos ovos de *S. mansoni*, denominada de granuloma, que pode evoluir para fibrose, caracterizando a fase crônica da infecção (CHEEVER et al., 2000; HAMS et al., 2013).

Dentre as citocinas de perfil Th2 que possuem um papel na evolução da fibrose, destaca-se a IL-13. Estudos *in vitro* revelaram que IL-13 estimula a produção de colágeno em fibroblastos e tem um papel direto na homeostase do colágeno de humanos (CHIARAMONT et al., 1999; ORIENTE et al., 2000). O bloqueio de IL-13 mostrou ser altamente eficaz no tratamento de fibrose em infecção por *S. mansoni* estabelecida ou em curso em modelo experimental (CHIARAMONTE et al., 2001; WYNN, 2003). Além disso, camundongos deficientes em IL-13 exibem maior tempo de sobrevivência, demonstrando o importante papel da citocina na patogênese da esquistossomose (FALLON, 2000). Alguns mediadores, como IL-12, TNF- α , óxido nítrico (NO) e IFN- γ evitam a produção do excesso de IL-13 durante a infecção por *S. mansoni* em modelo experimental (FALLON et al., 2000).

Estudos em camundongos e humanos com esquistossomose identificaram o papel anti-fibrótico do IFN- γ , por meio da sua atuação na inibição da produção de Proteínas da Matriz Extracelular (ECMP) pelas células estreladas (REEVES; FRIEDMAN, 2002). Com isso, ocorreria a síntese de metaloproteinases (MP), que aumenta a atividade das collagenases do fígado e inibe a síntese dos inibidores teciduais das metaloproteinases (TIMPs) (DESSEIN et al., 1999; HENRI et al., 2002). IFN- γ estimula diretamente as células fagocíticas internalizadas a destruir parasitos, principalmente por meio da geração de NO (ALIBERTI et al., 1996). NO e macrófagos ativados geram uma substância antifibrogênica dentro do granuloma esquistossômico, que é considerado uma das principais vias na indução de imunidade protetora contra esta doença (JAMES et al., 1998). Entretanto, é importante ressaltar que a intensa resposta inflamatória de perfil Th1 pode lesar os tecidos do hospedeiro, conforme observado em modelos experimentais deficientes na produção de IL-10 e IL-4.

A fase crônica, com pico entre 11 e 12 semanas pós infecção, induz uma rede regulatória de células, principalmente coordenada pela citocina IL-10. Ela regula todas as outras respostas, e é essencial para evitar ou reduzir morbidade e lesões teciduais mais severas (PEARCE et al.,

2004). Estudos sobre os mecanismos de modulação do granuloma, em modelos experimentais, demonstraram que camundongos geneticamente deficientes da produção de IL-10 desenvolvem um perfil misto Th1/Th2, sendo notável o aumento de IFN- γ /IL-5, acompanhado de níveis maiores ou não alterados de IL-4, o que causa maior mortalidade (WYNN et al., 2003). As características clínicas em humanos infectados nessa fase podem incluir lesões vasculares obstrutivas, hepatoesplenomegalia acompanhada de fibrose hepática, hipertensão portal, ascite e sangramento fatal de lesões esofagogástricas (FALLON et al., 2000; WILSON et al., 2007).

Na fase crônica da esquistossomose, a resposta Th2 diminui, ocorrendo em conjunto, uma redução na inflamação granulomatosa em torno dos ovos que ficam retidos durante essa fase, e emergindo células T e B com perfil regulatório (Treg/Breg), envolvendo a produção de IL-10 e levando a redução da produção de citocinas do tipo 2 e do tipo 1 (WILSON et al., 2007; CHUAH et al., 2014; VAN DER VLUGT et al., 2012) (Figura 4).

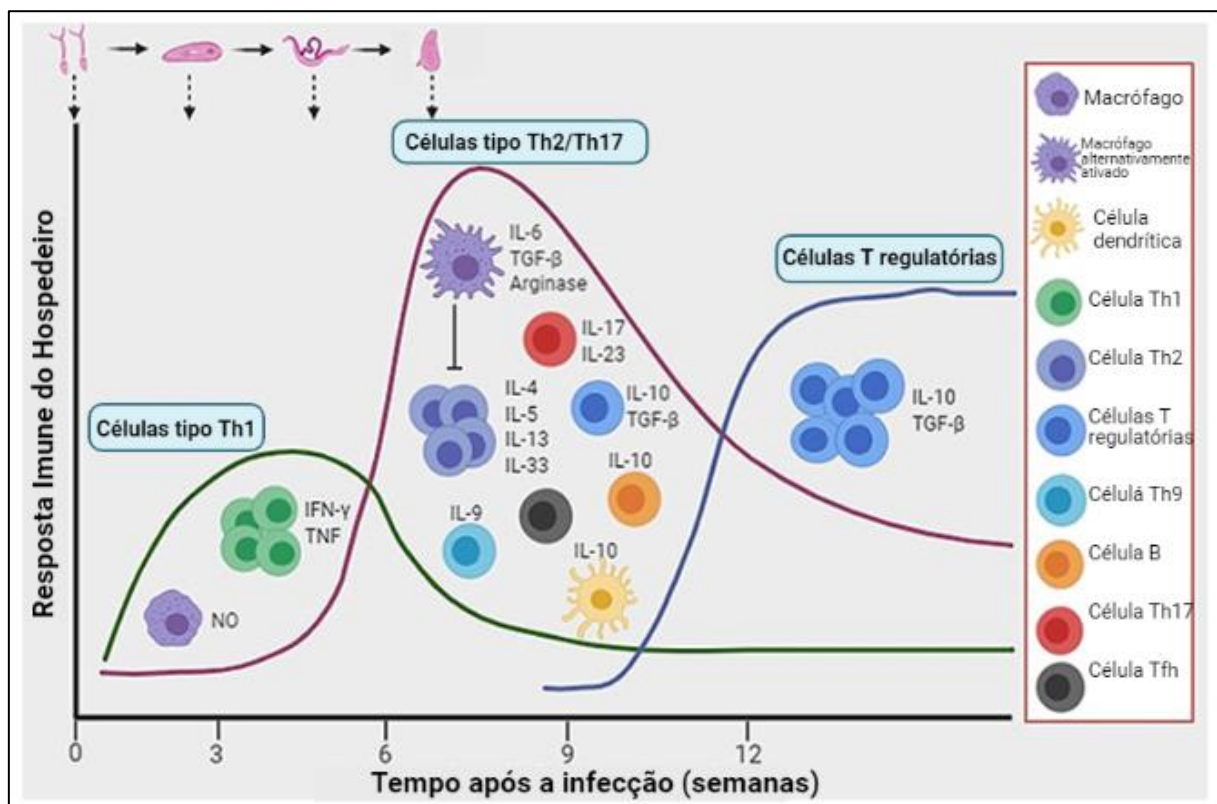


Figura 4. Indução da resposta imune durante as semanas de infecção por *Schistosoma mansoni*. Após a infecção por esquistossomos, observa-se uma resposta imunológica inicial caracterizada por uma ativação da resposta celular mediada por células T auxiliares tipo 1 (Th1). À medida que o parasito se desenvolve e alcança a fase adulta, e as fêmeas iniciam a postura de ovos, há um aumento na liberação de interleucina-10 (IL-10) por células dendríticas, desencadeando uma transição para uma resposta Th2. Adicionalmente, células B são estimuladas a produzir IL-10 em resposta a antígenos provenientes de ovos e vermes adultos. Durante esse

processo, observa-se o desenvolvimento de populações de células T reguladoras e macrófagos alternativamente ativados. Fonte: Adaptado de Molehin (2020).

Além dos perfis clássicos de linfócitos TCD4+ envolvidos durante o curso da infecção, estudos demonstram que outros subtipos parecem desempenhar papéis fundamentais na patogênese da doença. As células Th17, produtoras de IL-17, por exemplo, possuem atuação importante na formação de granuloma (RUTITZKY et al., 2005). Na ausência de células Th1, as Th17 conduzem a inflamação, promovendo o aumento de neutrófilos na reação granulomatosa. No entanto, não havendo altas concentrações tanto células Th1 quanto Th17, tem-se a formação de granulomas menores, com aumento da produção de células do tipo 2 (RUTITZKY; STADECKER, 2011). Estudos experimentais recentes mostraram que células Tfh podem estar envolvidas na resposta imune de casos agudos (SOLOVIOVA et al., 2019; ZHANG et al., 2016), e promover a formação do granuloma e fibrose hepática, além de fornecer resistência adquirida à reinfecção do esquistossomo (ZHENG et al., 2020).

Assim, fica evidente que o balanço entre as respostas imunes das diferentes subpopulações de linfócitos está diretamente associado a formação adequada dos granulomas e consequentemente com a gravidade da esquistossomose.

2.4 Formação de granulomas e *Schistosoma mansoni*

O termo granuloma pode ser definido como qualquer pequena agregação nodular delimitada de células inflamatórias mononucleares ou um conjunto de macrófagos modificados, geralmente circundados por uma borda de linfócitos e muitas vezes contendo células multinucleadas (SEITZER et al., 2001). Os granulomas são estruturas evolutivamente antigas que se formam em resposta a partículas grandes ou pequenas, sendo elas agentes infecciosos ou objetos inanimados, que podem acontecer em um contexto de doenças inflamatórias e autoimunes (PAGÁN; RAMAKRISHNAN, 2018; BOROS, 2003).

O processo de maturação de granulomas está associado ao recrutamento de vários tipos de células que moldam o ambiente onde o granuloma se insere por meio de suas funções efectoras (PAGÁN; RAMAKRISHNAN, 2018). Dentre as células participantes do processo granulomatoso, o subconjunto de células T CD4+ tem papel bem reconhecido e podem gerar respostas tanto protetoras quanto patológicas (ZHU et al., 2015).

À medida que os granulomas amadurecem, eles podem sofrer alterações estruturais, como se tornarem fibróticos ou desenvolver áreas de necrose, que contribuem para a morbidade

por causar danos teciduais (PAGÁN; RAMAKRISHNAN, 2018). Apesar disso, uma resposta granulomatosa pode ter sucesso na erradicação de objetos ou agentes infecciosos estranhos. Caso contrário, a tentativa de sequestrar e/ou aprisionar o objeto ou agente pode ser benéfico para o hospedeiro, mas igualmente prejudicial se a resposta for excessiva ou indesejada (PAGÁN; RAMAKRISHNAN, 2018).

A formação de granulomas ao redor dos ovos presos nos tecidos é uma característica da infecção por *S. mansoni* e a principal causa de patologia em hospedeiros infectados (Figura 5) (SCHWARTZ; FALLON, 2018). O ovo é, portanto, o fator patogênico primário na esquistossomose, pois atua como o iniciador da formação do granuloma e é essencial para os padrões de eventos que levam à patologia associada a doença crônica (SCHWARTZ; FALLON, 2018; LLANWARNE; HELMBY, 2021).

A resposta granulomatosa às infecções por *S. mansoni* envolvem o recrutamento de células T e B, macrófagos, neutrófilos, eosinófilos e células epitelióides, além da ativação de miofibroblastos/células estreladas hepáticas (HSCs) (Figura 5) (BURKE et al., 2010). Durante a formação do granuloma, a lisofosfatidilcolina (LPC) derivada de *S. mansoni* ativa os eosinófilos através da via do TLR2 (MAGALHÃES et al., 2009). Metaloproteinases (MMP), histaminas e collagenases liberadas pelos eosinófilos desempenham um papel na remodelação do tecido (ARIYARATNE; FINNEY, 2019). Simultaneamente, o fator inibitório de migração de macrófagos (MIF) contribui para o aumento da produção de IL-5 e eosinofilia durante a esquistossomose (MAGALHÃES et al., 2009). As células circundam os ovos, formando uma camada multicelular concêntrica e, à medida que o granuloma se desenvolve, fibras colágenas são depositadas (LLANWARNE; HELMBY, 2021).

A deposição de colágeno é induzida por monócitos inflamatórios, situados no interior dos tecidos, que se diferenciam em macrófagos. A diversidade de células presentes no granuloma cria um microambiente tipo 2, onde as células T produzem IL-4 e IL-13, induzindo a ativação alternativa de macrófagos via IL-4R α . O eixo IL-4/IL-13/IL-4R α desencadeia a transcrição da retinaldeído desidrogenase 2 (Raldh2) e a ativação do transdutor de sinal e ativador da transcrição 6 (STAT-6). Este fator de transcrição regula positivamente a expressão de Chi3l3, ligante de morte celular programada 2 (Pdl2), arginase-1 (Arg1) e molécula semelhante à resistina α (Relm- α), resultando na produção de TGF- β e na deposição de colágeno (SOUZA et al., 2020).

A arquitetura tridimensional do tecido do granuloma apresenta fibras de matriz extracelular (MEC) inicialmente dispostas em um padrão de malha, evoluindo para um arranjo

final concêntrico e compacto. Esses dois padrões de arranjo de fibra contêm inicialmente colágeno tipo III, que é posteriormente substituído por colágeno tipo I (LENZI et al., 1999).

A organização e distribuição da rede de colágeno parecem ser preferencialmente orientadas em direção às células secretoras internas, como fibroblastos e/ou miofibroblastos, visando reter no lugar os tecidos que cercam a nova estrutura organoide (LENZI et al., 1999). A curvatura ou os ângulos entre as fibras de colágeno provavelmente dependem da organização dos fibroblastos ou dos miofibroblastos (LENZI et al., 1999).

As fibras colágenas, podem gerar por consequência, a fibrose, que continuam permanentemente no tecido, mesmo após a destruição do próprio ovo. A formação de fibrose ao redor dos ovos é amplamente prejudicial para o hospedeiro na medida em que resulta no bloqueio do fluxo sanguíneo e conduzindo à hipertensão e da circulação portal, que resulta na severidade da esquistossomose (GRYSEELS et al., 2012).

A formação de granulomas também é vital para limitar a indução de antígenos do ovo, o que levaria a inflamação permanente, dano tecidual e necrose extensa, como já observado *in vivo* em camundongos infectados por *S. mansoni* (FALLON et al., 2000). Dessa forma, embora a formação do granuloma do esquistossomo seja a patologia principal na esquistossomose, também é benéfica para o hospedeiro, por proteger os tecidos contra os antígenos tóxicos das respostas imunes (SCHWARTZ; FALLON, 2018; HAMS et al., 2013).

O desenvolvimento inicial do granuloma em infecções por *S. mansoni* envolvem células T CD4⁺ do perfil tipo 1 (PEARCE; MACDONALD, 2002). No entanto, a polarização Th1 excessiva é prejudicial para o hospedeiro, como já foi observado em camundongos infectados por *S. mansoni* com deficiência de IL-4 ou deficiência dupla de IL-4/IL-10, que tiveram uma maior mortalidade, em razão de necrose intestinal (HOFFMANN et al., 2000; PEARCE; MACDONALD, 2002). A mudança para o perfil Th2 de resposta granulomatosa crônica em infecções por *S. mansoni* é impulsionada por elementos tóxicos dos antígenos solúveis do ovo (SEA) (ZHENG et al., 2020). Esse perfil de resposta, recruta células que expressam citocinas como IL-4 e IL-13, que podem gerar a formação de granulomas, sendo a IL-13, individualmente, a citocina pró-fibrótica dominante nesta doença (BURKE et al., 2010; FALLON et al., 2000).

A resposta granulomatosa com predomínio de perfil Th2 é, por sua vez, regulada por uma menor resposta Th1 (GRENCIS, 2015). Além disso, as células T reguladoras (Tregs) demonstraram modular e diminuir o tamanho do granuloma ao longo de infecções crônicas em camundongos (Figura 5) (SINGH et al., 2005).

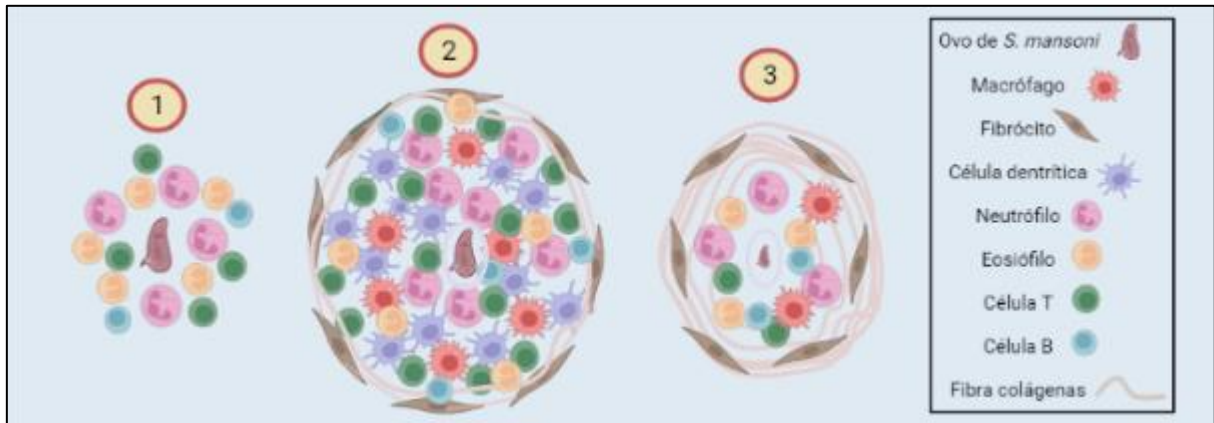


Figura 5. Representação da composição celular e desenvolvimento do granuloma ao redor dos ovos de *Schistosoma mansoni*. O processo de desenvolvimento do granuloma é induzido pelos antígenos do ovo e seu crescimento por citocinas e quimiocinas liberada pelos linfócitos T. Momento 1: A formação do granuloma começa com o recrutamento inicial de macrófagos, eosinófilos e neutrófilos ao redor do ovo aprisionado. Momento 2: Essas células causam uma resposta inflamatória promovendo o recrutamento de mais células e o desenvolvimento do tamanho do granuloma. Momento 3: mostra o estágio final do granuloma uma vez que o estímulo antigênico (principalmente os ovos) foi destruído, resultando na deposição de fibrilas de cromatina e colágenos, e subsequente degradação e remodelação do colágeno que contribuem para a fibrose final do tecido. Fonte: Adaptado de Butrous (2019).

2.4.1 Granulomas hepáticos

O comprometimento do tecido hepático na esquistossomose ocorre secundariamente ao aprisionamento de ovos nas vênulas portais, os quais podem permanecer nesse tecido por cerca de 3 semanas (ROSS et al., 2007). Com a liberação de antígenos do ovo, uma resposta do tipo Th1 é iniciada, evoluindo para uma resposta imune Th2 dominante e a formação dos granulomas hepáticos (WYNN et al., 2004; BUTROUS, 2019). Os granulomas que se formam em tecido hepático são os mais amplamente compreendidos (SCHWARTZ; FALLON, 2018).

A partir de análises histológicas, foi demonstrado que os granulomas hepáticos na fase aguda abrigam mais eosinófilos, células T e células B do que os encontrados nos granulomas intestinais e pulmonares (SCHWARTZ; FALLON, 2018). O tamanho do granuloma hepático diminui de 8 a 20 semanas após a infecção, fato que ocorre devido ao estado hiperresponsivo da imunidade que se desenvolve à medida que a infecção progride para o estágio crônico (SCHWARTZ; FALLON, 2018). Na fase crônica, ocorre o recrutamento de eosinófilos e a angiogênese, que contribui tanto para o surgimento da fibrose portal esquistossomótica quanto para a degradação fibrótica (ANDRADE; SANTANA, 2010), com maior deposição de colágeno e a formação de granulomas menos organizados que os encontrados em outros tecidos (intestinos e pulmão) (AMARAL et al., 2017). Uma importante característica do granuloma

encontrado em tecido hepático é sua função protetora de encapsular secreções hepatotóxicas do ovo (SCHWARTZ; FALLON, 2018; HAMS et al., 2013).

2.4.2 Granulomas intestinais

Os granulomas intestinais se formam em razão dos ovos depositados pelas fêmeas de *S. mansoni* perto da vasculatura ao redor do intestino (JOURDANE; THERON, 1987). No entanto, muitos ovos depositados nessa região, são eliminados por conta do mecanismo de proteção do hospedeiro que facilita a passagem dos ovos para o lúmen intestinal, diferente dos ovos que ficam presos no tecido hepático (JOURDANE; THERON, 1987). Por isso, normalmente menos ovos e granulomas são observados no tecido intestinal. Mas, também é possível que os ovos fiquem presos no intestino e os granulomas da fase tardia nesse tecido se assemelhem aos granulomas hepáticos da fase crônica em forma e conteúdo de colágeno (SCHWARTZ; FALLON, 2018).

Os granulomas intestinais têm características semelhantes com as identificadas nos granulomas hepáticos em estágio inicial, na fase denominada de recente (AMARAL et al., 2017) (Figura 6). Porém, análises histológicas demonstram que os granulomas intestinais abrigam mais macrófagos que os granulomas hepáticos e menos eosinófilos, células T e B (WEINSTOCK; BOROS, 1983). Nos estágios posteriores (fase tardia), os ovos de *S. mansoni* podem ficar presos e ocorre o depósito de fibrose, com a formação de granulomas intestinais mais organizados e, na maioria dos casos, com menos colágeno que os hepáticos (Figura 6) (AMARAL et al., 2017).

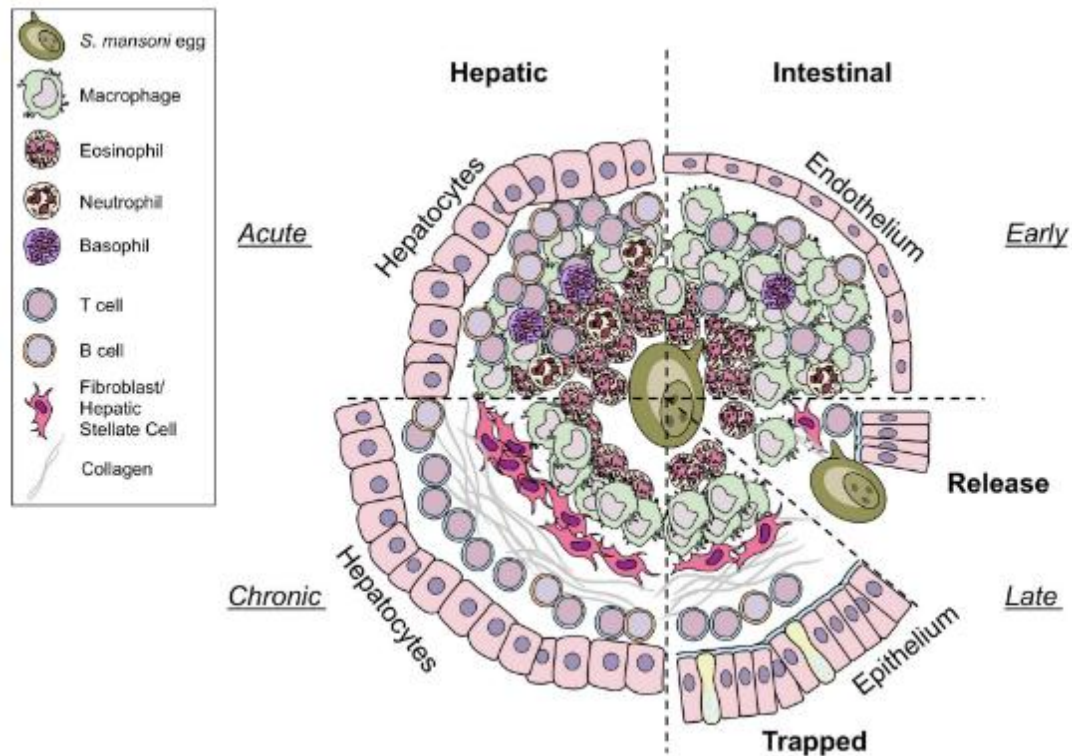


Figura 6. Características da composição do granuloma hepático e intestinal. A representação visual destaca a diversidade na composição do granuloma celular no fígado (à esquerda) e no intestino (à direita). Durante o estágio inicial (metade superior), observa-se uma semelhança aparente entre os granulomas, embora os granulomas intestinais apresentem menor presença de eosinófilos, células T e células B em comparação aos granulomas hepáticos, onde a predominância de macrófagos é mais evidente. À medida que os estágios avançam (metade inferior), evidencia-se a retenção de ovos no fígado, resultando no desenvolvimento de fibrose. Em contrapartida, os ovos depositados no intestino podem seguir mecanismos ainda não totalmente compreendidos, podendo ser liberados para o lúmen intestinal ou, em casos similares a problemas hepáticos crônicos, ficarem retidos. Fonte: Schwartz; Fallon, 2018.

2.4.3 Granulomas pulmonares

A formação de granulomas no tecido pulmonar em infecções por *S. mansoni* é menos relatada, mas, ocasionalmente, os ovos podem ficar presos nos pulmões e, assim como no fígado, os antígenos dos ovos induzem uma reação imunológica que leva ao surgimento do granuloma e subsequente remodelação das arteríolas pulmonares (BUTROUS, 2019). No entanto, existem evidências de que os ovos são destruídos completamente e mais rapidamente nos pulmões do que no fígado, por mecanismos ainda não esclarecidos (ALMEIDA et al., 1983).

Os granulomas pulmonares conduzem a hipertrofia grave das arteríolas em suas camadas íntima, média e adventícia e promovem a proliferação de uma infinidade de células inflamatórias na vasculatura pulmonar, o que contribui para o desenvolvimento de hipertensão

pulmonar (ANDRADE et al., 2014; GELFAND, 2018). O aumento do fluxo e estresse absoluto da circulação pulmonar, facilita o desvio dos ovos do fígado para os pulmões, o que pode aumentar a carga imunológica nos pulmões e na circulação pulmonar (ANDRADE et al., 2014; WILSON, 2009).

Dessa forma, a formação de granulomas nos diversos tecidos está diretamente associada a evolução e gravidade da esquistossomose. Assim, a busca por novos tratamentos que melhor modulem essa reação inflamatória e reduzam a carga parasitária é essencial para evitar a morbidade da esquistossomose e favorecer seu controle.

2.5 Controle da esquistossomose mansoni e praziquantel

A esquistossomose possui um integrado programa de controle que consiste na combinação de tratamento dos infectados, gestão da água, controle de caramujos transmissores (por meio da modificação do habitat, mudanças na irrigação e uso de moluscidas), tratamento de esgoto, saúde e educação e mudança comportamental do indivíduo infectado (ROLLINSON et al., 2012).

Em relação ao tratamento, o maior avanço no campo da quimioterapia da esquistossomose se deu pelo desenvolvimento do medicamento praziquantel (PZQ) (MUTAPI et al., 2017). O PZQ é o fármaco de escolha para o tratamento da esquistossomose e o principal componente dos programas de controle da parasitose (MUTAPI et al., 2017).

O PZQ é um derivado de quinolina-pirazina e representa o composto mais eficaz e amplamente utilizado no tratamento da esquistossomose há mais de 30 anos (APPIAH et al., 2000). Ensaios controlados randomizados mostraram que a administração oral do PZQ é segura e eficaz contra vermes adultos de todas as espécies de *Schistosoma* spp., embora seu preciso mecanismo de ação ainda precisa ser estabelecido (DOENHOFF et al., 2009).

PZQ foi descoberto em meados da década de 1970 e os ensaios em humanos como candidato a uma droga antiesquistossomótica começaram em 1978, se estabelecendo no mercado como Biltricide (Bayer) em 1988 (FENWICK, 2015). Posteriormente, a eficácia em termos de taxa de cura e de redução de ovos, além de segurança do medicamento, garantiram seu uso generalizado (MCMANUS et al., 2018).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) recomenda que o PZQ seja utilizado em dose única de 40mg/kg (WHO, 2006), e desde 2007, mais de 150 milhões de pessoas foram tratadas com o medicamento (IFPMA, 2017; WHO, 2018). Muitas características fizeram do PZQ a droga escolhida para tratamento da esquistossomose, incluindo: o fato de ser eficaz contra as

três espécies principais do parasito: *S. mansoni*, *S. haematobium* e *S. japonicum* (VALE et al., 2017); tem boas propriedades farmacológicas, tais como, é clinicamente eficaz contra amplo espectro de infecções por cestódeos e trematódeos, tem boa solubilidade, e absorção, além de baixa toxicidade (VALE et al., 2017; WANG et al., 2012) e o seu custo é relativamente baixo (SETO et al., 2011).

Alguns estudos afirmaram que a utilização de 40 mg/kg de PZQ administrados anualmente como “quimioterápico preventivo” pode reduzir significativamente a prevalência e a intensidade da infecção e controlar morbidade a longo prazo (BOCKARIE et al., 2013; FENWICK; JOURDAN, 2016). No entanto, a administração anual de medicamentos em massa (AMM) pode reduzir a imunidade da população a longo prazo e, se interrompida, pode levar a grandes erros na contagem de ovos (MITCHELL et al. 2014, GURARIE et al., 2015). Além disso, várias rodadas de administração anual do PZQ em massa em crianças em idade escolar resultaram em uma eficácia reduzida sobre o parasito, o que representa um ameaça aos programas globais de administração do PZQ (CRELLEN et al., 2016).

As taxas de cura de PZQ são geralmente entre 60 e 90%, sendo raras as taxas de cura de 100%, um fato provavelmente decorrente de reinfecções em áreas de alta transmissão e outros fatores relacionados ao parasito (DOENHOFF et al., 2009). Por exemplo, o PZQ é eficaz contra esquistossomos adultos, mas tem baixa eficácia contra vermes juvenis (VALE et al., 2017). Além disso, como com outras drogas, a reinfecção é ainda um problema após o tratamento, o que poderia levar ao desenvolvimento de cepas do parasito com reduzida suscetibilidade ao PZQ, conforme previamente relatado em algumas pesquisas (CIOLI et al., 2004; COUTO et al., 2011; MELMAN et al., 2009). Outro fato, consiste no relato de o PZQ induzir hemorragia no tecido pulmonar do hospedeiro, o que pode contribuir para a patologia da esquistossomose (NOYA et al., 2002).

Como o PZQ é o único medicamento usado em programas de quimioterapia da esquistossomose e, mediante aos problemas relatados na sua aplicabilidade, maiores esforços e investimentos para desenvolver novas alternativas terapêuticas para o controlar a infecção por *S. mansoni* são importantes (BAIS; GREENBERG, 2018; CIOLI et al., 2014; RUGEL et al., 2018). Em adição, a ausência de uma vacina eficaz contra a esquistossomose ressalta a necessidade urgente de encontrar novos agentes antiparasitários para tratar a doença (EL-KOTT et al., 2011). Além disso, a compreensão incompleta dos mecanismos de ação do PZQ aumenta as preocupações sobre sua utilização como única estratégia terapêutica para a esquistossomose (NOGUEIRA et al., 2022).

2.6 Produtos naturais como estratégia terapêutica

Produtos naturais oriundos de espécies vegetais, representam uma fonte potencial de novos medicamentos, pois são conhecidos por serem boas fontes de compostos farmacologicamente ativos contra várias doenças, incluindo infecções parasitárias (SIMOBEN et al., 2018). Além disso, acredita-se que as espécies vegetais terapêuticas têm moléculas com vantagens significativas sobre moléculas sintéticas, devido aos longos anos de evolução, que possibilitou maior sinergia entre os constituintes das espécies vegetais, o refinamento nas formas de proteção e resistência a intempéries, além da produção ser sustentável (CORDELL, 2014; SIMOBEN et al., 2014).

Os produtos naturais possuem estruturas vantajosas favorecidas pela evolução para gerar atividades biológicas particulares, incluindo a regulação dos mecanismos endógenos de defesa e a interação com outros organismos, o que explica sua alta relevância para doenças infecciosas e câncer (EKPO et al., 2012). Além disso, seu uso na medicina tradicional pode fornecer informações sobre eficácia e segurança (CORDELL, 2014).

Os compostos naturais com base em extratos vegetais são os mais avaliados e estudados, devido à grande diversidade vegetal existente no Brasil e no mundo, além da atividade biológica pronunciada em razão das interações sinérgicas entre os constituintes (NODARI; GUERRA, 2001). Em razão dos metabólitos secundários existentes em diferentes partes de uma espécie vegetal, os produtos naturais podem ser usados como protótipos para o desenvolvimento de novos medicamentos antiparasitários (KAISER et al., 2003; da SILVA FILHO et al., 2009; NEWMAN; CRAGG, 2012; de CASTRO et al., 2013).

Os critérios para a escolha de um produto natural para um estudo em particular e para sua validação, envolvem investigações etnobotânicas, levando em consideração o conhecimento pré-existente sobre o uso terapêutico da espécie de interesse (LIFONGO et al., 2014); investigações fitoquímicas, por meio do isolamento, purificação e caracterização dos princípios ativos (IBRAHIM et al., 2014); estudo farmacológico, onde são investigadas as propriedades farmacológicas do extrato e dos constituintes químicos isolados (IBRAHIM et al., 2014); química orgânica sintéticas, para a caracterização das transformações químicas de princípios ativos (MACIEL et al., 2000); estudos de química medicinal e farmacológicas, para estabelecer a relação estrutura/atividade e os mecanismos de ação dos princípios ativos (MACIEL et al., 2002); e, finalmente, a operação de formulações para a produção de fitoterápicos (MACIEL et al., 2002).

Pelo fato de os produtos naturais serem importantes recursos terapêuticos, eles vêm sendo amplamente avaliados e considerados para o tratamento da esquistossomose.

2.7 Produtos naturais no tratamento da esquistossomose

A descoberta de princípios ativos de composto vegetais foi descrita pela primeira vez no início do século 19 (KAYSER et al., 2003). Como resultado, vários compostos vegetais com propriedades esquistossomicidas promissoras foram identificados (BRAGUINE et al., 2010; MAGALHÃES, et al., 2009; MORAES et al., 2011; YOUSIF et al., 2012).

A reação granulomatosa ao redor dos ovos do parasito, com subsequente formação de fibrose tecidual, é um processo inflamatório que leva a destruição de uma extensa área no órgão onde ocorre (BERGQUIST, 2002). Por isso, a busca por alternativas capazes de reduzir a carga de ovos nos tecidos e modular a resposta imune é necessária, para favorecer um prognóstico benigno ao hospedeiro e/ou minimizar as manifestações clínicas mais severas da esquistossomose (HUANG et al; 2006; LIRA et al., 2023).

Muitos parâmetros são frequentemente avaliados em compostos vegetais utilizados em estudos de tratamento da esquistossomose, tais como: alterações morfológicas, oviposição, alterações motoras, capacidade de matar o verme adulto (MORAES, 2012; TEKWU et al., 2017) e de modular a resposta imune do hospedeiro (KAMEL; EL-SHINNAWY, 2015).

A modulação da resposta imunológica por um produto vegetal pode trazer resultados promissores para a terapia da esquistossomose, por poder provocar a diminuição da inflamação granulomatosa e, conseqüentemente, reduzir a patologia da doença (REIS et al., 2008; ALLAM, 2009; KAMEL; EL-SHINNAWY, 2015; MIRANDA et al., 2013; RODRIGUES et al., 2020).

Nesse contexto, uma diversidade de produtos naturais vem sendo amplamente avaliada no tratamento da infecção por *S. mansoni* (MOLGAARD et al, 2001). Um dos motivos para isso, é o fato do medicamento praziquantel ser a única alternativa disponível para o tratamento da esquistossomose (MUTAPI et al., 2017).

Produtos naturais foram avaliados e testados em modelos experimentais em todo mundo e demonstraram ser eficazes contra a infecção por *S. mansoni* (RIZK et al., 2012; MOSTAFA et al., 2011; JATSA et al., 2015, 2016; 2018; AL-OLAYAN et al., 2016; HASSAN et al., 2016).

In vitro foram registrados o efeito anti-esquistossomótico de diversos compostos naturais. Ammar et al. (2016) constataram a morte de todos os miracídios e cercárias de *S. mansoni* após 30 minutos de exposição ao extrato de folhas de *Callistemon citrinus* e provaram seu efeito letal em vermes adultos de *S. mansoni in vitro*. A própolis vermelha brasileira exibe

propriedades antiparasitárias *in vitro* e reduz a carga de vermes e a produção de ovos em um modelo de camundongo com infecção precoce ou crônica por *S. mansoni* (SILVA et al., 2021). *Azadirachta indica* e *Vernonia amygdalina* demonstraram maior atividade *in vitro* em relação ao medicamento padrão utilizado no tratamento da esquistossomose (ACHEAMPONG et al., 2020).

Em relação aos estudos pré-clínicos, El-Shenawy et al. (2008) relataram que *Nigella sativa* possui atividades anti-esquistossomóticas promissoras. No estudo de Al-Olayan (2016), foi demonstrado que o extrato de *Ceratonia siliqua* possui efeitos antioxidantes e anti-esquistossomóticos em camundongos infectados com *S. mansoni*. Curcumina, composto fenólico isolado de rizomas de plantas, que promove uma variedade de coloração em alimentos, foi investigado e apresentou um eficiente potencial anti-esquistossomótico (ALLAM, 2009). Alho (*Allium sativum*) e cebola (*Allium cepa*), são capazes de normalizar enzimas funcionais no fígado e melhoram o status antioxidante na infecção por *S. mansoni*, causando redução notável no número de vermes adultos e na contagem de ovos (METWALLY, 2006; MANTAWY et al., 2011). Dejanía et al. (2014) mostraram que 100mg/kg de extrato etanólico de *Mentha piperita* possui propriedades imunomoduladoras. *Mentha piperita* L. foi capaz de modular os níveis de IgE, provavelmente em razão do aumento de IL-10 nos camundongos tratados, que se correlacionou ao aumento da imunoglobulina, além do aumento dos níveis de IFN- γ e IgG2a no soro, melhorando a inflamação e sugerindo um efeito inflamatório prolongado desse composto em modelo de esquistossomose. *Vernonia amygdalina*, *Azadirachta indica* (ACHEAMPONG et al., 2020) e *Sida pilosa* (JATSA et al., 2016) também foram avaliadas *in vivo* e se mostraram potentes alternativas para o tratamento da esquistossomose, com redução de ovos e vermes adultos, além do número de granulomas (ACHEAMPONG et al., 2020). A espécie vegetal *Sida pilosa* reduziu o número de granulomas no fígado e no intestino delgado, bem como reduziu o volume de granulomas em tecido hepático e a espessura da camada muscular do intestino delgado Jatsa et al (2016). Rodrigues et al. (2020) demonstraram que o extrato de *Dysphania ambrosioides* (L.), diminuiu os níveis de IFN- γ , TNF- α , IL-4 e IL-17 após tratamento em diferentes estágios evolutivos do parasita *S. mansoni*. Em contraste, foi observado um aumento na IL-10 em vermes *S. mansoni* imaturos e maduros após o tratamento, sendo um componente vegetal que modula favoravelmente a infecção por *S. mansoni* na terapia do hospedeiro vertebrado.

Estudos etnofarmacológicos realizados para o controle da esquistossomose, conduzidos no Mali, por exemplo, demonstraram que a maioria das pessoas de dois distritos usam espécies vegetais para aliviar os sintomas da esquistossomose e controlar a infecção (SYLLA, 1991).

Um estudo sobre plantas medicinais sul-africanas revelou a eficiência de 21 espécies de vegetais contra esquistossômulos (SPARG et al., 2000). Dentre elas, seis são utilizadas no tratamento da esquistossomose intestinal pela população local: *Afromomum latifolium*, *Cissus quadrangulares*, *Euphorbia hirta*, *Stylosanthes erecta*, *Zea mays* L., *Ximenia amaricana* L. (BAH et al., 2006).

Estudos clínicos foram realizados com extrato de folhas de *Artemisia annua*, que atualmente está sendo usado no controle de malária, demonstrou eficácia no controle da população de vermes *Schistosoma* (LESCANO et al., 2004).

Portanto, os estudos que utilizaram produtos de espécies vegetais, demonstram efeitos antiparasitários e/ou imunomoduladores na infecção por *S. mansoni*, que podem ser promissores para o avanço do tratamento da esquistossomose. Por isso, o estudo de gêneros vegetais e a compreensão dos seus potenciais mecanismos de ação podem ser importante para a terapia da esquistossomose.

2.8 O gênero *Dysphania*

As espécies pertencentes ao gênero *Dysphania* são plantas herbáceas e arbustivas adaptadas ao desenvolvimento em zonas áridas e semiáridas em diversas partes do globo (SMITH ORIENTAL, 2006). Este gênero compreende plantas espermatófitas, enquadradas no grupo das Angiospermas, pertencentes à classe das dicotiledôneas e família Amaranthaceae (HEWIS et al. 2020).

A família Amaranthaceae, composta por aproximadamente 180 gêneros e 2.500 espécies (NAZISTA et al., 2022), foi objeto de estudos filogenéticos em 2016, que resultaram na inclusão de representantes da família Chenopodiaceae na Amaranthaceae. Esta reclassificação implicou a transferência de algumas espécies do gênero *Chenopodium* para o gênero *Dysphania* (NAZISTA et al., 2022), exemplificado pela transição de *Chenopodium ambrosioides* L. para *Dysphania ambrosioides* (L.) Mosyakin & Clemants (SÁ et al. 2016).

O gênero *Dysphania*, compreendendo cerca de 50 espécies de ervas nativas distribuídas pela Europa, Ásia, e Américas do Norte e do Sul (SUKHORUKOV et al., 2018), exibe uma distribuição geográfica preponderante em regiões subtropicais e desertos montanhosos tropicais (Figura 7). A máxima diversidade de espécies é observada na Austrália e Nova Zelândia, com aproximadamente 17 espécies nativas, enquanto a Europa detém uma diversidade mais limitada, abrangendo apenas *Dysphania botrys* (L.) Mosyakin & Clemants (Figura 7) (UOTILA, 2011; SUKHORUKOV, 2014).

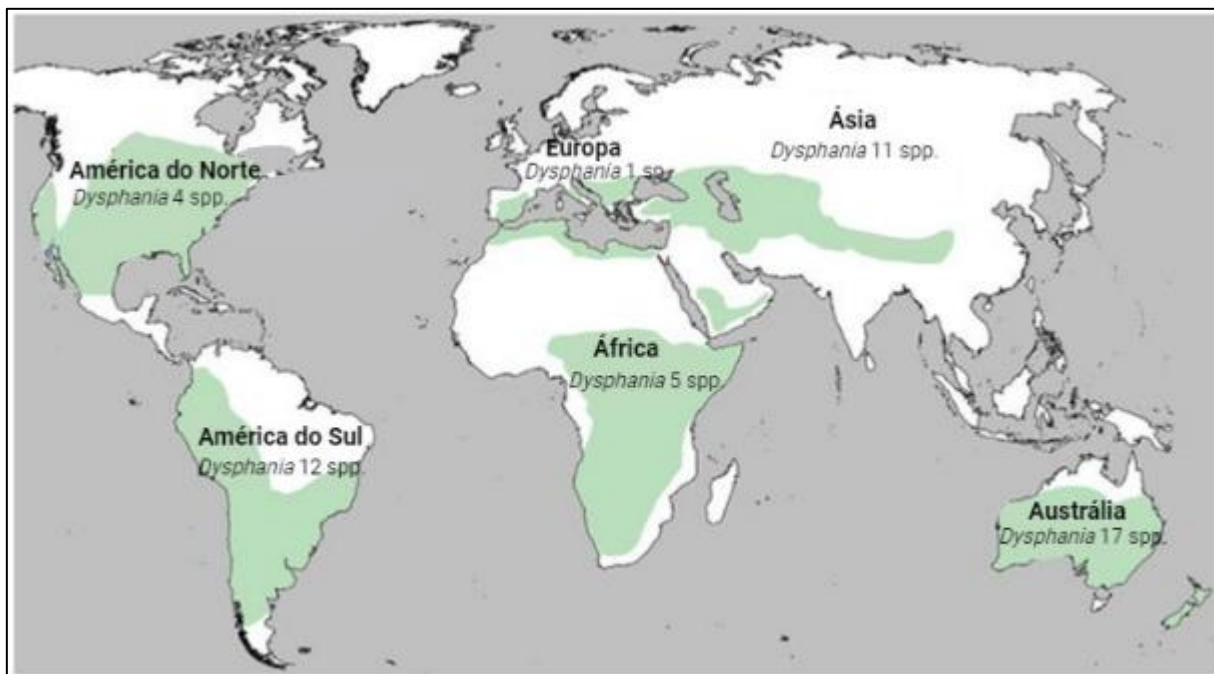


Figura 7. Distribuição mundial e diversidade de espécies de *Dysphania* (em verde). Os números das espécies referem-se às espécies atualmente conhecidas, sendo incluídas apenas as espécies e áreas nativas. Fonte: Adaptado de Uotila et al. (2021).

As características morfológicas distintivas das espécies do gênero *Dysphania* compreendem folhas planas, inflorescências tirsóides, perianto geralmente composto por três a cinco segmentos livres ou parcialmente fundidos, anteras curtas (0,2–0,3 mm), pericarpo parenquimatoso fino, sementes subglobosas a lenticulares com perisperma abundante, e geralmente embrião anular. A maioria das espécies de *Dysphania* é conhecida por produzir pelos brancos glandulares e/ou glândulas subsésseis amarelas ou laranja, contendo óleos essenciais que conferem um odor aromático característico, muitas vezes persistindo em espécimes de herbário por longos períodos (SUKHORUKOV, 2014).

Algumas espécies de *Dysphania* exercem influências significativas na saúde humana, destacando-se pela sua utilização na medicina tradicional, o que torna essencial a realização de análises químicas detalhadas das plantas e de seus compostos ativos. Estas análises revelaram uma diversidade de compostos com distintos padrões estruturais (SINGH et al., 2005). Do ponto de vista fitoquímico, as espécies do gênero *Dysphania* contêm uma gama de minerais, metabólitos primários (carboidratos, aminoácidos, constituintes apolares, proteínas, citocininas aromáticas, hormônios) e metabólitos secundários (flavonóides, saponinas, terpenos, esteróis, alcalóides e vitaminas) (KOKANOVA-NEDIALKOVA et al., 2009).

Com a descoberta das amplas propriedades medicinais, cresceu a relevância das espécies de *Dysphania* (SINGH et al., 2005). Para validar as alegações tradicionais associadas

ao gênero, numerosos estudos foram conduzidos utilizando modelos animais e ensaios *in vitro* (KOKANOVA-NEDIALKOVA et al., 2009), revelando que diversas espécies de *Dysphania* apresentam potencial para o desenvolvimento de agentes terapêuticos valiosos. Como exemplo, *Dysphania ambrosioides* contém óleos essenciais utilizados em chás, especiarias, ou na medicina tradicional, destacando-se por suas propriedades antivirais e anti-helmínticas (BOUTKHIL et al., 2009), sendo o componente ascaridol do óleo essencial associado à atividade amebicida (ÁVILA-BLANCO et al., 2014). *Dysphania botry*, além de representar uma planta medicinal tradicional, emerge como potencial candidata para o tratamento do câncer (MORTEZA-SEMNANI, 2015). Outras espécies, como *D. glomulifera* (Nees) Paul G. Wilson e *D. littoralis* R. Br., demonstraram elevadas concentrações de cianeto (MCKENZIE et al., 2007), tornando-se letais para ovinos e bovinos durante a estação seca com a ingestão de menos de 200 g de planta fresca (MCKENZIE et al., 2007).

Por esta razão, o uso de plantas do gênero *Dysphania* em estudos terapêuticos contra agentes infecciosos são necessários e representam uma estratégia promissora.

2.9 *Dysphania ambrosioides* (L.) Mosyakin & Clemants

Entre as espécies vegetais de relevância medicinal no contexto de infecções, destaca-se *D. ambrosioides* (L.) Mosyakin & Clemants (UOTILA et al., 2021). Esta planta, pertencente à família Amaranthaceae, à ordem Caryophyllales e à classe Magnoliopsida (Figura 8), é popularmente conhecida no Brasil como "mastruz" e "santa-maria" (BIESKI et al., 2015), apresentando uma ampla distribuição por todo o território brasileiro (SENNA et al., 2010).

Dysphania ambrosioides é uma planta herbácea com floração anual ou hábito de crescimento perene, capaz de atingir até 1 m de altura. Seu caule pode ser único ou ramificado, e as folhas, alternadas, alongadas, serrilhadas, com arestas vivas, apresentam características peludas e variados tamanhos. As folhas menores localizam-se no ápice da planta, são sésseis, enquanto as maiores na porção inferior possuem pecíolo curto. Ademais, estas folhas possuem um odor forte e característico (BLANCKAERT et al., 2012). As inflorescências da espécie consistem em numerosas pontas de flores dispostas em panículas piramidais verdes, cada uma composta por 3 a 5 sépalas (HEWIS et al., 2020). Os pericarpos dos frutos, finos e facilmente liberados, encontram-se circundados por periantos glandulares, abrigando numerosas sementes esféricas, lisas e brilhantes, de coloração preta, envoltas por um cálice persistente geralmente com menos de 0,8 mm de comprimento. Embora a literatura não forneça informações

específicas sobre a reprodução biológica de *D. ambrosioides*, é presumível que ocorra autopolinização e a polinização pelo vento, assim como descrito para muitas espécies de *Chenopodium* (BLANCKAERT et al., 2012).

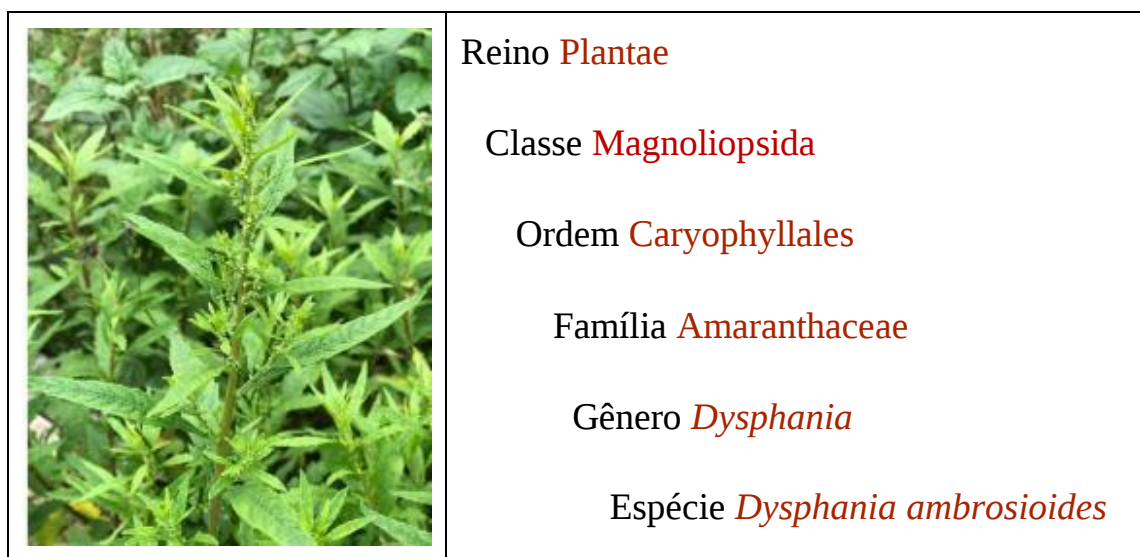


Figura 8. Representação da espécie vegetal *Dysphania ambrosioides* e sua classificação científica. Fonte: Adaptado de Singh; Pandey (2022).

Os constituintes fitoquímicos presentes em *D. ambrosioides* exibem variações significativas, dependendo das regiões de crescimento, estágios de maturação, forma de processamento e métodos de isolamento. Seus componentes bioativos foram categorizados em diversos grupos químicos, como ácidos graxos, esteróis, tocoferóis, ácido fenólico, flavonoides, alcaloides e compostos voláteis. Notavelmente, *D. ambrosioides* é reconhecida por seu constituinte volátil, o ascaridol (MONZOTE et al., 2009). Entretanto, seu extrato hidroalcoólico revelou-se rico em derivados de quercetina e kaempferol, compostos flavonoides que demonstraram atividade anti-esquistossomícida e cercaricida quando avaliados contra o parasito *S. mansoni* (KAMEL et al., 2010; RODRIGUES et al., 2020; BRAGUINE et al., 2012).

Adicionalmente, terpenoides e flavonoides presentes em *D. ambrosioides* demonstraram atividades farmacológicas abrangentes, incluindo ação anti-inflamatória, cicatrização de feridas e reparação de fraturas ósseas, ação anti-helmíntica, antiviral, antitumoral, quimioprevenção do câncer, antileishmanial e antioxidante (CRUZ et al., 2007; PATRÍCIO et al., 2008; PODOLAK et al., 2016).

No que se refere à resposta imunológica, o estudo de Trivellatograssi et al. (2013) trouxe importantes contribuições sobre os efeitos de *D. ambrosioides* como anti-inflamatório, ao destacar que o extrato etanólico do mastroz, administrado na dose de 500 mg/kg de peso

corporal, exibiu redução na geração de mediadores pró-inflamatórios importantes, como prostaglandina-E2, fator de necrose tumoral (TNF- α), bradicinina e óxido nítrico (NO). Quando foi realizado o tratamento de infecções parasitárias com extrato das folhas dessa planta, sua capacidade de estimular a resposta imune foi demonstrada, promovendo o aumento do recrutamento de células T e B para órgãos linfoides secundários, além de intensificar a atividade de macrófagos, com maior disseminação, fagocitose e produção de óxido nítrico (NO) (CRUZ et al., 2007). Esses achados sugerem que a ação pró-inflamatória pode controlar e modular infecções (PATRICÍO et al., 2008). Ademais, estudos histológicos conduzidos por Reyes-Becerril et al. (2019) confirmaram a segurança de *D. ambrosioides* na prevenção de danos intestinais, proporcionando evidências científicas para sua aplicação como agente anti-inflamatório natural.

Dysphania ambrosioides possui importante efeito cicatrizante, sendo demonstrada diminuição significativa de área lesionada em camundongos que foram tratados durante sete dias com o extrato etanólico da espécie vegetal (TRIVELLATOGRASSI et al. 2013). O estudo de Penha et al., (2016) evidenciou que o extrato aquoso de mastruz estimulou a neoformação óssea e fechamento de ferida com tecido ósseo ao final de 10 dias. Um estudo sugeriu que o extrato de mastruz favoreceu o processo de reparo dos dentes reimplantados, por reduzir infiltrado inflamatório polimorfonuclear, abscesso e necrose do ligamento periodontal (SOUSA, 2010), além de estimular a proliferação fibroblástica e osteogênese (SERVIO et al., 2011). Servio et al. (2011), destacou maior quantidade de fibroblastos, importantes células para a cicatrização, e maior presença de atividade osteoblástica em grupos tratados com mastruz.

Neste contexto, acredita-se que a utilização da espécie vegetal *D. ambrosioides* possa proporcionar descobertas positivas para o tratamento da esquistossomose, contribuindo para a avaliação dos mecanismos imunológicos envolvidos no processo infeccioso e na formação de granulomas ao longo das fases evolutivas do parasito, consequentemente reduzindo a gravidade da doença.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Revisar os efeitos imunomoduladores e anti-parasitários de produtos de espécies vegetais na terapia da esquistossomose e investigar o efeito do tratamento com extrato de *D. ambrosioides* na resposta imune e alterações histopatológicas no fígado, intestino e pulmão de camundongos infectados em diferentes fases da infecção por *S. mansoni*

3.2 Específicos

Capítulo 1

- Revisar os efeitos imunomoduladores e anti-parasitários de extratos de espécies vegetais e seus constituintes majoritários no tratamento da esquistossomose.

Capítulo 2

- Avaliar o efeito *in vitro* do extrato hidroalcólico de *D. ambrosioides* sobre a oviposição de vermes de *S. mansoni*.
- Avaliar *in silico* as atividades biológicas de kaempferol e as previsões de interação entre proteína-receptor alvos no parasito.
- Analisar as alterações histopatológicas nos tecidos hepático, intestinal e pulmonar de camundongos infectados por *S. mansoni* e tratados com *D. ambrosioides*.

Capítulo 3

- Caracterizar o perfil de citocinas dos padrões Th1, Th2 e Th17 nas culturas de baço em camundongos infectados com *S. mansoni* e tratados com extrato hidroalcólico de *D. ambrosioides*.
- Investigar o efeito do extrato hidroalcólico de *D. ambrosioides* sobre a eosinofilia sanguínea e IgE total.
- Correlacionar os mediadores inflamatórios sistêmicos e a IgE sérica com o número e área de granulomas de camundongos infectados com *S. mansoni* e tratados com extrato hidroalcólico de *D. ambrosioides*.

4 RESULTADOS

4.1 CAPÍTULO 1 - Immunomodulating and Anti-parasitary Mechanisms of Plant Products in the Treatment of Schistosomiasis

Revista Brasileira de Farmacognosia
<https://doi.org/10.1007/s43450-023-00442-2>

REVIEW



Immunomodulating and Anti-parasitary Mechanisms of Natural Products in the Treatment of Schistosomiasis

Maria Gabriela Sampaio Lira^{1,2}, Ranielly Araujo Nogueira¹, Irla Correia Lima Licá¹, Gleycka Cristine Carvalho Gomes Frazão¹, Vitor Augusto Ferreira dos Santos¹, Antonio Camilo Correia Mendes¹, João Gustavo Mendes Rodrigues³, Guilherme Silva, Rafael Cardoso Carvalho¹, Flávia Raquel Fernandes Nascimento^{1*}

Received: 20 July 2022 / Accepted: 1 August 2023

© The Author(s) under exclusive licence to Sociedade Brasileira de Farmacognosia 2023

1 Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal do Maranhão, São Luís, MA, Brazil

2 Laboratório de Imunofisiologia, Departamento de Patologia, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal do Maranhão, São Luís, MA, Brazil

3 Departamento de Educação, Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Maranhão, Zé Doca, MA, Brazil

4 Faculdade de Medicina, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal do Maranhão, São Luís, MA, Brazil

5 Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil

6 Departamento de Educação, Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Maranhão, São Raimundo das Mangabeiras, MA, Brazil

*Corresponding author

Flávia Raquel Fernandes Nascimento

flavia.nascimento@ufma.br

Published online: 21 September 2023

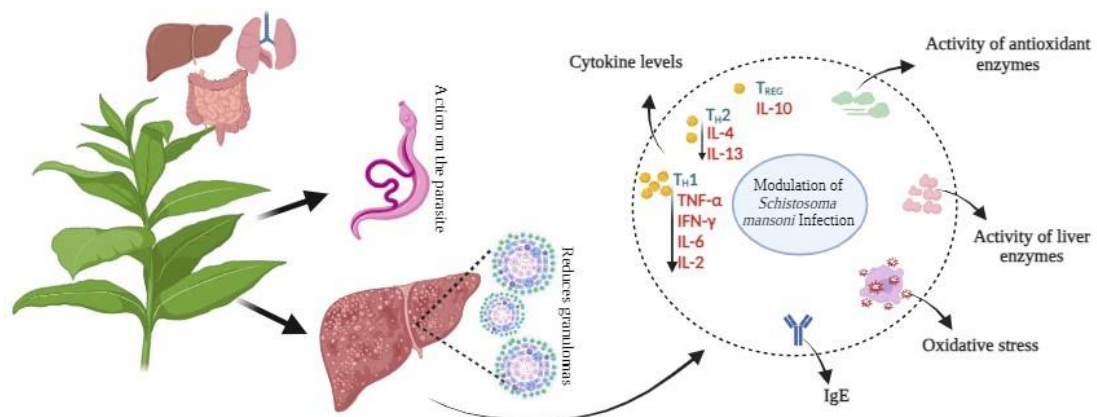
Springer

Abstract

In this review, original research articles on plant extracts, essential oils, and their bioactive compounds with therapeutic activity against *Schistosoma mansoni* were gathered to understand their mechanisms of modulation of the immune response in the vertebrate host and antiparasitic effects. Only 31 articles were included because they addressed research involving the use of plant products in the treatment of schistosomiasis mansoni. The treatment with plant products acts directly on the parasite, reducing mating rates, survival, and motility, and causing damage to the integument, which reduces the number of eggs and granulomas in the vertebrate host. By modulating the immune response during the infection, treatment with plant products promotes the reduction of pro-inflammatory cytokine levels, particularly those with a T helper 1 (Th1) immune profile, as well as activating important cells (neutrophils, macrophages, T lymphocytes, and B cells) to guarantee the survival of the host during infection by *S. mansoni* and modulating the expression of molecules and enzymes that decrease the pathogenesis of the disease. Thus, plant products can be promising alternatives capable of generating positive effects on the immunopathogenesis of schistosomiasis.

Keywords Bilharzia · Chemokines · Immunomodulatory effect · Natural products · Oxidative stress · Parasitic disease

Graphical abstract



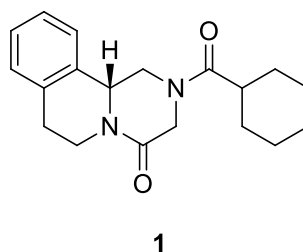
Introduction

Schistosomiasis, also known as bilharziasis, is a parasitic infection caused by trematode worms of the genus *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907 (Satoskar et al. 2009). It is one of the most neglected tropical diseases and a major public health problem in 78 developing countries, only second to malaria as the most damaging parasitic disease (Bruun and Aagaard-Hansen 2008; WHO 2018). Schistosomiasis affects approximately 240 million people in the tropics and subtropics, and 700 million live in endemic areas at risk of infection (WHO 2018). In Brazil, the species *S. mansoni* is the only one with recorded occurrence. The disease is widespread, affecting approximately 6 million inhabitants with its most severe forms (Rollemberg et al. 2011), especially in the Brazilian Northeast (WHO 2018).

Infection by *S. mansoni* in vertebrate hosts triggers complex mechanisms of the immune response (Souza et al. 2011). In the pre-postural acute phase of the disease, there is a predominance of a T *helper* 1 (Th1) immune response, characterized by the production of pro-inflammatory cytokines that activate innate immune cells, such as macrophages (Turner et al. 2011), for a classically activated profile (M1) (Pearce et al. 2004; Licá et al. 2023). With the onset of oviposition, soluble egg antigens (SEA) promote a potent induction of a Th2-type response, responsible for the production of anti-inflammatory cytokines, leading to a decrease in the Th1 response and an increase in the production of IgG4 and IgE antibodies, in addition to the differentiation of alternatively activated eosinophils and macrophages (M2) (Barron and Win 2011; Licá et al. 2023). The Th2 response is important in *S. mansoni* infection because it allows the formation of granulomas, the main pathology of the disease, and is essential for the survival of the host by sequestering harmful antigens (Hams et al. 2013). In contrast, if the Th2 response is not well-modulated, it contributes to the development of liver fibrosis and chronic morbidity (Hesse et al. 2001). In the chronic post-postural phase of the disease, Th1 and Th2 responses are mainly regulated by the cytokine IL-10 (Hams et al. 2013). This mediator, together with IL-4, decreases the Th1 response and prevents severe inflammatory diseases during schistosome infection (Hoffmann et al. 2000; Pearce et al. 2004). Immunomodulation during *S. mansoni* infection is significantly associated with changes in the balance of cytokine profiles (Hams et al. 2013), and deregulation of these molecules will affect the expression of various immune responses (Powell; Sonnenfeld 2006). Therefore, the ability to modulate the immune system should be further investigated in all therapeutic approaches.

In schistosomal chemotherapy, (±)-praziquantel (PZQ), a pyrazine-isoquinoline sold under the brand name of biltricide, has been the drug of choice for over 30 years (Mutapi et al.

2017; Vale et al. 2017). Praziquantel is commercially available as a racemic mixture and the (*R*)-enantiomer (**1**) has the anti-parasitic activity. However, studies focused on understanding the mechanisms of action of praziquantel demonstrate that it causes side effects and that young parasites are not susceptible to the drug, as are adult worms (Seto et al. 2011). As a result, low cure rates, treatment failures after praziquantel administration, and the existence of parasite strains with reduced susceptibility, reinforce the need to develop new, safe, and effective schistosomicidal drugs (Al-Olayan et al. 2016). Therefore, schistosomiasis remains a threat on a global scale and requires attention due to the limitations of the use of praziquantel and the lack of vaccines. Other synthetic antischistosomal drugs include metrifonate, an organophosphorus compound originally used as an insecticide; oxamniquine, a tetrahydroquinoline derivative; and artemisinin derivatives, antimalarial sesquiterpene lactones containing an unusual peroxide bridge (da Paixão Siqueira et al. 2017).



The value of plant products (total extracts and their secondary metabolites), particularly those produced by plant species, is increasingly being recognized for the treatment of schistosomiasis (Jatsa et al. 2019b). Of the 71 plant species included in the National List of Medicinal Plants of Interest to the Brazilian Health System or “Sistema Único de Saúde” (RENISUS), some have already been evaluated for the treatment of schistosomiasis, which are listed in Table S1 (Supplementary material).

Natural compounds can present both an antiparasitic effect and modulate and regulate the mechanisms of the immune response, preventing the chronic evolution of the disease and benefiting the vertebrate host (Rodrigues et al. 2020). Furthermore, the different natural compounds used in schistosomiasis therapy can be a starting point for discovering molecules for the development of effective and accessible drugs for the treatment of this parasitosis.

Search Strategy

This review assembled original research articles published in English from 2008 to 2021, using databases PubMed, LILACs, and Medline, with the following inclusion criteria: studies

involving plant products and their bioactive compounds used in the treatment of schistosomiasis to demonstrate the mechanisms of modulation of the immune response in the host and its antiparasitic effects, in addition to providing evidence of the efficacy of the products used against parasitosis. The following descriptors were used: “Treatment plants schistosomiasis”, “Treatment plants immunomodulation and *Schistosoma mansoni*”. The exclusion criteria were as follows: duplications, studies not related to the treatment of schistosomiasis mansoni (diagnosis, vaccine study, molluscicides), and plants and herbal formulations evaluated for the treatment of urinary schistosomiasis. A total of 216 articles were found and only 31 were included in the review because they addressed research involving the use of plant products in the treatment of schistosomiasis mansoni. Other studies were excluded based on the following criteria: studies not related to the treatment of schistosomiasis mansoni, plant products evaluated in the treatment of urinary schistosomiasis, and duplications.

Parasite Lifecycle

Schistosoma mansoni has a complex life cycle (Fig. 1) involving vertebrate and invertebrate hosts in addition to the external environment (Hams et al. 2013). The cycle includes the sexual reproduction of adult worms in the human vascular system (definitive host) and an asexual phase in snails of the genus *Biomphalaria*, which are intermediate hosts, followed by a return to the human host after exposure to contaminated water (Mcmanus et al. 2018).

The transmission cycle of *S. mansoni* begins when viable eggs of the parasite are eliminated through the feces by a definite host. In contact with freshwater bodies, the free-swimming ciliated larvae called miracidia release from the eggs and begin their journey to infect the *Biomphalaria* snails (Nelwan 2019). Inside the snails, the miracidia transform into sporocysts I (mother sporocyst), which by polyembryony produce approximately 150 to 200 sporocysts II (daughter sporocyst) (Nelwan 2019). The daughter sporocysts migrate to the digestive glands and ovotestis of the mollusk and have the potential to originate several cercariae, after approximately 30 days post-infection. These larvae are shed by infected snails upon stimulation with light and heat and actively swim to infect the vertebrate host through penetration of skin and mucous (Bustinduy and King 2014).

In the process of penetrating the skin of the vertebrate host, cercariae lose their tails and remain in the dermis or connective tissue for 2–3 days, undergoing modifications, and developing into skin schistosomula (Bustinduy and King 2014). This schistosomulum reaches the bloodstream being passively conducted to the heart and after to the lungs, developing into

pulmonary schistosomula (Lee et al. 2014). Approximately 2 weeks after infection, schistosomulae return to the heart and are rapidly transported to the hepatic portal system or remain systemically circulating through various organs before reaching the arteries derived from the same system (Lee et al. 2014).

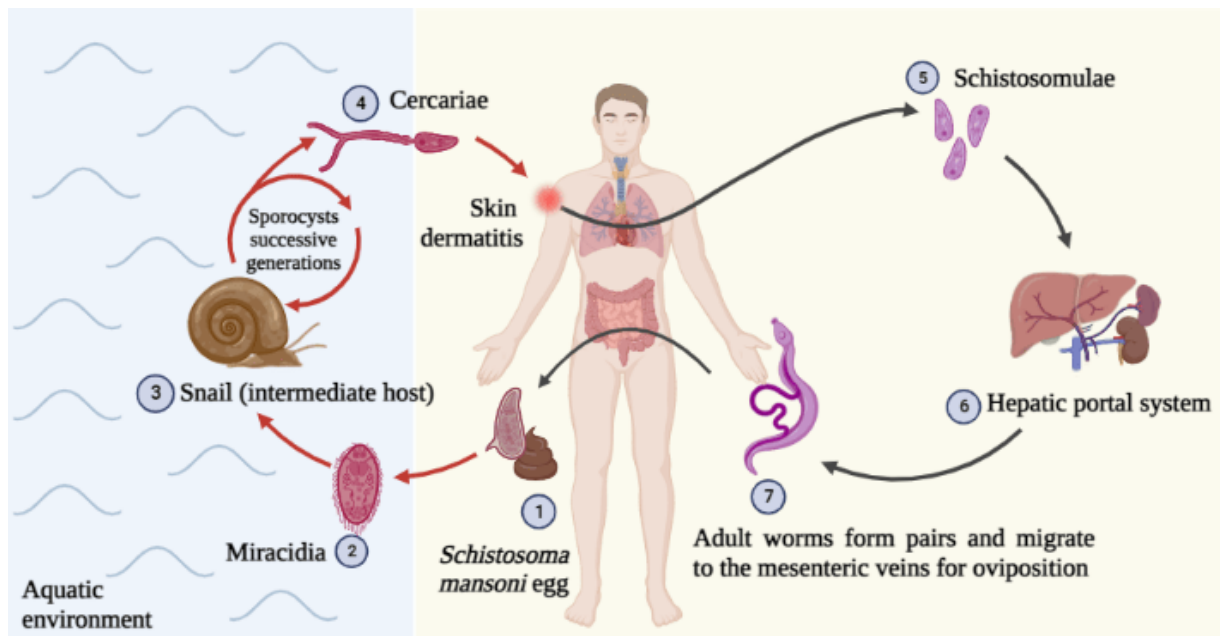


Fig. 1 Parasite life cycle. Viable eggs of the parasite eliminated in the feces of a defined host (1), release miracidia larvae when in contact with water (2) which infect the snails (*Biomphalaria* spp.) (3). Inside the snails, the miracidia transform into sporocysts I, which by polyembryony produce sporocysts II. After approximately 30 days post-infection sporocysts II produce cercariae, which are eliminated from snails by light and heat stimulation (4). Cercariae actively swim to infect the vertebrate host by penetrating the skin (dermatitis) and mucous membranes and later transform into schistosomula (5). The schistosomula reaches the bloodstream, being passively conducted to the heart and after to the lungs. After the worms migrate to the hepatic portal system and become adults (6). The adult worms mate and move to the intestines, where they lay eggs that can be passed in the stool, completing the parasite's life cycle (7). However, most eggs are still trapped in the intestinal tissue and can also be carried to other organs, such as the liver and spleen, inducing an intense granulomatous inflammatory response, responsible for the formation of fibrosis.

After about 30 days, schistosomula become adult worms, female or male, that form pairs and migrate to the mesenteric veins, for oviposition (Bustinduy and King 2014). Approximately five weeks post-infection, female worms begin to lay eggs in blood vessels. Female schistosomes produce about 300 eggs per day that are laid in the mesenteric circulation (Bustinduy and King 2014). Some eggs trapped in intestinal submucosa induce inflammatory responses that facilitate their passage through the intestinal wall directly into the lumen, and after to the environment, thus completing the parasite life cycle (Lee et al. 2014; Mcmanus et al. 2018). However, most of the eggs are still trapped in intestinal tissue and can be carried to

other organs, such as the liver and spleen, inducing a severe granulomatous inflammatory response, which is responsible for fibrosis formation. This condition is the main cause of morbidity in schistosomiasis, characterized by the presence of obstructive vascular lesions, hepatosplenomegaly, hepatic fibrosis, portal hypertension, ascites, and fatal bleeding from esophagogastric lesions (Turner et al. 2011).

Conventional Treatment

Schistosomiasis is a parasitic disease that has attracted increasing attention and funding for its control (Fenwick and Webster 2006). The main disease control strategy is treating infected individuals with the choice of a single drug, praziquantel (Appiah et al. 2000). The development of this medication in the 1970s represented one of the largest advances in disease chemotherapy, which was later transferred to clinical trials and used on a large scale during the 1980s (Mutapi et al. 2017).

Praziquantel is the drug of choice for schistosomiasis treatment and is the main component of disease control programs (Mutapi et al. 2017). The World Health Organization recommends its use at a single dose of 40 mg/kg, and since 2007, more than 150 million people have been treated with this drug (WHO 2018). Many characteristics make praziquantel the best option for treating schistosomiasis: a) it is effective against the three main species of the parasite: *S. mansoni*, *S. haematobium*, and *S. japonicum* (Vale et al. 2017); b) it has good pharmacological properties, such as a good solubility in water (0.2 mg/ml in a 1:4 solution of DMSO:PBS, PH 7.2) and organic solvents (EtOH, DMSO, and dimethyl fomamide), a rapid absorption (80%) with a serum half-life of 0.8 to 1.5 h when orally administrated, and a low toxicity; c) it is clinically effective against a broad-spectrum of infections caused by cestodes and trematodes (Vale et al. 2017); and) its cost is relatively low (Seto et al. 2011).

The cure rates of praziquantel are generally between 60 and 90%, with cure rates of 100% being rare, which is likely due to reinfections in areas of high transmission and other factors related to the parasite life cycle (Doenhoff et al. 2009). For example, praziquantel is effective against adult schistosomes; however, it is less effective on juvenile worms (Vale et al. 2017). Furthermore, as with other drugs, reinfection is still a problem after treatment, and there is a persistent fear that the widespread use of the drug could eventually lead to the development of parasite strains with reduced susceptibility to the praziquantel, as already reported in some regions where the infection is considered endemic (Couto et al. 2011).

Praziquantel is the only drug used in chemotherapy programs for schistosomiasis, and due to the problems reported in its applicability, greater efforts, and investments in developing new therapeutic alternatives to control *S. mansoni* infection are imperative (Bais and Greenberg 2018). In addition, the absence of an effective vaccine against schistosomiasis contributes to a joint and mandatory effort to discover antiparasitic agents to treat the disease, not to mention the fact of the lack of knowledge of the mechanisms of action of PZQ, which raises concerns about the use of this drug as the only therapeutic strategy for schistosomiasis (Nogueira et al., 2022).

Plant Products: An Alternative Treatment

Plant extracts are known to be good sources of pharmacologically active compounds against various diseases, including parasitic infections (Simoben et al. 2018). Furthermore, medicinal plants are believed to possess molecules with significant advantages over synthetic molecules (Cordell 2014). Plant extracts are the most evaluated and studied because of the worldwide plant diversity, especially in Brazil (Nodari and Guerra 2001). Owing to the presence of secondary metabolites in different parts of a plant species, plant products (extracts and secondary metabolites) can be used as prototypes for the development of new antiparasitic drugs (de Castro et al. 2013).

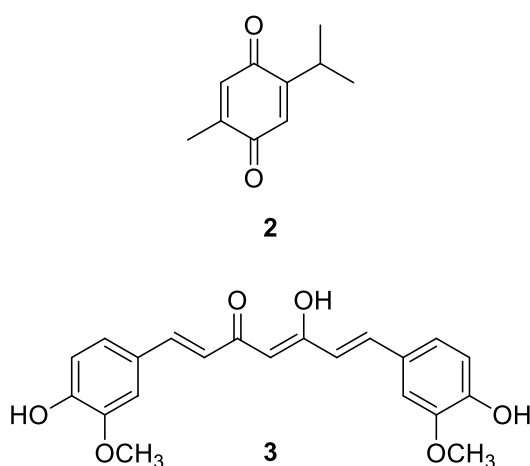
The criteria for selecting a plant product for a particular study and validation involve a) ethnobotanical investigations, taking into account pre-existing knowledge regarding the therapeutic use of the species of interest (Lifongo et al. 2014); b) phytochemical investigations, through the isolation, purification, and characterization of active principles (Ibrahim et al. 2014); c) pharmacological studies, where the pharmacological properties of the extract and isolated chemical constituents have been investigated (Ibrahim et al. 2014); d) synthetic organic chemistry for the transformations of active principles to improve pharmacological properties (Maciel et al. 2000); e) medicinal chemistry and pharmacological studies to establish the structure/activity relationship and the mechanisms of action of the active principles (Maciel et al. 2002); and finally, f) the development of formulations for the production of phytotherapeutics (Maciel et al. 2002).

Many parameters are frequently evaluated in studies of plant compounds for the development of new schistosomiasis treatments, such as morphological alterations, oviposition, motor alterations, the ability to kill the adult worms (Moraes 2012), and modulation of the host's immune response (Kamel and El-Shinnawy 2015). The granulomatous reaction around the eggs

of the parasite, with subsequent formation of tissue fibrosis, is an inflammatory process that leads to the destruction of an extensive area of the organ where it occurs (Bergquist 2002). Therefore, the search for alternatives that can reduce the load of eggs in tissues can minimize the clinical manifestations of schistosomiasis (Huang et al. 2006). Modulation of the immune response by plant products and their synthetic derivatives can yield promising results for the treatment of schistosomiasis because it can reduce granulomatous inflammation and, consequently, reduce the pathology of the disease (Allam 2009; Miranda et al. 2013; Kamel and El-Shinnawy 2015; Rodrigues et al. 2020).

Effects of Plant Compounds

Recently, studies evaluating efficacy of antioxidants, alone or concurrently with antischistosomal drugs targeting not only parasite but also pathologies associated to infection have been reported. It has been demonstrated that antioxidants, such as thymoquinone (2) and curcumin (3) present in extracts of *Nigella sativa* L., Ranunculaceae, and the spice turmeric (*Curcuma longa* L., Zingiberaceae), respectively, are able to inhibit parasitic antioxidant enzymes as well enzymes related to glucose metabolism (hexokinase, HK and glucose-6-phosphate, G-6-PDH) culminating in an increase of oxidative stress in the parasite making it vulnerable to damage by the host immune attack (Mahmoud et al. 2002; de Paula Aguiar et al., 2016).

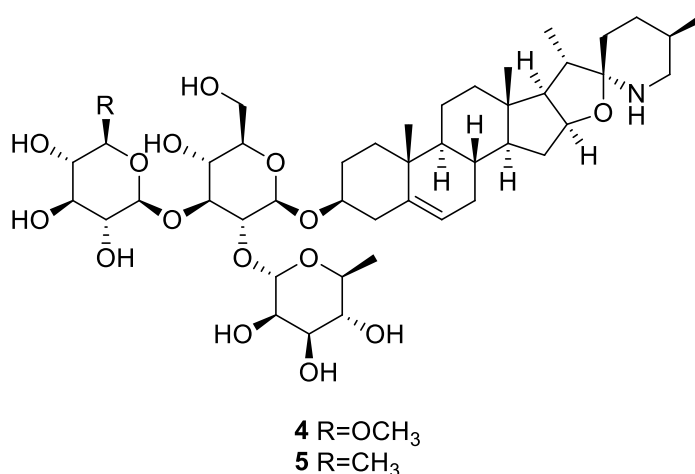


Regarding *N. sativa*, its effect on liver functions and antioxidant capacity were experimentally evaluated in mice infected with *S. mansoni* orally with 2.5 and 5 ml/kg, alone or combined with PZQ at a dose of 500 mg/kg for 2 consecutive days. *N. sativa* alone was able to reduce the number of *S. mansoni* worms in the liver, decrease the total number of eggs, as

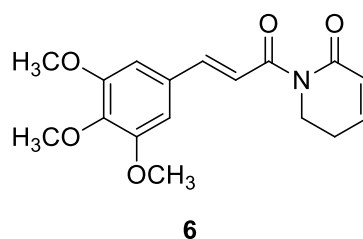
well as reduce hepatic granulomas and serum levels of L-alanine aminotransferase (ALT) and γ -glutamyl transferase (GGT). It restored to normal levels the liver lipid peroxide (LPD) and reduced glutathione (GSH), lactate dehydrogenase (LDH and enzyme superoxide dismutase (SOD) levels. Despite the good results, when *N. sativa* was combined with PZQ the observed parameters were even more intensified, with a total worm load reduced by up to 99% (Mahmoud et al. 2002).

Curcumin (**3**), a phenolic compound isolated from rhizomes of the spice turmeric (*Curcuma longa* L., Zingiberaceae) was investigated and showed efficient anti-schistosomal potential. Mice were infected with 80 *S. mansoni* cercariae and injected intraperitoneally with curcumin at a total dose of 400 mg/kg body weight. Low serum level of both interleukin (IL)-12 and tumor necrosis factor alpha (TNF- α), but IL-10 level was not significantly altered after treatment. Specific IgG and IgG1 responses against both soluble worm antigen (SWAP) and soluble egg antigen (SEA) were augmented with curcumin treatment, but IgM and IgG2a responses were not significantly changed (de Paula Aguiar et al. 2016). Curcumin treatment modulates cellular and humoral immune responses of infected mice by *S. mansoni* and lead to a significant reduction of parasite burden and liver pathology in acute murine (Allam 2009).

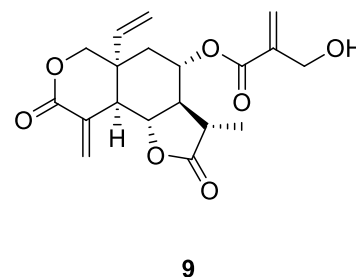
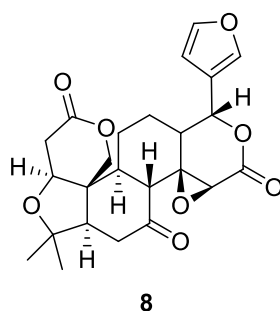
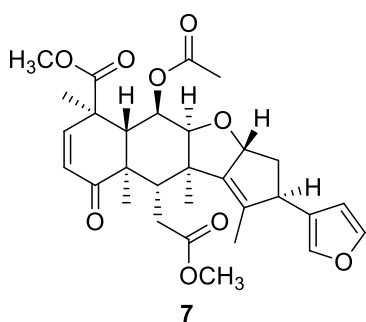
Two glycoalkaloids from the fruits of *Solanum lycocarpum* A.St.-Hill., Solanaceae, solasonine (**4**) and solamargine (**5**), have demonstrated *in vitro* effects on *S. mansoni* infection (Miranda et al. 2012). Exposure to these compounds affected the survival of adult *S. mansoni* worms, caused the separation of worm couples, and promoted desquamation of the tegument of the parasite within 24 h (Miranda et al. 2013). The alkaloidic extract (20, 32, and 50 μ g/ml), solamargine (32 and 50 μ M), solasonine (50 μ M), and equimolar mixture of glycoalkaloids (20, 32, and 50 μ M) caused the death of 100% of parasites within 24 h (PZQ: 10 μ M/3.12 μ g/ml) (Miranda et al. 2012).



Piper tuberculatum Jacq., Piperaceae, which contains the alkaloid piplartine (**6**), decreases motor activity and at a concentration of 7.5 μM caused the death of all schistosomula within 120 h. Additionally, piplartine has been as effective as praziquantel (10 μM) to kill adult stage of *S. mansoni* worms and their schistosomicidal activity was demonstrated at a concentration of 9.5 μM within 24 h of *in vitro* exposure (Moraes et al. 2012), in addition to causing a reduction in the production of eggs excreted through the feces (Simões et al. 2015).

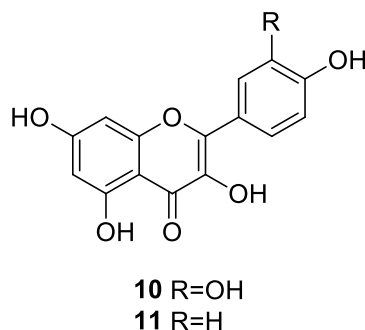


Azadirachta indica A. Juss., Meliaceae, which includes triterpenoids, such as nimbin (**7**) and limonin (**8**), demonstrates the reduced survival of *S. mansoni* worms and their ability to promote tegumentary changes *in vitro* (Acheampong et al. 2020). *Gymnanthemum amygdalinum*, Delile, Sch.Bip, Asteraceae, presents a sesquiterpene lactone with promising schistosomicidal activity referred to as vernodalin (**9**), which was able to eliminate motor activity and ovipositioning of adult worms of *S. mansoni* after 24 h of exposure (Gouveia et al. 2018; Acheampong et al. 2020). The cercaricidal activity of *A. indica* (3 h IC_{50} 27.62 $\mu\text{g}/\text{ml}$) and *G. amygdalinum* (3 h IC_{50} 35.84 $\mu\text{g}/\text{ml}$) was in a time and concentration-dependent manner. Worm recovery after treatment with *G. amygdalinum*, *A. indica*, and praziquantel *in vivo* was 48.8, 85.1, and 59.9%, respectively. Therefore, these plants and their active constituents could be used as potent alternatives for managing schistosomiasis (Acheampong et al. 2020).

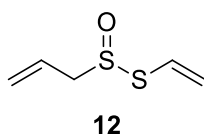


Quercetin (**10**), a flavonol found in *Styrax camporum* Pohl., Styracaceae, has moderately reduced the motor activity of *S. mansoni* (100 μM), and is a selective inhibitor of its NAD^+ catabolizing enzyme at an IC_{50} value of 3.9. This enzyme is an important target located in the

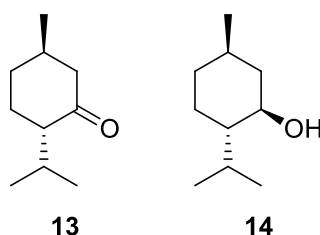
external tegument of the adult worm and may be involved in parasite survival through manipulation of the host immune regulatory pathways (Kuhn et al. 2010). Kaempferol (**11**), a flavonol that can also be isolated from *Styrax pohlii* A.DC and *S. camporum* Pohl., Styracacea, triggers the separation of adult worms from *S. mansoni* *in vitro* at a concentration of 100 μ M (Braguine et al. 2012).



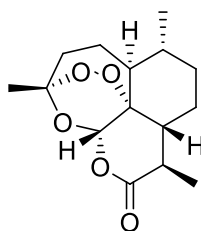
Garlic (*Allium sativum* L.) and onion (*Allium cepa* L.), from the Amaryllidaceae, can normalize functional enzymes in the liver and improve the antioxidant status of *S. mansoni* infection, causing a significant reduction in worm burden and egg count (Mantawy et al. 2011). Garlic with allicin (**12**), as its main constituent, has been demonstrated *in vitro* to cause ultrastructural changes in the integument, possibly causing the formation of projections (5 mg/ml), small damage to the tubercles and alteration in the number and morphology of the spines (10 mg/ml), in addition to the formation of vesicles and ulcers in tubercles (15 and 20 mg/ml) and cause significant effects on the survival of worms at concentrations above 20 mg/ml (Lima et al. 2011). *In vivo*, garlic oil extract used in the treatment of mice infected with *S. mansoni* at a dose of 100 mg/kg reduced the burden of worms and eggs in feces and intestinal tissue, decreased TNF and ICAM-1 expression, reduced liver tissue damage, and increased host immunity by reducing reactive oxygen species (Kamel and El-Shinnawy, 2015). The results observed by Kamel and El-Shinnawy (2015) were attributed to the major constituents of *A. sativum*, including allicin.



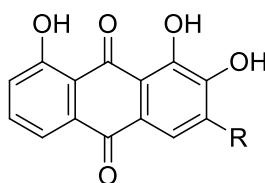
Dejani et al. (2014) reported that 100 mg/kg of the ethanolic extract of *Mentha piperita* L., Lamiaceae, commonly known as peppermint, exhibited parasitic and immunomodulatory properties on *S. mansoni* through experimental infection, raising levels of IgG2a, IgG1 and IL-10 significantly when compared to the positive control (PZQ = 500 mg/kg). This extract modulated immune cells and molecules involved in the inflammatory process, suggesting a prolonged inflammatory effect of this compound in a schistosomiasis model (Dejani et al. 2014). Peppermint contains menthone (**13**) and menthol (**14**), which were studied for antiparasitic and immunomodulatory properties on *S. mansoni* (Zaia et al., 2016). The results of this study demonstrate that an herbal medicine composed of menthol and menthone has immunomodulatory and anti-inflammatory effects in a murine model of schistosomiasis when administered for long periods of time (up to 60 days) at a dose of 50 mg/kg (diluted in PBS - Phosphate Buffered Saline Solution), and may contribute to the reduction of the pathological effects caused by *S. mansoni*, as well as to control the pathophysiology of the infection. This herbal medicine can act by decreasing the plasma levels of IL-4 and IL-10, indirectly modulating blood eosinophils, when used for up to 60 days, demonstrating significant effects when compared to the positive control (PZQ = 400 mg/kg) (Zaia et al. 2016).



Clinical studies have been conducted using leaf extract of *Artemisia annua* L., Asteraceae, which is currently used for the treatment of malaria and has demonstrated efficacy in controlling the population of *Schistosoma* worms (Lescano et al. 2004). *Artemisia annua* belongs to the artemisinin family of sesquiterpene trioxane lactones, with an original compound referred to as artemisinin (**15**), which has been shown to be effective against *Schistosoma* species since the 1980s (Gouveia 2018). Treatment of experimentally infected mice with 500 mg/kg of the drug resulted in structural damage to the integument of *S. mansoni* worms 30 days after infection (Frezza et al. 2013), as well as reduced female worm count and oviposition in *S. mansoni* (Lescano et al. 2004). *Artemisia annua* leaves (33.5-55.9 mg) used in *in vivo* clinical screening, 96.4% cure rate in *S. mansoni* infection.

**15**

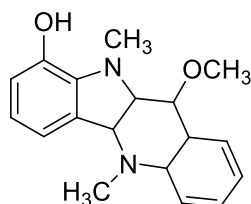
Treatment of *S. mansoni* infection with the methanolic extract of roots from *Ozoroa pulcherrima* (Schweinf.) R.Fern, & A.Fern., Anacardiaceae, at an average dose of 200 mg/kg resulted in a reduction in the load of eggs and worms as well as an increase in the anti-inflammatory and antioxidant capacities of the host (Jatsa et al. 2019b). The beneficial effects of *O. pulcherrima* in protecting the liver tissues of hosts infected with *S. mansoni* can be attributed to secondary metabolites, including anthraquinones and cardiac glycosides. Anthraquinones exhibit anti-inflammatory activity and likely reduce the migration of inflammatory cells, such as eosinophils, neutrophils, lymphocytes, and macrophages, around schistosome eggs trapped in the liver, whereas glycosides show antiproliferative activity, protecting the hepatic tissue from the invasion of schistosome inflammatory cells. The *in vitro* activity of two anthraquinones in the treatment of schistosomiasis is reported in the literature, which are norobtusifoline (**16**) and kwanzoquinone (**17**), extracted of roots of *Hemerocallis fulva* (L.) L., Asphodelaceae. Compound **16** was able to completely immobilize all cercariae of *S. mansoni* after an exposure time of 15 s (at 11.4 μ M) and interrupt the motor activity of all adult worms in 16 h. Compound **17** immobilized cercariae after 12 min (at 87 μ M) and affected the movement of adult worms also at 16 h (at 175 μ M).



16 R=CH₃
17 R=CH₂OH

The aqueous extract of *Melochia pilosa* (Mill.) Fawc. & Rendle, Malvaceae, exhibits anti-schistosomal activity, and these effects are associated with the chemical compounds present in this extract, which include alkaloids, phenols, tannins, and terpenoids. According to the study by Jatsa et al. (2015), the indoloquinoline alkaloid Indolo[2,3-b] quinolines (**18**), present in the *n*-butanol fraction of the aqueous extract of *M. pilosa*, caused the death of 100% of the

worms after 24 h of incubation with 8 mg/ml (LC50 of 1.25 mg/ml (0.98 - 1.62)) as occurred with the worms incubated with PZQ (100 µg/ml) after the same period. In addition, it was observed with the *n*-BuOH fraction (0.25 to 2 mg/ml) a reduction of 25 to 79% in the motor activity of *S. mansoni* worms, a decrease of 97 to 85% in the number of eggs (8 to 0.25 mg/ml), in addition to inducing an antioxidant response (81.14 ± 0.56 µg/ml).



18

Toxicity of Plant Products

The biological activity of a molecule against microorganisms and parasites is important for its characterization; however, knowledge of its toxicity to mammalian cells is also crucial (Campelo et al. 2018). Therefore, even if laboratory results are encouraging, toxicity studies should be performed before administering a molecule or drug to humans (Gouveia et al. 2018).

In general, the oral administration of extracts and vegetable oils used in mice, considered in this review, demonstrated no alteration in the growth, food, and water intake of animals (Jatsa et al. 2009; Kamel et al. 2015; Zaia et al. 2016; Almeer et al. 2018; Beshay et al. 2019). However, more detailed studies on the toxicity of products from different plant species and their individual secondary metabolites are required. A study by Jatsa et al. (2009) analyzed *M. pilosa* extract and did not identify signs of toxicity, which include asthenia, anorexia, hypoactivity and diarrhea, and mortality, which was verified when the extract was administered at a dose of >20 g/kg. Jatsa et al. (2019b) also evaluated the extract of *O. pulcherrima* and found that it did not exhibit a toxic effect on the hepatic parenchyma of mice after 28 days of exposure when doses of 200 and 400 mg/kg were administered.

Some chemical constituents that have been evaluated, such as the compound piplartine (6)–presented low cytotoxicity, which was verified when treatment with the chemical constituent was performed at the maximum concentration evaluated in the study (31.5 µM) (Moraes 2012). Allicin (12) is a protective agent against chemical toxicity, and low levels of toxicity have been reported in studies involving the treatment of schistosomiasis with plant components (Mantawy et al. 2011; Kamel and El-Shinnawy et al. 2015).

Despite the need for further evaluation of the toxicity of the plant constituents used in the treatment of schistosomiasis, the doses used in studies involving plant products (Table S2) appeared to be highly toxic to the *S. mansoni* parasite, but not to mice. Toxicity to *S. mansoni* that is associated with tannins, saponins, and flavonoids has been previously reported (Braguine et al. 2012). Treatments with products from plant species resulted in a decrease in the number and copulation of the worms, causing a consequent reduction in the number of eggs present in the tissues (hepatic and/or intestinal), as well as causing the regeneration of the surrounding hepatic tissue of old granulomas, with the mortality of worms (Jatsa et al. 2009; Kamel et al. 2015; Zaia et al. 2016; Al-Olayan et al. 2018; Almeer et al. 2018; Beshay et al. 2019).

Action on Parasite

The treatment of *S. mansoni* infection using plant products has been shown to have anti-schistosomal activity of several compounds (Jatsa et al. 2016; Yones et al. 2016; Aly et al. 2017; Oliveira et al. 2017). From experimental data, it was found that products based on plant species could cause changes in adult worms of *S. mansoni* in terms of mating, motility, survival time and cause changes in the tegumentary layer, with the observed effects being dependent on the concentration of the extracts (Kamel and El-Shinnawy 2015; Jatsa et al. 2016; Yones et al. 2016; Aly et al. 2017; Oliveira et al. 2017). The tested products often influence the natural mating process, causing *S. mansoni* worm couples to separate (Kamel and El-Shinnawy 2015; Yones et al. 2016). In the study by Yones et al. (2016), approximately 95% of couples were separated within the first 2 h using 500 µg/ml of edible pomegranate peel extract, whereas the negative control group demonstrated couple separation approximately 10 h after incubation.

In motility and survival, a reduction in parasite movement has been reported due to treatments with plant compounds, which interfere with the survival rate of adult *S. mansoni* worms (Jatsa et al. 2016; Aly et al. 2017; Oliveira et al. 2017). Yones et al. (2016) and Oliveira et al. (2017) found that extracts of plant species can lead to the death of 100% of parasites within a few hours (from 2 to 4 h). It is important to note that the literature does not emphasize the differences in motility and survival rates between adult male and female worms in response to different concentrations of plant species. Several studies showed that the products of plant species cause the worms to become unpaired, slowing down muscle contractions, thus reducing motility and causing paralysis, leading the parasite to death in most cases (Kamel and El-Shinnawy 2015; Yones et al. 2016; Aly et al. 2017). Paralysis in worms appears to be associated

with important neurotransmitters or neuromodulators, such as dopamine, acetylcholine, and serotonin (Noel 2008).

Integumentary changes have also been reported in studies after *in vitro* evaluation and using scanning electron microscopy (SEM) (El Ridi et al. 2012; de Oliveira et al. 2014). Many functions and characteristics of the integument of *S. mansoni* have increased the importance of studying it because it acts as an interface between the parasite and its environment in the host (Xião et al. 2002). The changes in integuments induced by treatment with plant products caused damage to the oral and acetabular cups of male and female schistosomes (Yones et al. 2016). According to Shaw and Erasmus (1987), damage to suction cups restricts the feeding of damaged worms, resulting in their death. In addition, these treatments cause extensive desquamation of the tegument in adult schistosomes, particularly in the dorsal region (Dkhil 2014; Kamel and El-Shinnawy 2015, Yones et al. 2016). In addition, the literature described the formation of visible bubbles in the tegument of worms exposed to treatment with plant products (Kamel and El-Shinnawy 2015). It is believed that morphological changes caused by a compound with schistosomicidal activity on the sarcoplasmic membrane and integument of the parasite may be accompanied by an increase in exposure to antigens on the surface of the worm (Xião et al. 2012).

In a study on the treatment with pumpkin seed extract, cutaneous damage was verified, with the loss of some tubers and spines and the formation of wrinkles and blisters, which were attributed to the secondary metabolites of the extract (Dkhil 2014). Kamel and El-Shinnawy (2015) found that after treating *S. mansoni* infection with *A. sativum* extract, the worms showed changes in the appearance of the tubers that often appeared collapsed, wrinkled, and reduced in size and number. The most prominent damage to the tegument of worms in contact with *A. sativum* extract was in the form of edema and blistering on worm spines, which were not lost as a result of treatment (Kamel and El-Shinnawy 2015).

Changes in the integument lead to the disappearance of the worm's immune dysfunction, which can be easily recognized by the host's immune system (Xião et al. 2012). Furthermore, the integumentary changes induced by the treatments may affect the metabolism of the worm and consequently lead to its death (Kamel and El-Shinnawy 2015). The identification of integumentary changes in the parasite is important to connect it with the host immune response, which is necessary to complement the activity of the product used in the treatment. Therefore, the integument of schistosomes has been investigated in the development of new anti-schistosomal alternatives from the late 1940s to the present day (de Oliveira et al. 2014). As the survival of *S. mansoni* depends on the tegument, it is essential to relate this structure not only

to the immune evasion of the host, but also to the absorption of nutrients, metabolism, and selective absorption of drugs (Pereira et al. 2011).

Because of the above-mentioned mechanisms of action in the parasite, infection in the vertebrate host also undergoes changes. Morphological and ultrastructural changes in the parasite may explain the simultaneous reduction in worm and egg burdens in the liver and intestinal tissues of mice treated with extracts of plant products, as well as the increase in the percentage of dead eggs (Allam 2009; Miranda et al. 2013; Almeer et al. 2018). This is an important finding because the main laboratory diagnosis of this disease is the presence of eggs. Eggs are considered the main cause of cellular immunological imbalances such as macrophage compromise and cytokine production (Miranda et al. 2013).

Improvements have also been reported in relation to the size and quantity of granulomas, which are reduced by treatment with plant products, together with a decrease in tissue fibrosis (Allam 2009; Almeer et al. 2018). However, these actions of plant products are probably also associated with a series of immunological factors that permeate the immune response, as described below.

Immunomodulation of Schistosomiasis Pathogenesis

Immunomodulation is an important aspect of *Schistosoma* infection. It directly influences the pathogenesis of the disease, as it is responsible for triggering changes in the immune profile of vertebrate hosts and activating complex mechanisms of the immune response, dependent on the sensitization of CD4⁺ T cells (Schwartz and Fallon, 2018).

Granuloma formation occurs in an environment that is initially pro-inflammatory and Th1-type but later rapidly polarizes to a predominance of anti-inflammatory and Th2-type profiles (Davies et al. 2004). The relative influence of Th1 and Th2 cytokines on the pathogenesis of schistosomiasis remains controversial in experimental models and studies in human populations. However, experimental studies have shown that decreased fibrosis is associated with decreased type 2 immune response and increased type 1 response (Allam 2009). In the absence of IL-4, a key cytokine that drives the Th2 response, some mouse strains overproduce several pro-inflammatory mediators, including IFN- γ , TNF- α , and nitric oxide (NO), leading to fatal acute illness after infection (Brunet et al. 1997). Increased mortality of infected mice has been reported when IL-10 deficiency is observed in the acute post-infection stage (Hoffmann et al. 2000), or in IL-4 deficiency, in which liver damage is caused by excess production of TNF- α , NO, and reactive oxygen species (La Flamme et al. 2001). Therefore,

modulation of Th1 and Th2 responses can deregulate granulomatous inflammation and, consequently, promote positive or negative changes in the pathology of schistosomiasis.

Immunomodulatory Mechanisms

Treatment of schistosomiasis with plant products can regulate or decrease the levels of cytokines, such as IL-2 and IL-6 (Mantawy et al. 2011; Kamel and El-Shinnawy 2015), IL-4 (Yones et al. 2016; Almeer et al. 2018; Rodrigues et al. 2020), IFN- γ (Miranda et al. 2013; Rodrigues et al. 2020), IL-17 (Rodrigues et al. 2020), IL-12 (Allam 2009; Kamel and El-Shinnawy 2015; Almeer et al. 2018), IL-10 (Dejani et al. 2014; Zaia et al. 2016; Rodrigues et al. 2020), TGF- β , and IL-13 (Almeer et al. 2018).

Cytokines are regulators of the immunoinflammatory response and play an important role in regulating the deposition and degradation of collagen fibers (Vaillant et al. 2001). In studies involving the treatment of schistosomiasis, cytokines have proven to be valuable agents in the immune response (Miranda et al. 2013; Yones et al. 2016; Rodrigues et al. 2020). During the treatment of *S. mansoni*-infected mice with plant species, a decrease in TNF- α and IL-12 levels usually occurs by blocking the activation of the protein kinase (MAPK)/transcription factor signaling pathway, nuclear kappa B (NF- κ B) (Fig. 2) (Allam 2009; Kamel et al. 2015; Almeer et al. 2018).

TNF- α is important for initiating granuloma formation through the positive regulation of intracellular adhesion molecule 1 (ICAM-1), which mediates cell-cell interactions and migration along the endothelium (Ho et al. 2014). Several studies have shown that plant products block the expression of leukocytes induced by TNF- α adhesion molecules, including ICAM-1 (Fig. 2) (Allam 2009; Ho et al. 2014; Kamel and El-Shinnawy 2015). In addition, some compounds have been found to inhibit the expression of IL-2 and IL-4, which are cytokines that play a role in granuloma formation (Sharma et al. 2007). Therefore, treatment with plant products appears to reduce granulomatous inflammation and granuloma size by regulating the expression of cytokines, especially TNF- α (Kamel and El-Shinnawy 2015; Almeer et al. 2018).

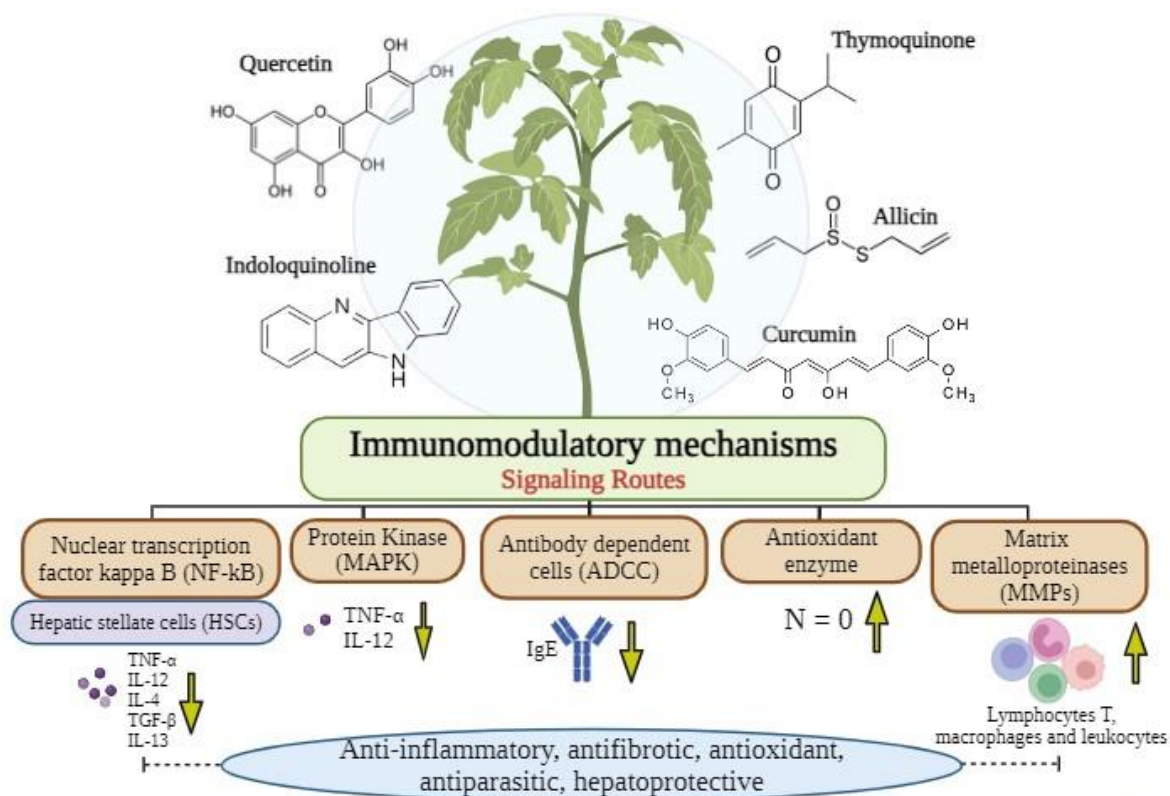


Fig. 2 Representation of the signaling pathways of immunomodulation mechanisms induced by some chemical constituents present in plant species products and their effects during the treatment of schistosomiasis. Plant products may have different secondary metabolites according to the species, which have induced a large spectrum of immunomodulatory mechanisms during *S. mansoni* infection. Some of these mechanisms include decreasing or restoring cytokine and antibody concentration, increasing reactive oxygen species, and proliferation of T lymphocytes, and macrophages, in addition to antifibrotic, antioxidant, antiparasitic, and hepatoprotective effects in treated mice.

Mice treated with plant products showed a reduction in hepatic collagen content (Allam 2009; Jatsa et al. 2016; Yones et al. 2016; Almeer et al. 2018). This finding can be attributed to the decrease in parasite load and fibrogenesis, which is dependent on cytokines, such as IL-4, TGF- β , and IL-13 (Almeer et al. 2018). The protective effect of natural compounds against hepatic fibrosis may be associated with the ability to inhibit nuclear factor kappa B (NF- κ B) in Kupffer cells, which infiltrate macrophages and consequently inhibit the activation of hepatic stellate cells (HSCs) (Bruck et al. 2007). Suppression of HSC proliferation and activation of extracellular matrix biosynthesis have been proposed as therapeutic strategies for the treatment and prevention of liver fibrosis, leading to irreversible liver cirrhosis (Duvoix et al. 2005).

Rodrigues et al. (2020) found that the extract of *Dysphania ambrosioides* (L.) Mosyakin & Clemants, Amaranthaceae, *Dysphania*, decreased the levels of IFN- γ , TNF- α , IL-4, and IL-17 after treatment at different evolutionary stages of the parasite *S. mansoni*. In contrast, an increase in IL-10 was observed in immature and mature *S. mansoni* worms after treatment. The

use of the *D. ambrosioides* extract did not significantly alter IL-12 levels (Rodrigues et al. 2020), differing from the findings of Allam (2009), Kamel and El-Shinnawy (2015) and Almeer et al. (2018) when evaluating the same cytokine with other plant products listed in Table S2. Plant products used in the treatment of *S. mansoni* infection have already been shown to be potent immunomodulatory agents that can modulate the production of immunoglobulins such as IgG (Allam 2009) and IgE (Rodrigues et al. 2020).

An extract produced from the isolated compound curcumin, a plant product derived from turmeric, was used to treat mice infected with *S. mansoni* (Allam 2009). According to Allam (2009), treatment with curcumin improves the humoral immune response, increasing the production of IgG against soluble antigens in worms and eggs of the parasite. Effective factors in protecting the humoral immune response appear to depend on IgG antibodies (Mangold and Dean 1986), particularly of the IgG1 type, which can impair larval viability and migration, interact with critical sites on surfaces exposed to membrane molecules of importance to the parasite, and may even interfere with the well-being of adult worms in the liver (El Ridi 2002). IgG1 is a Th2-dependent immunoglobulin, whereas the IgG2a isotype is Th1-dependent (Finkelman et al. 1990).

A study by Rodrigues et al. (2020) showed that the hydroalcoholic extract of *D. ambrosioides* reduced the concentration of IgE in the stages in which the parasites of the species *S. mansoni* are immature and mature worms. They did not observe any alteration at the beginning of the infection when the parasite is in the evolutionary stages of cutaneous and pulmonary schistosomules. The decrease in the production of IgE showed in this study may have been associated with the inhibition of Antibody-dependent cells (ADCC) (Allam 2009) (Fig. 2), or due to the reduction of parasite burden promoted by the extract of *D. ambrosioides*.

Plant products can also modulate inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression (Miranda et al. 2013; Yones et al. 2016) and NO production (Yones et al. 2016; Almeer et al. 2018). The presence of granulomas and cell types related to the immune system is possibly the main reason for the increase in oxidative stress in the tissues of vertebrate hosts infected with *S. mansoni*, as the immune reaction of inflammatory cells is known to be related to the production of species reactive oxygen (ROS) and oxidative injury (Al-Olayan et al. 2016). NO (nitric oxide) acts as an effector molecule in schistosomiasis (Yones et al. 2016). Several studies have shown that inhibition of inducible nitric oxide synthase (iNOS) is harmful to infected animals, particularly when the liver is exposed to parasite eggs (Ali et al. 2013). The absence of NO can lead to severe liver damage and increased morbidity by intense fibrosis formation (Miranda et al. 2013; Almeer et al. 2018). Therefore, an important function of NO in liver

fibrosis is to trigger the effective production of Th1 cytokines, which prevents fibrotic formation in the liver (Hesse et al. 2001). Based on this, plant products can protect hepatocytes from damage, death, and dysfunction caused by oxidative stress at the sites of inflammation, promoting a decrease in the weight of the liver and spleen of infected mice (Fig. 2) (Allam 2009; Almeer et al. 2018). This relieving effect on schistosoma-induced hepatosplenomegaly can be attributed to the reduction in portal inflammation, granuloma volume, and cellular hyperplasia accompanied by fibrosis, which are common in treatments with these compounds (Al-Olayan et al. 2016; Almeer et al. 2018). This improvement in schistosomiasis pathology is reflected in the body weight of infected and treated mice, which does not differ from that of normal mice (Al-Olayan et al. 2016). Mice treated with plant products, *Ziziphus spina-christi* (L.) Willd., Rhamnaceae, and *S. lycocarpum*, showed an increase in NO production, which occurred concomitantly with a significant decrease in egg load and granuloma formation in the liver (Miranda et al. 2013; Almeer et al. 2018).

Treatment with plant products can activate lymphocytes (Allam et al. 2009; Rodrigues et al. 2020), macrophages (Allam 2009; Miranda et al. 2013), neutrophils (Almeer et al. 2018; Rodrigues et al. 2020), eosinophils (Allam 2009; Rodrigues et al. 2020), and monocytes (Rodrigues et al. 2020). In *Schistosoma* infections, a significant increase in the number of eosinophils and neutrophils has been reported and a decrease in the percentage of lymphocytes in the tissues of mice (Lins et al. 2008). However, treatment with plant products has been shown to restore the normal levels of eosinophils and neutrophils, probably by inhibiting the recruitment of these cells in the liver tissue of infected mice (Allam 2009; Jatsa et al. 2016, 2019b). This can be attributed to the inhibitory effect of these products on IL-5 and the production of granulocyte and macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) (Kobayashi et al. 1997), which are markers of eosinophilopenia activity (Sher et al. 1990). Rodrigues et al. (2020) reported that treatment with *D. ambrosioides* extract increased the number of lymphocytes and reduced the number of eosinophils and monocytes in infected animals (Rodrigues et al. 2020).

Activated macrophages (M1 and M2) are essential for host survival during *S. mansoni* infection. In their absence, the inflammatory response induced by eggs is lethal. It is well established that these cells participate as the first line of defense against pathogens (Herbert et al. 2004). Macrophages and Th1-type cytokines participate in the control of fibrosis during *S. mansoni* infection; however, the mechanism by which macrophages kill schistosomes remains unclear (Hesse et al. 2001). Many studies have evaluated the ability of plant products to induce macrophage proliferation during the treatment of *S. mansoni* infection, revealing that this

therapy promotes the differentiation and activation of these cells in addition to increasing their phagocytic activity (Allam 2009; Miranda et al. 2013; Kamel and El-Shinnawy et al. 2015). In a study by Miranda et al. (2013), who used the alkaloid extract of *Solanum lycocarpum* fruits, the induction of macrophage proliferation was observed, indicating a significantly higher number of these cells in mice treated with the plant product, causing a reduction in damage to the liver tissue of infected hosts with *S. mansoni*. *Allium sativum* extract has also been shown to stimulate macrophage and nitric oxide production directly or indirectly in an additive manner (Kamel and El-Shinnawy et al. 2015). It is also possible that the use of plant products in *S. mansoni* infection is capable of modulating liver enzymes and MMP-9 (matrix metalloproteinases – 9) (Fig 2).

Schistosoma mansoni infection leads to an increase in the activity of enzymes characteristic of liver tissue, indicating damage, such as alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), gamma glutamyltransferase (g-GT), and lactate dehydrogenase (LDH) (Allam 2009; Al-Olayan et al. 2016; Jatsa et al. 2019a). However, in mice infected and treated with plant products, restoration of ALT, AST, g-GT, and LDH activity was observed. This improvement in liver enzyme activity appears to be attributed to reduced hepatic granuloma size and fibrosis, as well as the absence of necrotic liver tissue in infected and treated mice (Allam 2009). In contrast, the activity of antioxidant enzymes in the living tissue of infected mice increases with treatment based on the plant species (Allam 2009; Al-Olayan et al. 2016; Almeer et al. 2018; Jatsa et al. 2019a). Treatment with curcumin extract induces and activates several hepatic antioxidant enzymes, including catalase, superoxide dismutase (SOD), and glutathione peroxidase (GSH-Px) (Allam 2009). Catalase detoxifies the hydrogen peroxide produced by inflammatory cells (Joe et al. 2004).

Several studies showed that plant products can modulate the expression of MMP-9 (matrix metalloproteinases – 9), an enzyme responsible for collagen degradation and vital for the recruitment of T cells and neutrophils (Almeer et al. 2018). MMP-9 is associated with the initial phase of neutrophil recruitment, during which inhibition of MMP-9 causes a decrease in neutrophil migration (Khandoga et al. 2006). By inhibiting MMP-9 expression during treatment, there is a reduction in leukocyte traffic and disrupted migration of neutrophils via fibronectin (Hamada et al. 2008). It has also been shown that MMP-9 has a role in macrophage migration, and dysregulation of MMP-9 activity often results in tissue compromise and functional changes (Fig. 2) (Duarte et al. 2015).

Perspectives and Future Directions

These findings present an interesting perspective on the parasitological and immunological mechanisms of natural compounds for the treatment of schistosomiasis. As there is only one commercially available drug for parasitosis treatment, understanding how plant-derived natural compounds act on *S. mansoni* infection can bring valuable therapeutic contributions to diversify and improve schistosomiasis therapy. Overall, the findings highlighted in this review demonstrate the effects and mechanisms of action of plant-derived alternative therapies in the immunopathogenesis of schistosomiasis, which can act directly on the parasite and/or modulate the host's immune response. Additionally, the anti-parasitic effects of the products highlighted in this review could be attributed to their immunomodulatory fractions that affect the course of infection and change the pattern of cytokines of the immune response mediated by helper T lymphocytes, responsible for granuloma formation by immune resistance. Therefore, the immunomodulatory effect of natural compounds promotes better efficacy on antiparasitic activity, leading to better treatment of schistosomiasis.

However, studies involving the evaluation of the immunomodulatory effect of plant species, in relation to the treatment of schistosomiasis, need further study, especially the evaluation of isolated active compounds. These active molecules, derived from plant products, may have significant advantages over synthetic molecules, which could help in the development of new therapeutic alternatives to control *S. mansoni* infection, which may even replace the praziquantel drug and reverse sequelae and symptoms of illness. It is worth mentioning that the chemical characterization of the natural compounds used and tested in the treatment of schistosomiasis may also help in the detection of fundamental and specific structural features of each pharmacophore and reveal important and necessary properties for therapeutic applications.

Conclusions

The findings highlighted in this review demonstrate the effects and mechanisms of action of plant-derived alternative therapies, which can act directly on the parasite and/or modulate the host immune response, on the immunopathogenesis of schistosomiasis. Furthermore, the anti-parasitic effects of the products highlighted in this review can be attributed to their immunomodulatory and antioxidant properties. The active fractions, alone or used in conjunction with antischistosomal drugs, affect the course of the infection and change the pattern of cytokines in the immune responses mediated by helper T lymphocytes. Thus, these

natural products may act directly on the *S. mansoni* parasite, or modulate the granulomatous inflammation in tissues, which may minimize the pathology of schistosomiasis.

Author contributions

MGSL, RAN, ICLL, GCCGF, VAFS, ACCM, JGMR, GSM, LAS, RNMG, RCC and FRFN contributed substantially to analysis and interpretation of data, critically reviewed important intellectual content, and approved the final submitted version.

Acknowledgment

The authors would like to thank the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) for financial support (Finance code 001) and PhD fellowship to RAN, ICLL, GCCGF, and VAFS; Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) for PhD fellowship to JGMR, and research fellowship to RNMG, and FRFN; and the Fundação de Amparo à Pesquisa e ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Maranhão for financial support (FAPEMA - 01001/19), and BIC fellowship to ACCM.

References

- Acheampong DO, Owusu-Adzorah N, Armah FA, Aninagyei E, Asiamah EA, Thomford AK, Anyan WK (2020) Ethnopharmacological evaluation of schistosomicidal and cercaricidal activities of some selected medicinal plants from Ghana. *Trop Med Health* 48:19. <https://doi.org/10.1186/s41182-020-00205-y>
- Ali EM, Hamdy SM, Mohamed TM (2013) Nitric oxide synthase and oxidative stress: regulation of nitric oxide synthase. *Pharmacol Ther* 140:239-57. <http://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2013.07.004>
- Allam G (2009) Immunomodulatory effects of curcumin treatment on murine schistosomiasis mansoni. *Immunobiology* 214:712-27. <http://doi.org/10.1016/j.imbio.2008.11.017>
- Almeer RS, El-Khadragy MF, Abdelhabib S, Moneim AEA (2018) *Ziziphus spina-christi* leaf extract ameliorates schistosomiasis liver granuloma, fibrosis, and oxidative stress through downregulation of fibrinogenic signaling in mice. *PLoS One* 13:e0204923. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0204923>
- Al-Olayan EM, El-Khadragy MF, Alajmi RA, Othman MS, Bauomy AA, Ibrahim SR, Moneim AEA (2016) *Ceratonia siliqua* pod extract ameliorates *Schistosoma mansoni*-induced liver fibrosis and oxidative stress. *BMC Complement Altern Med* 16:434. <http://doi.org/10.1186/s12906-016-1389-1>
- Aly I, Taher EE, EL-Sayed H, Mohammed FA, ELnain G, Hamad RS, Bayoumy EM (2017) Efficacy of soluble glycoprotein fraction from *Allium sativum* purified by size

- exclusion chromatography on murine *schistosomiasis mansonii*. *Microbial Pathogenesis* 17:30128-6. <http://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.03.039>
- Appiah AD, DeVlas SJ (2000) Interpreting low praziquantel cure rates of *Schistosoma mansonii* infections in Senegal. *Trends Parasitol* 18:125–129. [http://doi.org/10.1016/s1471-4922\(01\)02209-7](http://doi.org/10.1016/s1471-4922(01)02209-7)
- Bais S, Greenberg RM (2018) TRP channels as potential targets for antischistosomes. *Int J Parasitol-Drug* 8:511-517. <http://doi.org/10.1016/j.ijpddr.2018.08.003>
- Barron L, Wynn TA (2011) Fibrosis is regulated by Th2 and Th17 responses and by dynamic interactions between fibroblasts and macrophages. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 300:723-728. <http://doi.org/10.1152 / ajpgi.00414.2010>
- Bergquist NR (2002) Schistosomiasis: from risk assessment to control. *Trends Parasitol* 18:309-314. [http://doi.org/10.1016/s1471-4922\(02\)02301-2](http://doi.org/10.1016/s1471-4922(02)02301-2)
- Beshay EVN, Rady AA, Afifi AF, Mohamed AH (2019) Schistosomicidal, antifibrotic and antioxidant effects of *Cucurbita pepo* L. seed oil and praziquantel combined treatment for *Schistosoma mansonii* infection in a mouse model. *J Helminthol* 93:286–294. <http://doi.org/10.1017/S0022149X18000317>
- Braguine CG, Bertanha CS, Gonçalves UO, Magalhães LG, Rodrigues V, Melleiro-Gimenez VM, Groppo M, Silva MLA, Cunha WR, Januário AH, Pauletti PM (2012) Schistosomicidal evaluation of flavonoids from two species of *Styrax* against *Schistosoma mansonii* adult worms. *Pharm Biol* 50:925–929. <https://doi.org/10.3109/13880209.2011.649857>
- Bruck R, Ashkenazi M, Weiss S, Goldiner I, Shapiro H, Aeed H, Genina O, Helpert Z, Pines M (2007) Prevention of liver cirrhosis in rats by curcumin. *Liver Int* 27:373–383. <http://doi.org/10.1111/j.1478-3231.2007.01453.x>
- Brunet LR, Finkelman FD, Cheever AW, Kopf MA, Pearce EJ (1997) IL-4 protects against TNF- α -mediated cachexia and death during acute schistosomiasis. *J Immunol* 159:777–785.
- Bruun B, Aagaard-Hansen J (2008) The social context of schistosomiasis and its control: an introduction and annotated bibliography. World Health Organization, Geneva.
- Bustinduy AL, King CH (2014) Schistosomiasis. In: Manson's Tropical Infectious Diseases. 23rd ed. Elsevier, p 698–725.e6. <http://doi.org/10.1016/B978-0-7020-5101-2.00053-4>.
- Cordell GA (2014) Phytochemistry and traditional medicine – the revolution continues. *Phytochem Lett* 10:xxviii–xl. <http://doi.org/10.1016/j.phytol.2014.06.002>
- Couto FF, Coelho PM, Araújo N, Kusel JR, Katz N, Jannotti-Passos LK, Mattos AC (2011) *Schistosoma mansonii*: a method for inducing resistance to praziquantel using infected *Biomphalaria glabrata* snails. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 106:153-157. <http://doi.org/10.1590/S0074-02762011000200006>
- Davies SJ, Lim KC, Blank RB, Kim JH, Lucas KD, Hernandez DC, Sedgwick JD, McKerrow JH (2004) Involvement of TNF in limiting liver pathology and promoting parasite

- survival during schistosome infection. *Int J Parasitol* 34:27-36. <http://doi.org/10.1016/j.ijpara.2003.10.010>
- Da Paixão Siqueira L, Fontesa DAF, Aguilera CSB, Timoteo TRR, Angelos MA, Silva LCPBB, de Melo CG, Rolim LA, da Silva RMF, Rolim Neto PJ (2017) Schistosomiasis: drugs used and treatment strategies. *Acta Trop* 17:30681-30682. <http://doi.org/doi:10.1016/j.actatropica.2017.08.002>
- De Castro CC, Dias MM, Pessoa de Rezende T, Magalhães LG, Da Silva Filho AA (2013) Natural Products with Activity Against *Schistosoma Species*. Chapter 8. In: Rai MHK, Kon KV (eds) Fighting multidrug resistance with herbal extracts, essential oils and their components, Elsevier, Londres, pp 109-134.
- De Oliveira RN, Rehder VL, Oliveira AS, Jeraldo VL, Linhares AX, Allegretti SM (2014) Anthelmintic activity *in vitro* and *in vivo* of *Baccharis trimera* (Less) DC against immature and adult worms of *Schistosoma mansoni*. *Exp Parasitol* 139:63-72. <http://doi.org/10.1016/j.exppara.2014.02.010>
- De Paula Aguiar D, Brunetto MMM, Rezende ME, Graciano de Paula R, Ferreira PM, Afonso A, Belo S, Tomie Ouchida A, Curti C, Cunha WR, Rodrigues V, Magalhães LG (2016) Curcumin generates oxidative stress and induces apoptosis in adult *Schistosoma mansoni* worms. *PLoS One* 11:e0167135. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2008.11.017>
- Dejani NN, Souza LZ, Oliveira SRP, Nerisa DM, Rodolphoa JMA, Correia RO, Rodrigues V, Sacramentod LVS, Faccioli LH, Afonso A, Anibala FF (2014) Immunological and parasitological parameters in *Schistosoma mansoni*-infected mice treated with crude extract from the leaves of *Mentha x piperita* L. *Immunobiology* 219:627–632. <http://doi.org/10.1016/j.imbio.2014.03.015>
- Dkhil MA (2014) Role of berberine in ameliorating *Schistosoma mansoni*-induced hepatic injury in mice. *Biol Res* 47:8. <http://doi.org/10.1186/0717-6287-47-8>
- Doenhoff MJ, Hagan P, Cioli D, Southgate V, Pica-Mattoccia L, Botros S, Coles G, Tchuem Tchuente LA, Mbaye A, Engels D (2009) Praziquantel: its use in control of schistosomiasis in sub-Saharan Africa and current research needs. *Parasitol* 136:1825-1835. <http://doi.org/10.1017/S0031182009000493>
- Duarte S, Baber J, Fujii T, Coito AJ (2015) Matrix metalloproteinases in liver injury, repair and fibrosis. *Matrix Biol* 44-46:147-156. [http://doi.org/S0945-053X\(15\)00005-0](http://doi.org/S0945-053X(15)00005-0)
- Duvoix A, Blasius R, Delhalle S, Schneckeburger M, Morceau F, Henry E, Dicato M, Diederich M (2005) Chemopreventive and therapeutic effects of curcumin. *Cancer Lett*. 223:181–190. <http://dx.doi.org/10.1016/J.CANLET.2004.09.041>
- El Ridi R (2002) Toward a complete immunity-inducing vaccine for schistosomiasis. *J Parasitol* 88:1049–1050. [http://doi.org/10.1645/0022-3395\(2002\)088\[1049:TACIIV\]2.0.CO;2](http://doi.org/10.1645/0022-3395(2002)088[1049:TACIIV]2.0.CO;2)
- El Ridi R, Tallima H, Salah M, Aboueldahab M, Fahmy OM, Al-Halbosi MF, Mahmoud SS (2012) Efficacy and mechanism of action of arachidonic acid in the treatment of hamsters infected with *Schistosoma mansoni* or *Schistosoma haematobium*. *Int J Antimicrob Agents* 39:232-239. <http://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2011.08.019>

- Fenwick A, Webster JP (2006) Schistosomiasis: challenges for control, treatment and drug resistance. *Curr Opin Infect Dis* 19:577-582. <http://doi.org/10.1097/01.qco.0000247591.13671.6a>
- Finkelman FD, Holme J, Katona IM, Urban JE, Beckman MP, Park LS, Schooley KA, Coffman RL, Mosmann TR, Paul WE (1990) Lymphokine control of *in vivo* immunoglobulin isotype selection. *Ann Rev Immunol* 8:303-334. <http://doi.org/10.1146/annurev.iy.08.040190.001511>
- Frezza TF, Fernandes de Oliveira CN, Banin TM, Garcia Rehder VL, Boaventura S Jr, Allegretti SM (2013) Tegumentary changes in two different strains of *Schistosoma mansoni* treated with artemisinin and artesunic acid. *Rev Patol Trop* 42:309-321 <http://doi.org/10.5216/rpt.v42i3.26930>
- Gouveia MJ, Brindley PJ, Gärtner F, Costa JM, Vale N (2018) Drug repurposing for schistosomiasis: combinations of drugs or biomolecules. *Pharmaceuticals* 11:15. <https://doi.org/10.3390/ph11010015>
- Hamada T, Fondevila C, Busuttil RW, Coito AJ (2008) Metalloproteinase-9 deficiency protects against hepatic ischemia/reperfusion injury. *Hepatology* 47:186-198. <http://doi.org/10.1002/hep.21922>
- Hams E, Aviello G, Fallon PG (2013) The *Schistosoma* granuloma: friend or foe? *Front Immunol* 4:89. <http://doi.org/10.3389/fimmu.2013.00089>
- Herbert DR, Hölscher C, Mohrs M, Arendse B, Schwegmann A, Radwanska M, Leeto M, Kirsch R, Hall P, Mossmann H, Claussen B, Förster I, Brombacher F (2004) Alternative macrophage activation is essential for survival during schistosomiasis and downmodulates T helper 1 responses and immunopathology. *Immunity* 20:623-635. [http://doi.org/10.1016/s1074-7613\(04\)00107-4](http://doi.org/10.1016/s1074-7613(04)00107-4)
- Hesse M, Modolell M, LaFlamme AC, Schito M, Fuentes JM, Cheever AW, Pearce EJ, Wynn TA (2001) Differential regulation of nitric oxide synthase-2 and arginase-1 by Type1/type2 cytokines *in vivo*: granulomatous pathology is shaped by the pattern of L-arginine metabolism. *J Immunol* 167:6533-6544. <http://doi.org/10.4049/jimmunol.167.11.6533>
- Ho SL, Chan HM, Wong RN, Li HW (2014) Self-assembling protein platform for direct quantification of circulating microRNAs in serum with total internal reflection fluorescence microscopy. *Anal Chim Acta* 823:61-68. <http://doi.org/10.1016/j.aca.2014.03.020>
- Hoffmann KF, Cheever AW, Wynn TA (2000). 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* 164:6406-6416. <http://doi.org/10.4049/jimmunol.164.12.6406>
- Huang YH, Shi MN, Zheng WD, Zhang LJ, Chen ZX, Wang XZ (2006) Therapeutic effect of interleukin-10 on CCl4-induced hepatic fibrosis in rats. *World J Gastroenterol* 12:1386-1391. <http://doi.org/10.3748/wjg.v12.i9.1386>

- Ibrahim MA, Mohammed A, Isah MB, Aliyu AB (2014) Anti-trypanosomal activity of African medicinal plants: a review update. *J Ethnopharmacol* 154:26-54. <http://doi.org/10.1016/j.jep.2014.04.012>
- Licá ICL, Frazão GCCG, Nogueira RA, Lira MGS, Dos Santos VA, Rodrigues JGM, Miranda GS, Carvalho RC, Silva LA, Guerra RNM, Nascimento F (2023) Immunological mechanisms involved in macrophage activation and polarization in schistosomiasis. *Parasitol* 150:401-415. <http://doi.org/10.1017/S0031182023000021>
- Jatsa HB, Endougou AME, Kemeta DRA, Kenfack CM, Tchuem Tchuente LA, Kamtchouing P (2009) *In vivo* antischistosomal and toxicological evaluation of *Sida pilosa* Retz on mice BALB/c. *Pharmacologyonline* 3:531–238.
- Jatsa HB, Feussom NG, Femoe UM, Kenfack MC, Nkondo ET, Kadji Fassi JB, Simo ND, Moaboulou C, Dongmo CN, Tsague CD, Dongo E, Kamtchouing P, Tchuem Tchuente LA (2019a) Evaluation of the schistosomicidal, antioxidant and anti-inflammatory activities of the ethyl acetate fraction from *Ozoroa pulcherrima* Schweinf. Roots on *Schistosoma mansoni*-induced liver pathology in mice and its phytochemical characterization. *J Ethnopharmacol* 238:111883. <http://doi.org/10.1016/j.jep.2019.111883>
- Jatsa HB, Feussom NG, Nkondo ET, Kenfack CM, Simo DN, Fassi JBK, Femoe UM, Moaboulou C, Tsague CD, Dongo E, Kamtchouing P, Tchuem Tchuente LA (2019b) Efficacy of *Ozoroa pulcherrima* Schweinf methanolic extract against *Schistosoma mansoni*-induced liver injury in mice. *J Trad Complement Med* 9:304-311. <http://doi.org/10.1016/j.jtcme.2017.08.009>
- Jatsa HB, Russo RC, Pereira CA, Aguilar EC, Garcia CC, Araújo ES, Oliveira JL, Rodrigues VF, de Oliveira VG, Alvarez-Leite JI, Braga FC, Tchuem Tchuente LA, Kamtchouing P, Negrão-Corrêa DA, Teixeira MM (2016) Improvement of the liver pathology by the aqueous extract and the *n*-butanol fraction of *Sida pilosa* Retz in *Schistosoma mansoni*-infected mice. *J Ethnopharmacol* 180:114-123. <http://doi.org/10.1016/j.jep.2016.01.017>
- Jatsa HB, Pereira CAJ, Pereira ABD, Negrão-Corrêa DA, Braga FC, Maciel GM, Castilho RO, Kamtchouing P, Teixeira MM (2015) *In vitro* evaluation of *Sida pilosa* Retz (Malvaceae) aqueous extract and derived fractions on *Schistosoma mansoni*. *Pharm Pharmacol* 6:380-390. <https://doi.org/10.4236/pp.2015.68039>
- Joe B, Vijaykumar M, Lokesh BR (2004) Biological properties of curcumin-cellular and molecular mechanisms of action. *Crit Rev Food Sci Nutr* 44:97–111. <http://doi.org/10.1080/10408690490424702>
- Kamel ROA, El-Shinnawy NA (2015) Immunomodulatory effect of garlic oil extract on *Schistosoma mansoni* infected mice. *Asian Pac J Trop Med* 8:999–1005. <http://doi.org/10.1016/j.apjtm.2015.11.016>
- Khandoga A, Kessler JS, Hanschen M, Khandoga AG, Burggraf D, Reichel C, Hamann GF, Enders G, Krombach F (2006) Matrix metalloproteinase-9 promotes neutrophil and T cell recruitment and migration in the postischemic liver. *J Leukoc Biol* 79:1295-1305. <http://doi.org/10.1189/jlb.0805468>

- Kobayashi T, Hashimoto S, Horie T (1997) Curcumin inhibition of *Dermatophagoides farinea*-induced interleukin-5 (IL-5) and granulocyte macrophage-colony stimulating factor (GM-CSF) production by lymphocytes from bronchial asthmatics. *Biochem Pharmacol* 54:819–824. [http://doi.org/10.1016/s0006-2952\(97\)00220-7](http://doi.org/10.1016/s0006-2952(97)00220-7)
- Kuhn I, Kellenberger E, Said-Hassane F, Villa P, Rognan D, Lobstein A, Haiech J, Hibert M, Schuber F, Muller-Steffner H (2010) Identification by high-throughput screening of inhibitors of *Schistosoma mansoni* NAD(+) catabolizing enzyme. *Bioorg Med Chem* 18:7900–7910. <http://doi.org/10.1016/j.bmc.2010.09.041>
- La Flamme AC, Patton EA, Bauman B, Pearce EJ (2001) IL-4 plays a crucial role in regulating oxidative damage in liver during Schistosomiasis. *J Immunol* 166:1903–1911. <http://doi.org/10.4049/jimmunol.166.3.1903>
- Lee EF, Young ND, Lim NTY, Gasser RB, Fairlie WD (2014) Apoptosis in schistosomes: toward novel targets for the treatment of schistosomiasis. *Trends Parasitol* 30:75–84. <http://doi.org/10.1016/j.pt.2013.12.005>
- Lescano SZ, Chieffi PP, Canhassi RR, Boulos M, Neto VA (2004) Antischistosomal activity of artemether in experimental Schistosomiasis mansoni. *Rev Saude Publica* 38. <http://doi.org/10.1590/S0034-89102004000100010>
- Lifongo LL, Simoben CV, Ntie-Kang F, Babiaka SB, Judson PN (2014) A bioactivity versus ethnobotanical survey of medicinal plants from Nigeria, West Africa. *Nat Prod Bioprospect* 4:1–19. <http://doi.org/10.1007/s13659-014-0005-7>
- Lima CMBL, Freitas FIS, Morais LCSL, Cavalcanti MGS, Silva LF, Padilha RJR, Barbosa CGS, Santos FAB, Alves LC, Diniz MFFM (2011) Ultrastructural study on the morphological changes to male worms of *Schistosoma mansoni* after *in vitro* exposure to allicin. *Rev Soc Bras Med Trop* 44: 327–330. <https://doi.org/10.1590/S0037-86822011005000023>
- Lins RAB, Cavalcanti CBL, Araújo-Filho JLS, de Melo-Júnior MR, Chaves MEC (2008) Distribution of eosinophils at different stages of hepatic granuloma evolution in mice infected with *Schistosoma mansoni*. *Rev Soc Bras Med Trop* 41:173–178. <http://doi.org/10.1590/S0037-86822008000200008>
- Maciel MAM, Pinto AC, Arruda AC, Pamplona SGSR, Vanderlinde FA, Lapa AJ, Cólus IMS, Echevarria A, Grynberg NF, Farias RAF, Luna Costa AM, Rao, VSN (2000) Ethnopharmacology, phytochemistry and pharmacology: a successful combination in the study of *Croton cajucara*. *J Ethnopharmacol* 70:41–55. [https://doi.org/10.1016/s0378-8741\(99\)00159-2](https://doi.org/10.1016/s0378-8741(99)00159-2)
- Maciel MAM, Pinto AC, Veiga Jr VF, Grynberg NF, Echevarria A (2002) Medicinal plants: the need for multidisciplinary scientific studies. *Quim Nova* 25:429–438. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422002000300016>
- Mahmoud MR, El Abhar HS, Saleh S (2002) The effect of *Nigella sativa* oil against the liver damage induced by *S. mansoni* infection in mice. *J Ethnopharmacol* 79:1–11. [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(01\)00310-5](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(01)00310-5)

- Mangold BL, Dean DA (1986) Passive transfer with serum and IgG antibodies with irradiated cercariae-induced resistance against *Schistosoma mansoni* in mice. *J Immunol.* 136:2644–2647.
- Mantawy MM, Ali HF, Rizk MZ (2011) Therapeutic effects of *Allium sativum* and *Allium cepa* in *Schistosoma mansoni* experimental infection. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 53:155-163. <http://doi.org/10.1590/S0036-46652011000300007>
- Mcmanus DP, Dunne DW, Sacko M, Utzinger J, Vennervald BJ, Zhou XN (2018) Schistosomiasis. *Nat Rev Dis Primers* 4: 13. <http://doi.org/10.1038/s41572-018-0013-8>
- Miranda MA, Kuehn CC, Cardoso JF, Oliveira LG, Magalhães LG, Tiossi RF, Rodrigues V, Zucolloto S, Prado JC Jr, McChesney JD, Bastos JK (2013) Immunomodulatory effect of the alkaloidic extract of *Solanum lycocarpum* fruits in mice infected with *Schistosoma mansoni*. *Exp Parasitol* 133:396-402. <http://doi.org/10.1016/j.exppara.2012.12.012>
- Miranda MA, Magalhães LG, Tiossi RF, Kuehn CC, Oliveira LG, Rodrigues V, McChesney JD, Bastos JK (2012) Evaluation of the schistosomicidal activity of the steroidal alkaloids from *Solanum lycocarpum* fruits. *Parasitol Res* 111:257-262. <https://doi.org/10.1007/s00436-012-2827-8>
- Moraes JD, Nascimento C, Yamaguchi LF, Kato MF, Nakano E (2012) *Schistosoma mansoni*: *in vitro* schistosomicidal activity and tegumental alterations induced by pipilartine on schistosomula. *Exp Parasitol* 132:222–227. <http://doi.org/10.1016/j.exppara.2012.07.004>
- Mutapi F, Maizels R, Fenwick A, Woolhouse M (2017) Human schistosomiasis in the post mass drug administration era. *Lancet Infect Dis* 17:e42-e47. [http://doi.org/10.1016/S1473-3099\(16\)30475-3](http://doi.org/10.1016/S1473-3099(16)30475-3)
- Nelwan ML (2019) Schistosomiasis: life cycle, diagnosis, and control. *Curr Ther Res* 91:5–9. <http://doi.org/10.1016/j.curtheres.2019.06.001>
- Nodari RO, Guerra MP (2001) Assessment environmental risks genetically of modified plants. *Cad Ciên Tec* 18:81-116. <http://doi.org/10.35977/0104-1096.cct2001.v18.8833>
- Noel F (2008) Sistema neuromuscular e controle da motilidade do verme adulto, in: *Schistosoma mansoni* & Esquistossomose: Uma Visão Multidisciplinar, Carvalho OS, Coelho PMZ, Lenzi HL (eds.), Fiocruz, Rio de Janeiro, Brazil, pp 207–244.
- Nogueira RA, Lira MGS, Licá ICL, Frazão GCCG, Dos Santos VAF, Filho ACCM, Rodrigues JGMR, Miranda GS, Carvalho RC, Nascimento FRF (2022) Praziquantel: an update on the mechanism of its action against schistosomiasis and new therapeutic perspectives. *Mol Biochem Parasitol* 252:111531. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2022.111531>
- Oliveira CNF, Frezza TF, Garcia VL, Figueira GM, Mendes TMF, Allegretti SM (2017) *Schistosoma mansoni*: *in vivo* evaluation of *Phyllanthus amarus* hexanic and ethanolic extracts. *Exp Parasitol* 183:56-63. <http://doi.org/10.1016/j.exppara.2017.10.008>

- Pearce EJ, Kane CM, Sun J, Taylor JJ, McKee AS, Cervi L (2004) Th2 response polarization during infection with the helminth parasite *Schistosoma mansoni*. *Immunol Rev* 201:117-126. <http://doi.org/10.1111/j.0105-2896.2004.00187.x>
- Pereira AS, Padilha RJ, Lima-Filho JL, Chaves ME (2011) Scanning electron microscopy of the human low-density lipoprotein interaction with the tegument of *Schistosoma mansoni*. *Parasitol Res* 109:1395–1402. <http://doi.org/10.1007/s00436-011-2386-4>
- Powell JM, Sonnenfeld G (2006) The effects of dehydroepiandrosterone (DHEA) on *in vitro* spleen cell proliferation and cytokine production. *J Interferon Cytokine Res* 26:34–39. <http://doi.org/10.1089/jir.2006.26.34>
- Rodrigues JGM, Albuquerque PSV, Nascimento JR, Campos JAV, Godinho ASS, Araújo SJ, Brito JM, Jesus CM, Miranda GS, Rezende MC, Negrão-Corrêa DA, Rocha CQ, Silva LA, Guerra RNM, Nascimento FRF (2020) The immunomodulatory activity of *Chenopodium ambrosioides* reduces the parasite burden and hepatic granulomatous inflammation in *Schistosoma mansoni*-infection. *J Ethnopharmacol* 264:113287. <http://doi.org/10.1016/j.jep.2020.113287>
- Rollemborg CYY, Santos CMB, Silva MMBL, Souza AMB, Silva AM, Almeida JAP, Almeida RP, Ribeiro-Jesus A (2011) Aspectos epidemiológicos e distribuição geográfica da esquistossomose e geo-helminthos, no Estado de Sergipe, de acordo com os dados do Programa de Controle da Esquistossomose. *Ver Soc Bras Med Trop* 44:91-96. <https://doi.org/10.1590/S0037-86822011000100020>
- Satoskar AR, Simon GL, Hotez PJ, Tsuji M (2009) *Medical parasitology*. Landes Bioscience, Austin, Texas, EUA.
- Schwartz C, Fallon PG (2018) *Schistosoma* "Eggs-Itting" the host: granuloma formation and egg excretion. *Front Immunol* 29:2492. <http://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02492>
- Seto EYW, Wong BK, LU D, Zhong B (2011) Human schistosomiasis resistance to praziquantel in China: should we be worried? *Am J Trop Med Hyg* 85:74-82. <http://doi.org/10.4269/ajtmh.2011.10-0542>
- Sharma S, Chopra K, Kulkarni SK, Agrewala JN (2007) Resveratrol and curcumin suppress immune response through CD28/CTLA-4 and CD80 co-stimulatory pathway. *Clin Exp Immunol* 147:155–163. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2006.03257.x>
- Shaw MK, Erasmus DA (1987) *Schistosoma mansoni*: structural damage and tegumental repair after *in vivo* treatment with praziquantel. *Parasitol* 94:243-254. <http://doi.org/10.1017/s0031182000053920>
- Sher A, Coffman RL, Hieny S, Scott P, Cheever AW (1990) Interleukin 5 is required for the blood and tissue eosinophilia but not granuloma formation induced by infection with *Schistosoma mansoni*. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:61–65. <http://doi.org/10.1073/pnas.87.1.61>
- Simoben CV, Ntie-Kang F, Akone SH, Sippl W (2018) Compounds from African Medicinal Plants with activities against protozoal diseases: schistosomiasis, trypanosomiasis and leishmaniasis. *Nat Prod Bioprospect* 8:151–169. <http://doi.org/10.1007/s13659-018-0165-y>

- Simões LF, Kawano T, Allegretti SM, Linhares AX, Magalhães LA, Zanotti-Magalhães LM (2015) Effect of *Piper tuberculatum* extract on adult *Schistosoma mansoni*: *in vitro* and *in vivo* tests. *Rev Patol Trop* 44:56-66. <http://doi.org/10.5216/rpt.v44i1.34803>
- Souza FPC, Vitorino RR, Costa AP, Júnior FCF, Santana LA, Gomes AP (2011) Esquistossomose mansônica: aspectos gerais, imunologia, patogênese e história natural. *Rev Soc Bras Clín Med* 9:300-7.
- Turner JD, Jenkins GR, Hogg KG, Aynsley SA, Paveley RA, Cook PC, Roles MC, Mountford AP (2008) CD4+CD25+ regulatory cells contribute to the regulation of colonic Th2 granulomatous pathology caused by schistosome infection. *PLoS Negl. Trop Dis* 5:e1269. <http://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001269>
- Vaillant B, Chiaramonte MG, Cheever AW, Soloway PD, Wynn TA (2001) Regulation of hepatic fibrosis and extracellular matrix genes by the response, new insight into the role of tissue inhibitors of matrix metalloproteinases. *J Immunol* 167:7017–7026. <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.167.12.7017>
- Vale N, Gouveia MJ, Rinaldi G, Brindley PJ, Gärtner F, da Costa JMC (2017) Praziquantel for schistosomiasis: single-drug metabolism revisited, mode of action, and resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 61:e02582-16. <http://doi.org/10.1128/AAC.02582-16>
- WHO (2018) Schistosomiasis Fact Sheet. World Health Organization. <http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/schistosomiasis>. Accessed 2 May 2018.
- Xião S, Shen B, Utzinger J, Chollet J, Tanner M (2002) Ultrastructural alterations in adult *Schistosoma mansoni* caused by artemether. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 97:717-724. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762002000500023>
- Xião SH, Xue J, Mei JY, Jiao PY (2012) Effectiveness of synthetic trioxolane OZ78 against *Schistosoma japonicum* in mice and rabbits. *Parasitol Res* 110:2307–2314. <http://doi.org/10.1007/s00436-011-2765-x>
- Yones DA, Badary DM, Sayed HMB, Bayoumi SAH, Khalifa AA, El-Moghazy AM (2016) Comparative evaluation of anthelmintic activity of edible and ornamental pomegranate ethanolic extracts against *Schistosoma mansoni*. *Biomed Res Int* 2016:2872708. <http://doi.org/10.1155/2016/2872708>
- Zaia MG, Cagnazzo T, Feitosa KA., Soares EG, Faccioli LH, Allegretti SM, Afonso A, Anibal FF (2016) Anti-inflammation properties of menthol and menthone in *Schistosoma mansoni* infection. *Front Pharmacol* 7:170. <http://dx.doi.org/10.3389/fphar.2016.00170>

4.2 CAPÍTULO 2 – Efeito de *Dysphania ambrosioides* (L.) Mosyakin & Clemants na oviposição e no desenvolvimento de granulomas de *Schistosoma mansoni*

RESUMO

A esquistossomose é uma doença parasitária de grande relevância mundial devido a gravidade da infecção. A severidade da esquistossomose está associada à formação dos granulomas em torno dos ovos do parasito que ficam retidos nos tecidos. Apesar do tratamento com praziquantel possuir a capacidade de combater as formas adultas do parasito, ele não possui eficácia em reduzir as lesões teciduais induzidas pelo granuloma. Nesse contexto, os produtos naturais, em especial os de origem vegetal, são potenciais candidatos para o tratamento da esquistossomose, pois podem ser capazes de minimizar o quadro clínico da doença. Desta forma, a presente pesquisa buscou investigar o efeito do extrato hidroalcólico de *Dysphania ambrosioides* (EHDA) na oviposição de *S. mansoni* e avaliar o tratamento com o extrato sobre o desenvolvimento de granulomas nos tecidos hepáticos, intestinais e pulmonares de camundongos infectados e tratados em diferentes fases da infecção experimental. Para isso, foi realizada avaliação *in vitro* do extrato de *D. ambrosioides* sobre os vermes adultos de *S. mansoni* para avaliar a mortalidade e ação contra oviposição dos vermes fêmeas. Foi realizada avaliação *in sílico* a partir do constituinte majoritário do extrato, o kaempferol, sendo previstas suas atividades biológicas e seu potencial alvo molecular no parasito *S. mansoni*. Para o tratamento *in vivo*, camundongos foram experimentalmente infectados com 50 cercárias, e eutanasiados com 60 dias de infecção. Os grupos de camundongos foram separados da seguinte forma: a) animais infectados e tratados com praziquantel (controle positivo); b) animais infectados, sem tratamento (controle negativo); c) animais não infectados e nem tratados (controle limpo); d) camundongos infectados e tratados com EHDA durante as diferentes fases evolutivas do parasito: fase cutânea (EHDA1), fase pulmonar (EHDA2), vermes imaturos (EHDA3) e vermes maduros (EHDA4). Nas avaliações *in vitro*, o EHDA apresentou atividade esquistossomicida e inibiu a oviposição dos vermes fêmeas com o uso da concentração de 8.3 µg/mL (48h) de EHDA, capaz de inibir 50% da viabilidade dos vermes. Na análise *in sílico* foi constatado que o kaempferol apresenta atividades biológicas como antioxidante, anti-inflamatório e hepatoprotetor. Foi identificada a proteína *venus kinase receptor 2* como alvo molecular, a qual pode inibir a oviposição de *S. mansoni*. Nos ensaios *in vivo*, o tratamento com EHDA reduziu lesões e granulomas nos tecidos hepático, intestinal e pulmonar, demonstrando uma melhor organização da resposta granulomatosa. Houve predominância de fibras colágenas do tipo I nos tecidos dos animais tratados. Os resultados encontrados são um passo inicial para propor avanços na terapia da esquistossomose com o tratamento com extrato hidroalcólico *D. ambrosioides* sobre a formação dos granulomas, que constituem a principal patologia da parasitose.

Palavras-chave: Esquistossomose; Extratos vegetais; Mastruz; Quimioterapia; Resposta Granulomatosa.

ABSTRACT

The trematode *Schistosoma mansoni* is the parasitic species responsible for the clinical manifestations of schistosomiasis in Brazil. The primary pathology of schistosomiasis is the formation of granulomas, which occurs through complex mechanisms of the immune response triggered during *S. mansoni* infection. The granulomatous reaction is an inflammatory process

that leads to the destruction of an extensive area in the affected organ. Therefore, the search for alternatives capable of reducing the egg burden in tissues and promoting the improvement of sequelae of parasitosis can minimize the clinical presentation of the disease. In this context, natural products, especially those of plant origin, are potential candidates for schistosomiasis treatment. Thus, the present research aimed to investigate the effect of *Dysphania ambrosioides* hydroalcoholic extract (EHDA) on *S. mansoni* oviposition and evaluate the treatment with the extract on the development of granulomas in hepatic, intestinal, and pulmonary tissues of infected mice treated at different stages of experimental infection. For this, an *in vitro* evaluation of the *D. ambrosioides* extract was carried out on adult *S. mansoni* worms, as well as an analysis of the extract on oviposition. An *in silico* evaluation was carried out using the majority constituent of the extract, kaempferol, and its biological activities and potential molecular target in the *S. mansoni* parasite were predicted. The treatment with the extract was evaluated *in vivo*, in each of the stages of *S. mansoni* development, using mice infected with 50 cercariae and euthanized 60 days post-infection. For this assay, the mice were separated into the following groups: a) animals infected and treated with Praziquantel (positive control); b) infected animals, without treatment (negative control); c) uninfected and untreated animals (clean control); d) mice infected and treated with EHDA during the different evolutionary phases of the parasite: cutaneous phase (EHDA1), lung phase (EHDA2), immature worms (EHDA3) and mature worms (EHDA4). *In vitro* evaluations, EHDA showed schistosomicidal activity and inhibited the oviposition of female worms. *In silico* analysis, it was found that kaempferol has biological activities such as antioxidant, anti-inflammatory and hepatoprotective and the *venus kinase receptor 2* protein was identified as a molecular target, which can inhibit *S. mansoni* oviposition. In *in vivo* trials, treatment with EHDA reduced lesions and granulomas in liver, intestinal and lung tissues, demonstrating a better organization of the granulomatous response. There was a predominance of type I collagen fibers in the treated tissues. The results found are an initial step towards advances in schistosomiasis therapy, especially those associated with the main pathology of schistosomiasis, during treatment with hydroalcoholic extract *D. ambrosioides* in mice infected by *S. mansoni*.

Keywords: Schistosomiasis; Plant extracts; Mastruz; Chemotherapy; Granulomatous Response.

1 INTRODUÇÃO

Parasitos do gênero *Schistosoma* são trematódeos responsáveis por ocasionar a esquistossomose, uma enfermidade negligenciada com ocorrência, principalmente, em regiões da África, Ásia, Oriente Médio e sul da América (COLLEY et al., 2014). A parasitose afeta cerca de 240 milhões de pessoas nos trópicos e subtrópicos e 700 milhões vivem em áreas com risco de infecção (MCMANUS et al., 2018; WHO, 2022). No Brasil, a esquistossomose é causada pela espécie *Schistosoma mansoni*, com estimativas de que 25 milhões de pessoas vivam em áreas endêmicas (NASCIMENTO; OLIVEIRA, 2014).

O ciclo de vida de *S. mansoni* ativa complexas respostas imunológicas no hospedeiro vertebrado (SOUZA et al., 2011). As infecções pelas cercárias desencadeiam uma reação imune

caracterizada por uma resposta T *helper*-1 (Th1), onde observa-se a produção de citocinas pró-inflamatórias (IL-1, IL-2, IL-6, IL-12, TNF- α e IFN- γ), que ativam células imunes inatas, como os macrófagos (TURNER et al., 2011). No entanto, após a produção de ovos, são secretados antígenos solúveis que polarizam uma forte resposta Th2, com a participação de citocinas como IL-4, IL-5 e IL-13, havendo o desenvolvimento de lesões granulomatosas ao redor dos ovos retidos nos tecidos do hospedeiro (BARRON; WIN, 2011). Granulomas são caracterizados por um crescimento central de células mononucleares, com uma borda circundante contendo fibroblastos e linfócitos (ALMEER et al., 2018). A formação granulomatosa é principalmente orquestrada por células T CD4, no entanto, células T CD8, células B, eosinófilos, granulócitos, células dendríticas e, especialmente macrófagos alternativamente ativados (M2) também tem papel em sua formação (HAMS et al., 2013; ZHU et al., 2015; PAGÁN; RAMAKRISHNAN, 2018). Os granulomas têm função protetora vital nos tecidos hospedeiros para sequestrar antígenos liberados pelos ovos e evitar sua ação citotóxica (HAMS et al., 2013). Com o avanço da infecção, na fase crônica, os granulomas são modulados imunologicamente por mediação da citocina IL-10, que regula as respostas Th1 e Th2, o que gera alterações em tamanho, aparência e constituição celular dos granulomas (CHUAH et al., 2014; PAGÁN; RAMAKRISHNAN, 2018). No entanto, se a resposta inflamatória não for bem regulada formará depósitos de fibrose em resposta a ação de citocinas do tipo Th2, conduzindo ao aumento da fibrose e mortalidade durante as fases crônicas da doença, fator que é responsável pela gravidade da esquistossomose (HESSE et al., 2001).

Como a reação granulomatosa é um processo inflamatório que leva a destruição de uma extensa área no órgão onde ocorre (BERGQUIST, 2002), a busca por alternativas capazes de reduzir a carga de ovos nos tecidos e promover a melhora de sequelas podem minimizar o quadro clínico da doença (HUANG et al., 2006). No entanto, o fármaco praziquantel (PZQ), utilizado para o tratamento da esquistossomose, não apresenta efeitos contra as formas jovens do parasito e nem reverte inflamação e fibrose induzidas pela infecção (WANG et al., 2012; MUTAPI et al., 2017; VALE et al., 2017).

Diante do exposto, torna-se crucial a busca de novos fármacos que tenham efeito mais amplo e que possam atuar também como imunomoduladores evitando as sequelas causadas pelas reações inflamatórias induzidas pelos granulomas nos tecidos. Neste contexto, os produtos naturais, em especial os de origem vegetal, são potenciais candidatos para o tratamento da esquistossomose e vem sendo amplamente avaliados (JATSA et al., 2018; LIRA et al., 2023). Uma espécie vegetal que vem sendo largamente utilizada pela população para diversos fins é *Dysphania ambrosioides* (NASCIMENTO, 2014), sendo demonstradas suas seguintes

atividades biológicas: efeito analgésico (SOUSA et al., 2012), anti-inflamatório (PEREIRA, 2009), antisséptico (RIOS et al., 2017) e cicatrizante (NASCIMENTO, 2014). O efeito antiparasitário do extrato hidroalcoólico de *D. ambrosioides* (EHDA) já foi evidenciado no tratamento de leishmaniose (PATRÍCIO et al., 2008), malária (CYSNE et al., 2016), além de ação imunoestimuladora e imunomoduladora (CRUZ et al., 2007; PEREIRA et al., 2010; RODRIGUES et al., 2020). *D. ambrosioides* foi, ainda, incluída na Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS – RENISUS, que lista 71 espécies vegetais usadas na medicina popular brasileira, sendo essencialmente empregada na forma de emplastos ou infusão das folhas.

O nosso grupo de pesquisa do Laboratório de Imunofisiologia – UFMA, mostrou que o extrato hidroalcoólico das folhas de *D. ambrosioides* apresenta ação anti-esquistossomótica e é capaz de modular a resposta imune a favor do hospedeiro vertebrado, regulando o processo inflamatório granulomatoso ocasionado pela infecção por *S. mansoni* (RODRIGUES et al., 2020). Entretanto, não foi investigado a capacidade do extrato de inibir oviposição em fêmeas de *S. mansoni*, nem realizado o estudo da proteína alvo *venus kinase receptor 2*, que pode estar associada a essa ação. Além disso, o contexto granulomatoso pode ser mais bem avaliado em relação a sua composição e organização, incluindo avaliações em outros órgãos (intestino e pulmão). Por esta razão, o objetivo desta pesquisa foi avaliar como o tratamento com o mesmo extrato promove alterações histopatológicas no fígado, intestino e pulmão de camundongos infectados e tratados, bem como a capacidade inibitória de *D. ambrosioides* sobre *S. mansoni* e sua oviposição.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Extrato hidroalcoólico de *D. ambrosioides* (EHDA)

2.1.1 Coleta da planta

As folhas de *D. ambrosioides* foram coletadas no Município da Raposa, Bairro Alto do Farol (S 2°27'34,6" W 44°08'47,5"), São Luís – MA, no turno matutino, na estação seca. Uma amostra do vegetal foi utilizada para a confecção da exsicata e identificação no Herbário do Maranhão (MAR) da Universidade Federal do Maranhão, Campus Bacanga.

2.1.2 Preparação e obtenção do extrato hidroalcoólico de *D. ambrosioides* (EHDA)

As folhas de *D. ambrosioides* foram secas em estufa a 37°C e trituradas em moinho de facas, obtendo-se 250 gramas de pó, que foi entumecido em 1000mL de Etanol a 70% por um período de duas horas. O material foi então submetido ao processo de percolação exaustiva. O extrato percolado foi rotaevaporado, para remoção do solvente, e liofilizado (LIOTOP, L101) para remoção de água, e obtenção do extrato seco. Todos os procedimentos citados foram executados segundo Neiva et al. (2011).

2.2 Parasitos e infecção experimental para avaliação *in vitro*

2.2.1 Obtenção e manutenção de caramujos *Biomphalaria glabrata*

Os caramujos *B. glabrata* foram gentilmente cedidos pelo moluscário do laboratório de Esquistossomose e Imunohelmintologia (LBEIH), localizado no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Os caramujos foram infectados com a miracídeos da cepa LE de *S. mansoni* (Belo Horizonte -MG), que vem sendo mantida por sucessivas infecções em hamsters (*Mesocricetus auratus*) e caramujos *B. glabrata*, de acordo com a técnica descrita por Pellegrino e Katz (1968).

Os caramujos foram adequadamente transportados, seguindo as normas de transporte de material biológico, e foram mantidos no Laboratório de Imunofisiologia da UFMA, em aquários de 20L, com água desclorada, de acordo com Gerken (1977). A limpeza dos aquários foi realizada uma vez por semana, com adição de substrato de farinha de ostra e argila desidratada para nutrição e fortalecimento da concha. Além do mais, os espécimes foram alimentados com folhas de alface (MALEK, 1985).

2.2.2 Obtenção de cercárias e infecção de camundongos

Para a pesquisa de cercárias, os caramujos foram isolados em recipientes de vidro transparente, contendo 4mL de água desclorada e filtrada, e expostos à luz de lâmpadas incandescentes de 60W, durante 4 horas, a fim de estimular a emissão cercariana. As larvas obtidas foram analisadas quanto a sua viabilidade, posteriormente concentradas e contadas, com o auxílio de microscópio estereoscópico (SMITHERS; TERRY, 1965).

As cercárias foram utilizadas para a infecção de camundongos Swiss machos, entre 3 e 4 meses de idade, fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal de Maranhão (UFMA) e mantidos no Biotério Setorial da Pós-Graduação do CCBS, em ambiente controlado, com água e ração *ad libitum*. Os animais foram infectados por via percutânea com 50 cercárias viáveis de *S. mansoni*, obtidas de exemplares de *B. glabrata* provenientes da cepa LE de Belo Horizonte – MG. Os camundongos infectados foram utilizados tanto para avaliações *in vitro* quanto *in vivo*.

2.3 Avaliação da atividade esquistossomicida *in vitro*

Os vermes foram obtidos por perfusão do sistema portal e veias mesentéricas com solução salina estéril (NaCl a 0,9% w/v) (SMITHERS; TERRY, 1965) de camundongos com sessenta dias de infecção. Vermes machos foram imediatamente transferidos para meio RPMI 1640 (*ThermoFisher Scientific*) contendo 100µg/mL de penicilina, 100µg/mL de estreptomicina e suplementado 10% de soro bovino fetal e lavados duas vezes com este meio. Os vermes foram distribuídos (dois vermes por poço) em placas de cultura com 24 poços com 2mL (por poço) do meio suplementado e as culturas incubadas a 37°C, em estufa de CO₂. Duas horas após incubação, para permitir a adaptação dos vermes ao meio de cultura, o EHDA foi adicionado nas concentrações de 250µg/mL, 150µg/mL, 50µg/mL, 25µg/mL e 10µg/mL. Vermes incubados em meio RPMI suplementado serviram como grupo controle negativo. Vermes incubados em 10µg/mL de PZQ serviram como controle positivo. Esse ensaio foi realizado três vezes, em quadruplicata, para cada grupo. Um microscópio invertido foi utilizado para avaliar as condições gerais dos vermes, incluindo a motilidade, alterações no tegumento e sobrevivência, monitorizada nos tempos de 6, 12, 18, 24, 36, 48, 64 e 72 horas de cultura. Os procedimentos citados foram feitos com base no protocolo de Rodrigues et al. (2020).

Como critérios de avaliação esquistossomicida, o tratamento foi considerado letal quando os vermes não exibiram nenhum tipo de movimento após 2 minutos de observação. A motilidade dos vermes foi pontuada após o tratamento com EHDA e PZQ de acordo com os critérios de viabilidade marcados numa escala de 0-3 proposto por Horiuchi et al. (2005). Resumidamente o sistema de pontuação foi seguinte: 3 = movimento corporal completo; 2 a 1.5 = mobilidade lenta e parcial; 1 = atividade mínima, mas o verme ainda vivo; 0 = verme morto. Além disso, foi calculada a concentração letal capaz de matar 50% dos vermes (LC₅₀) com limite de confiança de 95%.

2.4 Avaliação da oviposição *in vitro* de *S. mansoni*

Para este ensaio, um casal foi utilizado por poço e o tempo de análise foi de 48 horas, utilizando a dose encontrada com base na concentração letal capaz de matar 50% dos vermes (IC_{50}) nesse tempo. No grupo controle positivo foi utilizada uma dose sub letal de PZQ (0,5 μ g/mL), de acordo com Mendonça et al. (2016). No grupo controle negativo foi utilizado meio RPMI suplementado. Um microscópio invertido foi utilizado para contabilizar os ovos em cada poço contendo o casal ainda viável. Os casais de vermes que eventualmente estavam mortos após as 48 horas, não foram considerados para essa análise. Os testes foram feitos em quadruplicata com duas repetições, seguindo o protocolo descrito por Alves et al. (2020).

2.5 Análise *in silico*

2.5.1 Previsão das atividades biológicas de kaempferol

Para o início da análise, foram levados em consideração, os derivados de quecertina e o kaempferol, que segundo Rodrigues et al. (2020) foram os componentes químicos encontrados em maior quantidade no EHDA. No entanto, ao avaliar as propriedades dos constituintes, foi selecionado apenas o kaempferol para as análises *in silico*, por ser um potencial alvo para um medicamento e por não possuir violação de lipski (LIPINSKI et al. 2001), que consiste em um conjunto de cinco regras para avaliar se um composto químico com atividade farmacológica pode ter viabilidade para ser administrado via oral. Para a previsão das atividades biológicas de kaempferol foi utilizada a plataforma PASS Online (versão 2.0, Way2Drug.com©2011–2022, Moscou, Rússia) (www.way2drug.com/passonline/, acessado em 11 de setembro de 2023). O programa PASS descreve a atividade biológica como “ativa” (Pa) ou “inativa” (Pi), onde a probabilidade estimada varia de 0 a 1. As chances de encontrar uma determinada atividade aumentam quando os valores de Pa são mais altos e os valores de Pi são mais baixos. Os resultados da predição PASS foram interpretados obedecendo aos seguintes critérios: (a) apenas atividades biológicas com $Pa > Pi$ foram consideradas prováveis para o kaempferol; (ii) se $Pa > 0,7$, é provável que a substância exiba a referida atividade biológica e a probabilidade do composto ser um análogo de um medicamento farmacêutico conhecido também é elevada; (iii) se $0,5 < Pa < 0,7$, é provável que o composto exiba a referida atividade biológica, mas o composto não é semelhante a medicamentos conhecidos; (iv) se $Pa < 0,5$, o composto

provavelmente não exibe a referida atividade biológica e talvez seja um composto estruturalmente novo (MENDONÇA et al., 2022).

2.5.2 Previsão de características farmacocinéticas e efeitos tóxicos do kaempferol

Os valores preditivos das propriedades farmacocinéticas e de toxicidade foram calculados pelo software Discovery Studio Client v16 1.0.15350 (RAMOS et al. 2022), seguindo a proposta metodológica descrita por Shukla et al. (2014) e Ramos et al. (2022). As propriedades farmacocinéticas/toxicológicas analisadas foram: ligação às proteínas plasmáticas (PBB), hepatotoxicidade, penetração da barreira hematoencefálica (BBBP) e solubilidade. Outro passo importante para a análise ADME-Tox é avaliar possíveis violações da Regra dos Cinco de Lipinski (LIPINSKI et al. 2001). Para realizar esta etapa metodológica foi utilizado o módulo “calcular propriedades moleculares” presente no software Discovery Studio Client v16 1.0.15350.

2.5.3 Previsão alvos e de sítio ativo

Para a escolha da proteína alvo de kaempferol foram utilizados os softwares de espectro para substâncias (PASS) e o swiss target prediction, que indicou a *proteína venus kinase receptor 2* presente em *S. mansoni*. A previsão do sítio ativo foi realizada pelo marcador Dogsite, que é uma ferramenta automatizada, que permite analisar a drogabilidade do local específico, levando em consideração suas propriedades geométricas e físico-químicas (<http://dogsite.zbh.uni-hamburg.de>) (MALIK et al., 2020). O modelo de proteína foi submetido no software e os resultados foram gerados. Os resultados foram validados por meio do Castp (<http://sts-fw.bioengr.uic.edu/castp/calculation.php>). Finalmente, foi feita a modelação pelo software PyMOL, uma multiplataforma molecular de ferramenta gráfica que tem sido amplamente utilizada para visualização 3D de superfícies, proteínas, pequenas moléculas ou ácidos nucleicos (WASS et al., 2010; YUAN et al., 2017; WU et al., 2018).

2.5.4 Preparação de ligantes

A estrutura tridimensional (3D) do ligante nativo da *proteína venus kinase receptor 2* foi recuperado do banco de dados PubChem (<http://www.pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) em formato sdf. Esta estrutura baixada contém as informações sobre as propriedades químicas e atividades

biológicas de pequenas moléculas. Além disso, o arquivo sdf foi convertido para o formato pdb por Open Babel e energia minimizada pelo Campo de Força Universal (UFF) em PyRx 0,8 (O'BAYLE et al., 2011; DALLANKYAN & OLSON, 2015). O ATP foi considerado para a docagem contra proteína *venus kinase receptor 2*.

2.5.5 Docagem molecular

O protocolo de docagem molecular é uma simulação computacional amplamente utilizada para visualizar a conformação de um complexo receptor-ligante, onde o receptor é geralmente uma proteína ou uma molécula de ácido nucleico e o ligante é uma molécula pequena ou outra proteína. O encaixe do ligante específico ao sítio ativo da proteína foi feito por um servidor chamado SWISS-DOCK (<http://www.swissdock.ch>). É gerada automaticamente a estrutura da proteína alvo e a estrutura do ligante para a docagem. Além disso, o encaixe não requer entradas computacionais dos usuários, pois todos os cálculos são feitos pelo próprio servidor (GROSDIDIER et al., 2011). Para validar os resultados do SWISS-DOCK, o Autodock vina foi usado, que é um dos softwares de código aberto mais rápidos e amplamente empregado para docagem molecular (SINGH et al., 2018; DALAL et al., 2019; SAINI et al., 2019; KESARI et al., 2020). A caixa de grid foi gerada pelo uso da ferramenta Autodock e então o encaixe específico do sítio ativo foi feito na caixa de grid. Átomos de hidrogênio e cargas de Kollman (4,03) foram adicionados à proteína, enquanto os átomos de hidrogênio e Gasteiger foram adicionados no ligante e ambos os arquivos foram convertidos em pdbqt, formatados e salvos. Uma caixa de grid potencial foi gerada usando AutoGrid4 com espaçamento de 0,375 (KUMARI et al., 2021). As dimensões da caixa de grid foram $40 \text{ \AA} \times 40 \text{ \AA} \times 40 \text{ \AA}$ e centro das coordenadas dos pontos foram $X = -46,913148$, $Y = 50,855370$, $Z = 17,659148$. Em AutoDock Vina, um total de 10 posições foram geradas usando os arquivos receptor e ligante junto com arquivo de configuração para abranger propriedades da caixa de grid. Uma interação da posição de encaixe com resíduos de sítio ativo foi observada e a posição com maior afinidade de ligação ($-6,1 \text{ kcal/mol}$) foi selecionada (SAINI et al., 2019; KUMARI et al., 2021).

2.6 Experimentações *in vivo*

2.6.1 Obtenção e infecção dos camundongos

Conforme descrito anteriormente, foram utilizados camundongos Swiss machos, oriundos do Biotério Central da Universidade Federal de Maranhão (UFMA), que foram infectados por via percutânea com 50 cercárias viáveis de *S. mansoni*, contendo a cepa LE de Belo Horizonte – MG. As etapas que transcorrem desde a manutenção até a experimentação com os camundongos que foram utilizados nesta pesquisa, encontram-se devidamente protocoladas pela Comissão de Ética e Experimentação Animal (CEUA) da Universidade Federal do Maranhão, sob o número 23115.002254/2020-18 (ANEXO A).

2.6.2 Caracterização dos grupos experimentais

Os camundongos foram separados em sete grupos com seis animais cada, sendo seis grupos infectados e um não infectado, conforme detalhado no Quadro 1.

Quadro 1. Grupos experimentais por dia de eutanásia durante as fases do ciclo biológico de *Schistosoma mansoni*.
Fonte: Elaborado pela autora com base no protocolo de RODRIGUES et al. (2020).

Grupos	Caracterização
Controle Limpo (L)	Camundongos não infectados e não tratados que foram utilizados como parâmetro fisiológico.
Controle Negativo (C-)	Camundongos infectados sem tratamento.
Controle Positivo (C+)	Camundongos que foram tratados entre os dias 45 e 51 dias de infecção com Praziquantel durante sete dias seguidos.
Extrato hidroalcolico de <i>D. ambrosioides</i> (EHDA1) (Dia 1 ao 7)	Camundongos que foram tratados no 1º dia de infecção, na fase cutânea (esquistossômulo de pele), por sete dias consecutivos com EHDA.
Extrato hidroalcolico de <i>D. ambrosioides</i> (EHDA2) (Dia 14 ao 20)	Camundongos que foram tratados no 14º dia de infecção, na fase pulmonar (esquistossômulo pulmonar), por sete dias consecutivos com EHDA.
Extrato hidroalcolico de <i>D. ambrosioides</i> (EHDA3) (Dia 28 ao 34)	Camundongos que foram tratados no 28º dia de infecção, na fase de vermes imaturos (antes da ovipostura), por sete dias consecutivos com EHDA.
Extrato hidroalcolico de <i>D. ambrosioides</i> (EHDA4) (Dia 45 ao 51)	Camundongos que foram tratados 45º dia de infecção, na fase de vermes maduros (após início da oviposição), por sete dias consecutivos com EHDA.

Os camundongos dos grupos que foram tratados com EHDA receberam uma dose diária de 50mg/Kg por via oral, fazendo o uso da técnica de gavagem (RODRIGUES et al., 2020). Em relação ao grupo controle positivo, que recebeu tratamento com PZQ, foi utilizada a dose de 50mg/Kg por via oral (RODRIGUES et al., 2020). Os grupos controle limpo e negativo não receberam nenhum tipo de tratamento. O delineamento experimental encontra-se ilustrado na Figura 1.

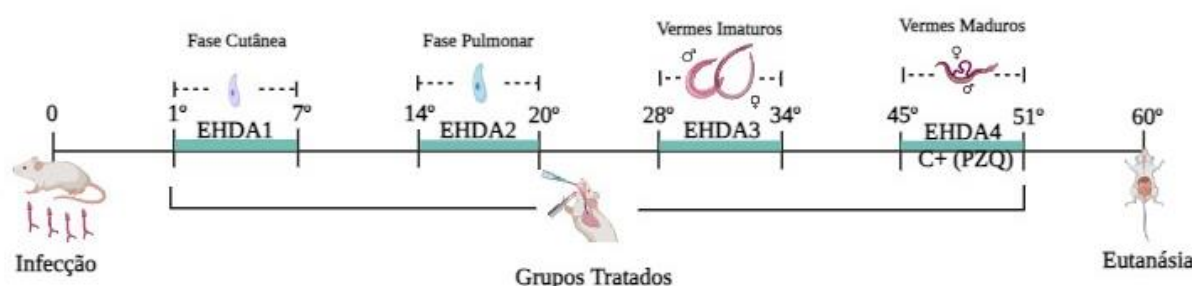


Figura 1. Delineamento experimental ao longo da etapa de infecção dos camundongos e das etapas de tratamento dos diferentes grupos. Fonte: Adaptado de AIRES et al. (2014) e RODRIGUES et al. (2020).

2.7 Eutanásia dos camundongos

Os animais foram pesados e eutanasiados com uma sobredose de anestésico (solução 2:1, Cloridrato de Xilasina 2% (10mg/Kg) e Cloridrato de Ketamina 10% (90mg/Kg), intraperitoneal), para realização dos ensaios propostos *in vivo*. Todas as etapas envolvidas nesta pesquisa, obedeceram aos princípios técnicos e éticos preconizados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

2.8 Avaliação histopatológica

Quanto à análise histológica, amostras de fígado (parte central do lobo lateral esquerdo), pulmão e intestino foram retirados dos camundongos, e fixadas em formol a 10% por 48 horas. As amostras passaram por uma sequência de imersão em álcool a 70%, 80%, 95% e absoluto 1 e 2. Posteriormente, foram imersas em xilol 1 e 2 para clarificação e finalmente, as amostras foram embebidas em parafina histológica para inclusão. Após a inclusão em parafina, os blocos foram seccionados em micrótomo na espessura de 5µm e os cortes foram desparafinados, hidratados e corados com hematoxilina-eosina (HE) ou com Tricrômico de Masson (LUNA, 1968).

As lâminas coradas com HE foram analisadas ao microscópio óptico para avaliação de parâmetros patológicos, como infiltrado inflamatório, lesão tecidual, necrose, quantidade de ovos, presença de granulomas e extensão de granulomas, por meio do sistema de escore que determina (0) ausente, (1) leve, (2) moderado e (3) intenso.

As lâminas coradas com Tricrômico de Masson oferecem uma representação visual da deposição de colágeno nos tecidos hepáticos, intestinais e pulmonares. Contudo, para uma avaliação mais detalhada da disposição e do tipo de colágeno nos granulomas, algumas seções hepáticas, intestinais e pulmonares foram submetidas à coloração por Picrosirius Red. Para esse procedimento, os tecidos dos camundongos dos grupos experimentais foram desparafinizados, hidratados e lavados em água. Em seguida, as amostras foram coradas em uma solução de Hematoxilina de Weirgert para marcar os núcleos por um minuto e, posteriormente, lavadas para remover o excesso de corante. Após essa etapa, as amostras foram imersas por uma hora em uma solução de 0,1% de Sirius Red, desidratadas em concentrações crescentes de álcool, diafanizadas em xilol e finalmente montadas.

A análise das lâminas foi realizada utilizando um microscópio óptico da marca Olympus, empregando tanto a fonte de luz comum quanto a luz polarizada (JUNQUEIRA et al., 1979). Foi feita uma avaliação qualitativa, sendo observada a presença de colágenos tipo I e III nos tecidos. As fibras do tipo I, consideradas maduras, foram identificadas por uma coloração mais intensa em vermelho vivo, enquanto as fibras do tipo III, classificadas como imaturas, apresentaram uma coloração em tons de verde a amarelado.

2.9 Análise histomorfométrica de tecidos

As secções hepáticas, intestinais e pulmonares coradas com hematoxilina-eosina (HE) foram utilizadas para as análises morfométricas dos granulomas. A histomorfometria foi realizada por software ImageJ, em imagens de 6 campos aleatórios por amostra histológica para a contagem do número e área dos granulomas. Para medir a área do granuloma foram considerados aqueles com a presença de ovo no centro, contendo miracídio, na fase exsudativa, e sem está coalescente com outros granulomas. As imagens foram feitas usando um microscópio óptico invertido (NIKON®, modelo eclipse Ti-U) acoplado a uma câmera digital e sistema de computador (NIS-*Elements advanced research*). Todas as avaliações foram realizadas por observadores “duplo-cegos”.

2.10 Análise estatística

Os dados foram analisados pelo Software GraphPad Prism versão 8 (Prism Software, Irvine, Califórnia, EUA). Eles foram inicialmente avaliados pelo teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov e os resultados foram apresentados como média $\pm$ desvio padrão. Para análise dos dados foi utilizado o teste t de Student ou análise de variância (ANOVA), com pós-teste de Bonferroni. Para análise da sobrevivência de *S. mansoni*, foram construídas as curvas de Kaplan-Meier, seguida do teste Log-Rank. Em todos os casos, o nível de significância estabelecido foi de 5% ($p < 0,05$).

A concentração letal capaz de matar 50% dos vermes (CL_{50}), foi expressa com limite de confiança de 95%, por meio do método de regressão linear, utilizando os dados do logaritmo da concentração das amostras versus o percentual de vermes mortos, para cada tempo de análise.

3 RESULTADOS

3.1 Avaliação da ação esquistossomídica e inibidora da oviposição do EHDA *in vitro*

3.1.1 EHDA tem atividade esquistossomicida *in vitro*

Ao avaliar a exposição de vermes adultos machos de *S. mansoni* a diferentes concentrações do extrato hidroalcoólico de *D. ambrosioides*, observou-se que todas as concentrações conduziram à morte dos vermes antes de 72 horas em comparação ao controle negativo (C^-). No entanto, a dose na concentração de 250 $\mu\text{g/mL}$ foi a mais efetiva, pois os vermes machos apresentaram 50% de viabilidade (com score: 2 a 1.5) após 6 horas, e morreram (score: 0) após 12 horas de cultura. As concentrações de 150 $\mu\text{g/mL}$ e 50 $\mu\text{g/mL}$ apresentaram 50% de viabilidade (com score: 2 a 1.5) após 9 horas, e morreram (score: 0) após 18 horas e 36 horas, respectivamente. As concentrações de 25 $\mu\text{g/mL}$ e 10 $\mu\text{g/mL}$ apresentaram 50% de viabilidade (com score: 2 a 1) após 36 horas, e morreram (score: 0) após 64 horas. No grupo controle positivo (C^+), tratado com praziquantel, os vermes apresentaram 50% de viabilidade (com score: 2 a 1.5) após 3 horas, e morreram após 6 horas de cultura. Os vermes do controle negativo, mantidos em meio RPMI, sem exposição às drogas permaneceram viáveis até o final do experimento, com sobrevivência superior a 72 horas de cultura (Figura 2).

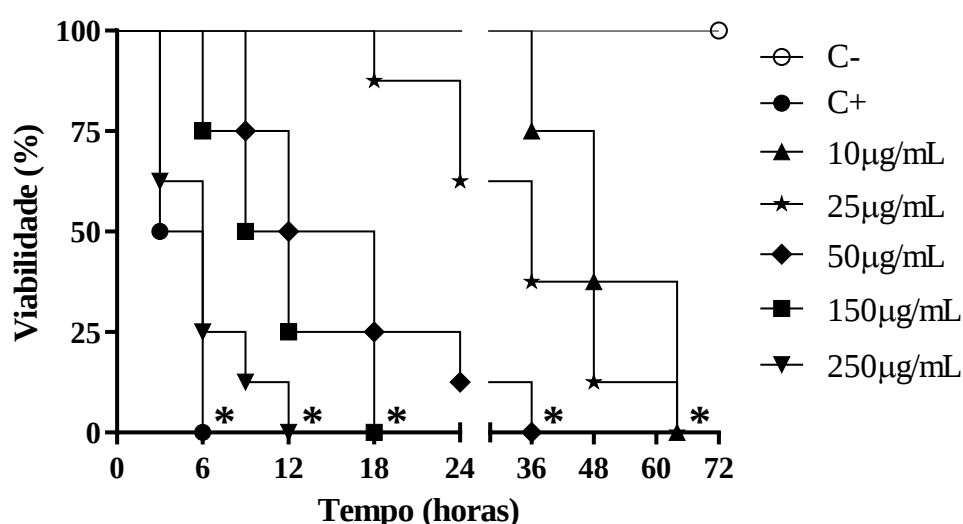


Figura 2. Viabilidade de vermes machos adultos de *Schistosoma mansoni* durante 72 horas de exposição ao extrato hidroalcoólico de *Dysphania ambrosioides*. Foram utilizados dois vermes machos por poço em quadruplicata em diferentes concentrações ($\mu\text{g/mL}$) do extrato. No grupo controle negativo utilizou-se apenas meio RPMI suplementado. No grupo controle positivo utilizou-se droga anti-*Schistosoma* (praziquantel). Para avaliação do percentual de sobrevivência foi utilizada a análise estatística foi realizada pelo teste de Log-Rank (B). * $p < 0.05$ em comparação ao controle negativo.

A partir do cálculo de LC50, foram estabelecidas as concentrações do extrato hidroalcoólico de *D. ambrosioides* capazes de inibir 50% de viabilidade dos vermes nas diferentes horas avaliadas. Essas concentrações variaram de 193,7 (6h) a 4,4 $\mu\text{g/mL}$ (64h) (Tabela 1), que foram os tempos necessários para o extrato causar a mortalidade dos vermes, conforme observado na figura 2.

Tabela 1. Valores das concentrações do extrato hidroalcoólico de *Dysphania ambrosioides* capazes de inibir 50% de viabilidade dos vermes machos de *Schistosoma mansoni* em diferentes horas.

	Tempo (horas)						
	6	12	18	24	36	48	64
LC50 – $\mu\text{g/mL}$	193,7	61,8	36,2	29,1	18,2	8,3	4,4

*Os valores de LC50 apresentados foram determinados a partir de curvas de regressão sigmoidal feitas no programa Graph Pad Prism 8.0.

3.1.2 EHDA inibe a oviposição de fêmeas de *S. mansoni* tratadas *in vitro*

A contagem de ovos eliminados pelas fêmeas expostas ao EHDA foi monitorada por 48 horas, e comparada com os grupos controle negativo e controle positivo (0,5 µg/mL de PZQ). Foi utilizada a dose de 8,3 µg/mL do EHDA, encontrada com base na concentração letal capaz de matar 50% dos vermes (IC50). Quando as fêmeas de *S. mansoni* foram expostas a 8,3 µg/mL de EHDA, foi verificado que o extrato inibiu a ovipostura assim como ocorreu no controle positivo (PZQ). Em contraste, os vermes do grupo controle negativo permaneceram acasalados favorecendo sua reprodução. Os ovos que foram eliminados pelas fêmeas do verme de *S. mansoni*, dos diferentes grupos, são mostradas abaixo (Figura 3).

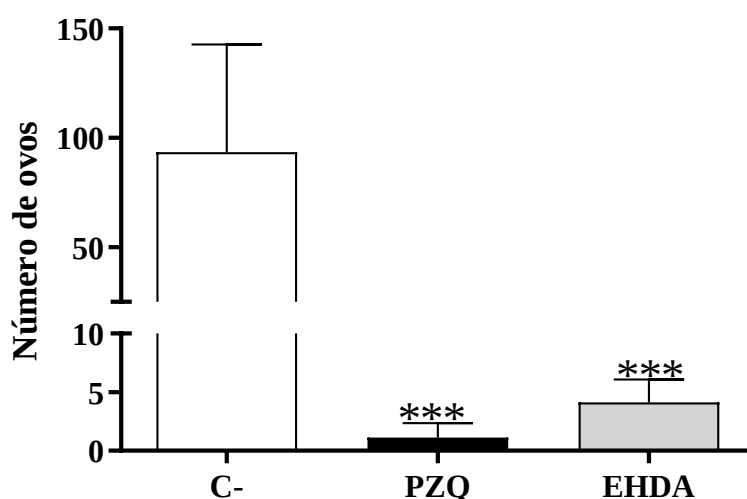


Figura 3. Número de ovos eliminados por vermes fêmeas de *Schistosoma mansoni* após exposição ao extrato hidroalcolólico de *Dysphania ambrosioides*. Um casal foi utilizado por poço e o tempo de análise foi de 48 horas, utilizando a concentração de 8,3 µg/mL para o EHDA (grupo teste), dose encontrada com base na concentração letal capaz de matar 50% dos vermes (IC50) nesse tempo. No grupo controle positivo foi utilizada uma dose sub letal de PZQ (0,5 µg/mL). No grupo controle negativo foi utilizado meio RPMI suplementado. * $p < 0.05$ em comparação ao controle negativo.

3.2 Análise *in Silico*

3.2.1 Atividades biológicas de kaempferol

Com o intuito de compreender os mecanismos de ação do EHDA em *S. mansoni* e as possíveis causas de inibição da oviposição do parasito, foram previstas atividades biológicas e potencial alvo molecular de kaempferol, um composto majoritário presente no extrato de mastruz. As atividades foram previstas pelo software de espectro para substâncias (PASS), e incluem características antioxidante, antiinflamatórias e hepatoprotetoras, acompanhadas de

seus respectivos valores de atividade provável (Pa) e inatividade provável (Pi) (Tabela 2). O maior valor de Pa foi obtido para atividade antioxidante e de inibidor da expressão de iNOS₂ (Pa > 0,7) e a maioria das atividades apresentaram valores de Pa entre 0,5 e 0,7, indicando que o kaempferol provavelmente exibe essas atividades biológicas, mas não é semelhante às encontradas em medicamentos conhecidos (Tabela 2).

Tabela 2. Atividades biológicas de kaempferol previstas pelo software de espectro para substâncias.

ATIVIDADES	PREVISÕES PASS DE KAEMPFEROL	
	Pa*	Pi*
Antioxidante	0,856	0,003
Inibidor da expressão de iNOS ₂	0,797	0,002
Antineoplástico	0,791	0,013
Inibidor da expressão de MMP9	0,738	0,005
Hepatoprotetor	0,670	0,008
Quimiopreventivo	0,669	0,008
Antiinflamatório	0,676	0,019
Quimioprotetor	0,638	0,004
Antagonista de oxido nítrico	0,590	0,004
Tratamento de desordens hepáticas	0,505	0,011
Inibidor da expressão de TNF	0,476	0,035
Antiparasitário	0,423	0,026
Anti-helmíntico	0,333	0,028
Imunossupressor	0,351	0,084
Anti-inflamatório, intestinal	0,312	0,062
Antitóxico	0,272	0,072

* Pa: atividade provável. Pi: inatividade provável.

3.2.2 Atividades farmacocinéticas de kaempferol

As análises das características farmacocinéticas de kaempferol demonstraram que o composto é solúvel, não hepatotóxico, não penetra a barreira hematoencefálica (BBBP) e não apresenta violações de acordo com as regras de Lipinski (Tabela 3), o que significa que é um forte candidato a formulação de um possível medicamento.

Tabela 3. Predição ADME de Kaempferol.

Composto	Solubilidade	PPB	Hepatotóxico	BBBP	Lipinski Violações (máx 4)
Kaempferol	Solúvel (3)	Não	Não	Não (4)	0

Abreviaturas: PPB = ligação às proteínas plasmáticas (Não: não se liga às proteínas plasmáticas, Sim: liga-se às proteínas plasmáticas); Hepatotóxico (Sim: efeito hepatotóxico, Não: sem efeito hepatotóxico); Solubilidade aquosa: (faixa aceitável: O intervalo é 0–3, onde 3 é uma boa solubilidade). (Zhao et al., 2021; Ramos et al., 2022); BBBP = 0 (penetrabilidade muito alta), 1 (alto), 2 (médio), 3 (baixo) 4 (indefinido/muito baixo).

3.2.3 Docagem molecular

Para estudos de docking, na tentativa de identificar potenciais alvos que possam explicar os mecanismos de ação de EHDA contra *S. mansoni*, foi selecionada a proteína *venus kinase receptor 2* do Protein Data Bank. Essa proteína de *S. mansoni* é importante para promover o crescimento do esquistossomo e a produção de ovos. A Tabela 4 lista os dados da proteína alvo, incluindo seu ligante nativo e as coordenadas do centro do *Grid*.

Tabela 4. Descrição da proteína alvo e receptor relacionados aos mecanismos de ação de kaempferol no estudo de docking molecular.

Enzima	Ligante	Coordenadas do <i>Grid</i>
<i>Venus kinase receptor 2 (Schistosoma mansoni)</i> PDB ID: 7ZVS Resolution: 3.07Å Referência: Mathavan et al., 2022	Adenosine-5'-diphosphate	X = -46.91 Y = 50.85 Z = 17.65

A comparação do ligante com a proteína alvo e a melhor conformação prevista por docking molecular via DockThor, pode ser vista na Figura 4. A sobreposição com o ligante original deu um valor de RMSD (desvio médio quadrático) de 0.969 Å.

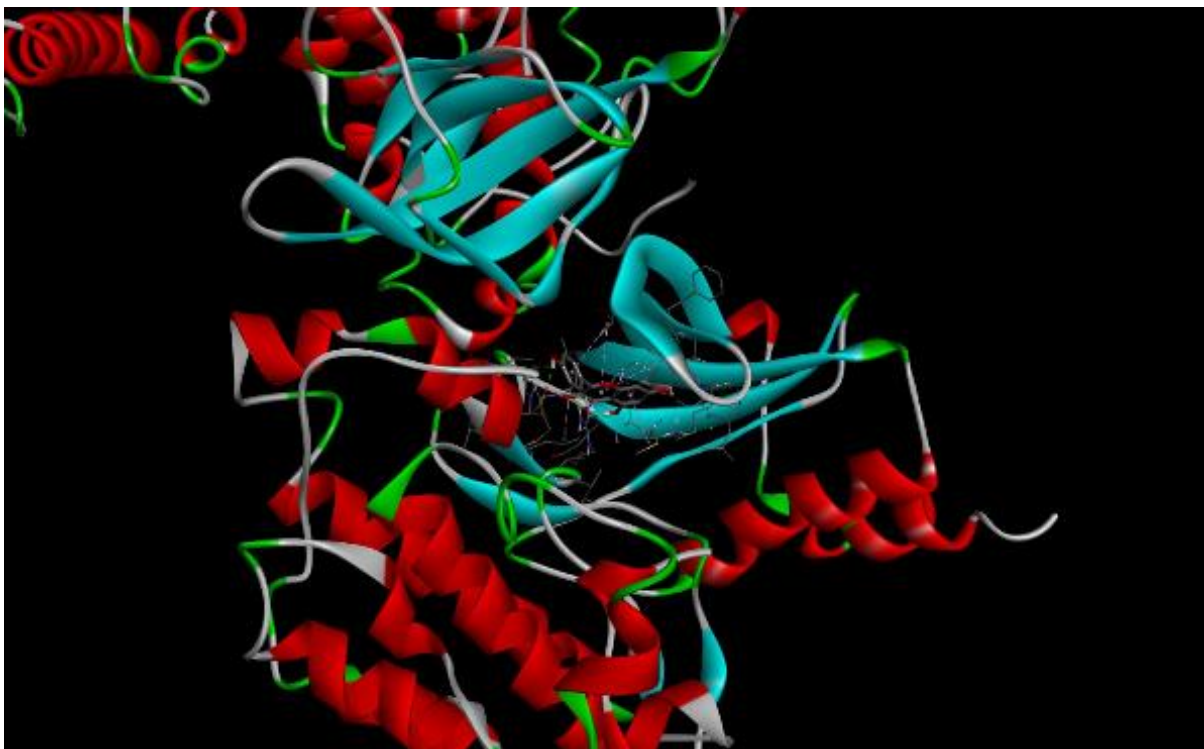


Figura 4. Estrutura 3D do ligante cristalográfico e enzima na melhor conformação prevista por docking molecular.

A Tabela 5 destaca as dez posições de energia de ligação mais favoráveis entre a enzima *venus kinase receptor 2* e seu ligante nativo adenosina-5'-difosfato. A escolha do modo de encaixe reflete uma interação aprimorada, evidenciada pelos baixos valores energéticos. Em todas as posições avaliadas, o complexo proteína-ligante revelou resultados positivos, indicando interações atrativas entre os dois componentes. Os valores de energia, expressos em Kcal/mol, demonstraram consistência, mantendo-se em -6,1 Kcal/mol para todos os complexos de ligação analisados.

Tabela 5. Energia de ligação e RMSD entre os complexos de ligação alvo-ligante.

Tabela 3: Energia de ligação e RMSD entre os complexos de ligação livre ligante.		
Complexos	Energia Livre de Ligação (Kcal/mol)	RMSD*
1	-6.13	65.41
2	-6.13	65.41
3	-6.13	65.41
4	-6.13	65.40
5	-6.13	65.40
6	-6.13	65.41

7	-6.13	65.41
8	-6.13	65.40
9	-6.13	65.42
10	-6.12	65.38

*RMSD: desvio médio quadrático

Para uma maior análise das interações realizadas entre a enzima e o ligante no processo de docagem molecular, foi realizada a visualização em 2D das interações entre o ligante e os aminoácidos localizados no sítio ativo da enzima (Figura 5). Com isso, é possível notar ligações do tipo Van der Waals (cor verde) com os resíduos Ile1174, Ser1081, Leu1170, Arg1247, Pro1074, Thr1078, Cys1245 e Asp1244, que são ligações intramoleculares fracas; ligação de pi (cor rosa) com o aminoácido Val1213, onde ocorre uma melhor interação; e duas ligações covalentes (cor lilás) com os aminoácidos Arg1247 e o Cys1245, que seriam as ligações moleculares mais fortes (Figura 5).

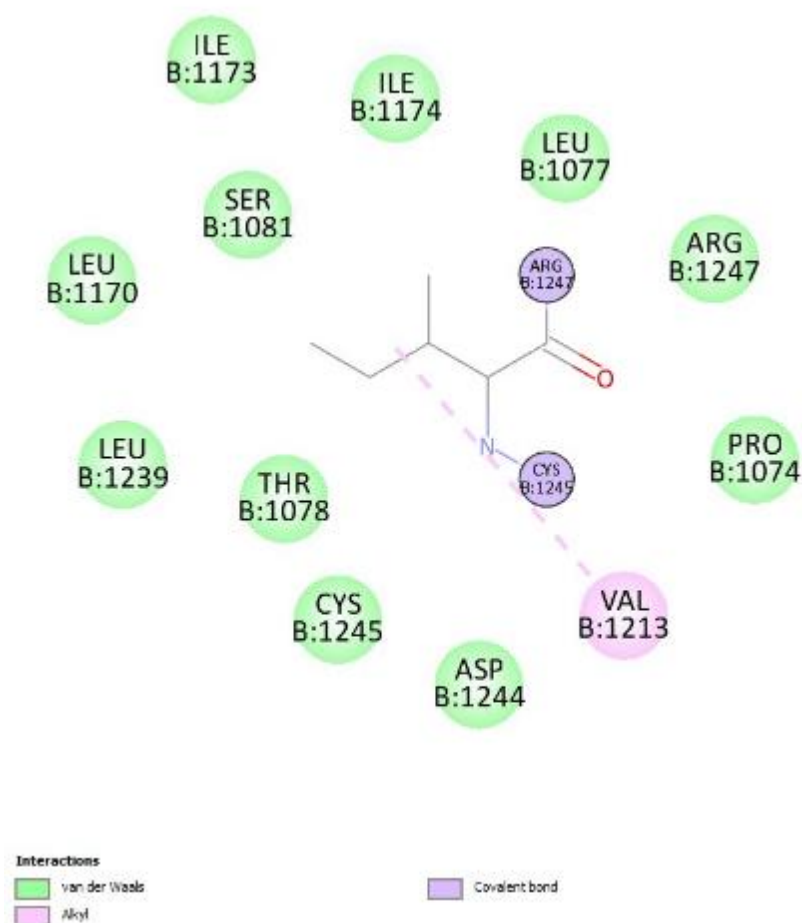


Figura 5. Diagrama 2D de interações entre o ligante nativo e alvo de kaempferol. Interações: Em verde são ligações de Van der Waals, em rosa ligação de Alquil/ Pi-Alquil, e em lilás ligações covalentes.

3.3 Avaliação da ação do EHDA *in vivo* em animais infectados com *S. mansoni*

3.3.1 Análise hepática

3.3.1.1 O tratamento com EHDA reduz infiltrado, necrose, lesão tecidual e presença de granulomas em tecido hepático de camundongos infectados por *S. mansoni*

A análise histopatológica do tecido hepático demonstra que o controle negativo (C-) apresentou aumento de todos os parâmetros avaliados quando levado em consideração o controle limpo (Tabela 6). O tratamento com praziquantel reduziu quase todos os parâmetros (infiltrado inflamatório, necrose, lesão tecidual, presença de granulomas e extensão de granulomas) em comparação com o controle negativo. Em relação ao tratamento com *D. ambrosioides*, ao compararmos com o controle negativo, o grupo EHDA3 apresentou redução em todos os parâmetros analisados, a exceção da quantidade de ovos; O grupo EHDA1 apresentou redução da maioria dos parâmetros, a exceção de necrose e na quantidade de ovos; o grupo EHDA2 apresentou redução de lesão tecidual, presença de granuloma, quantidade de ovos e extensão de granulomas; Todos os grupos tratados com *D. ambrosioides* apresentaram redução da presença de granulomas em relação ao grupo positivo, tratado com praziquantel; e o grupo EHDA2 reduziu a quantidade de ovos em relação ao controle positivo (Tabela 6).

Tabela 6. Análise histopatológica do tecido hepático de camundongos infectados ou não por *Schistosoma mansoni*, e tratados ou não com extrato hidroalcoólico de *Dysphania ambrosioides*.

Parâmetros Analisados	Grupos						
	L	C-	C+	EHDA1	EHDA2	EHDA3	EHDA4
Infiltrado inflamatório	1.0±0	1.5±0.0@	2.25±0.0@*	1.0±0.0@*	1.25±0.0@#	1.0±0.0@*	1.0±0.0@
Necrose	0.0	2.0±0.0@	1.0±0.0@*	1.5±0.5@	1.5±0.5@	1.0±0.0@*	1.5±0.5@
Lesão Tecidual	1.0±0.0	3.0±0.0@	2.0±0.0 @*	2.0±0.0@*	2.3±0.5@*	2.0±0.0@*	2.5±0.5@
Presença de Granuloma	0.0	3.0±0.0@	3.0±0.0@*	1.5±0.0@*#	1.5±0.0@*#	1.5±0.5@*#	2.5±0.0@#
Quantidade de Ovos	0.0	2.0±0.0@	2.0±0.0@	2.0±0.0@	1.5±0.0@*#	2.5±0.5@	2.5±0.5@
Extensão dos Granulomas	0.0	2.0±0.0@	3.0±0.0@*	3.0±0.0@*	1.5±0.0@*	2.75±0.5@*	2.0±0.0@#

a No dia 0 os camundongos foram infectados com 50 cercárias e eutanasiados no 60º dia. O grupo limpo (L) não foi infectado. O controle negativo (C-) não recebeu tratamento. O controle positivo (C+) foi tratado (45º ao 51º dia) por via oral com

praziquantel na dose de 50mg/kg. Nos dias 1 ao 7 (EHDA1), 14 ao 20 (EHDA2), 28 ao 34 (EHDA3) e 45 ao 51 (EHDA4) foram tratados por via oral com EDA na dose de 50mg/kg. A análise foi realizada em cortes histológicos (corados com HE) da parte central do lobo lateral esquerdo do fígado (4 lâminas por grupo). A avaliação realizada com base no escores: 0= ausente; 1= leve; 2= moderado; 3= intenso.

b Os valores representam a média $\pm$ desvio padrão de 6 animais por grupo. @ $p < 0.05$ em comparação ao controle limpo; * $p < 0.05$ em comparação ao controle negativo; # $p < 0.05$ em comparação ao controle positivo.

3.3.1.2 O tratamento com EDA reduz área e número dos granulomas no tecido hepático de camundongos infectados por *S. mansoni*

Em relação ao número de granulomas no tecido hepático (Figura 6A) o tratamento com *D. ambrosioides*, exceto no EHDA4, apresentou redução quando comparado ao controle negativo. A análise da área dos granulomas no mesmo tecido (Figuras 6B), evidenciou que os grupos tratados com *D. ambrosioides* ou com praziquantel apresentaram redução da área, em relação ao controle negativo. O grupo EHDA1, EHDA3 e EHDA4 apresentaram redução da área do granuloma em comparação ao controle positivo.

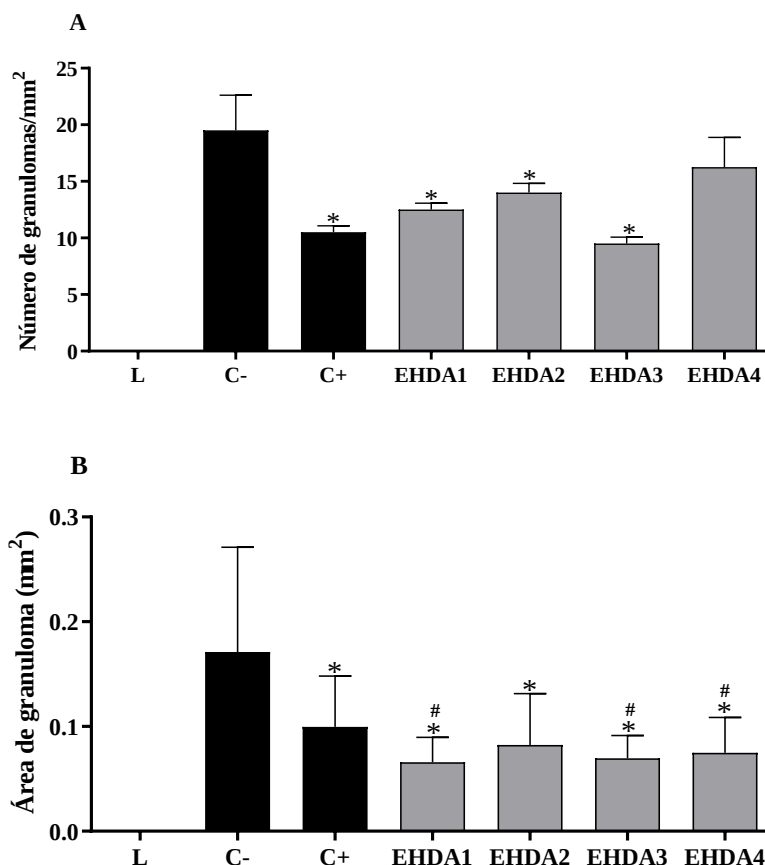


Figura 6. Análise do número (A) e da da área (B) de granulomas no tecido hepático de camundongos infectados ou não por *Schistosoma mansoni*, e tratados ou não com extrato hidroalcoólico de *Dysphania ambrosioides*. A análise foi realizada através do software ImageJ em imagens de cortes histológicos (corados com HE) da parte central do lobo lateral esquerdo do fígado (4 lâminas por grupo) de animais que, no dia 0 foram infectados com 50 cercárias e eutanasiados no 60º dia. O grupo limpo (L) não foi infectado. O controle negativo (C-) não recebeu tratamento. O controle positivo (C+) foi tratado (45º ao 51º dia) por via oral com praziquantel na dose de 50mg/kg. Nos dias 1 ao 7 (EHDA1), 14 ao 20 (EHDA2), 28 ao 34 (EHDA3) e 45 ao 51 (EHDA4)

foram tratados por via oral com EDA na dose de 50mg/kg. Os valores representam a média $\pm$ desvio padrão de 6 animais por grupo. * $p < 0.05$ em comparação ao controle negativo; # $p < 0.05$ em comparação ao controle positivo.

A figura 7 ilustra o parênquima hepático dos animais de todos os grupos e as alterações histopatológicas ao longo das semanas da infecção por *S. mansoni*. É possível verificar presença de granulomas em todos os grupos, a exceção do limpo. No grupo infectado sem tratamento (Figura 7B), se observou infiltrado mononuclear e polimorfonuclear em muitas áreas e a formação granulomatosa apresenta-se de forma desorganizada, com presença de matriz extracelular frouxamente disposta por toda lesão, levando ao aumento de dimensão no granuloma nesses animais, quando comparados aos grupos tratados com EHDA ou PZQ.

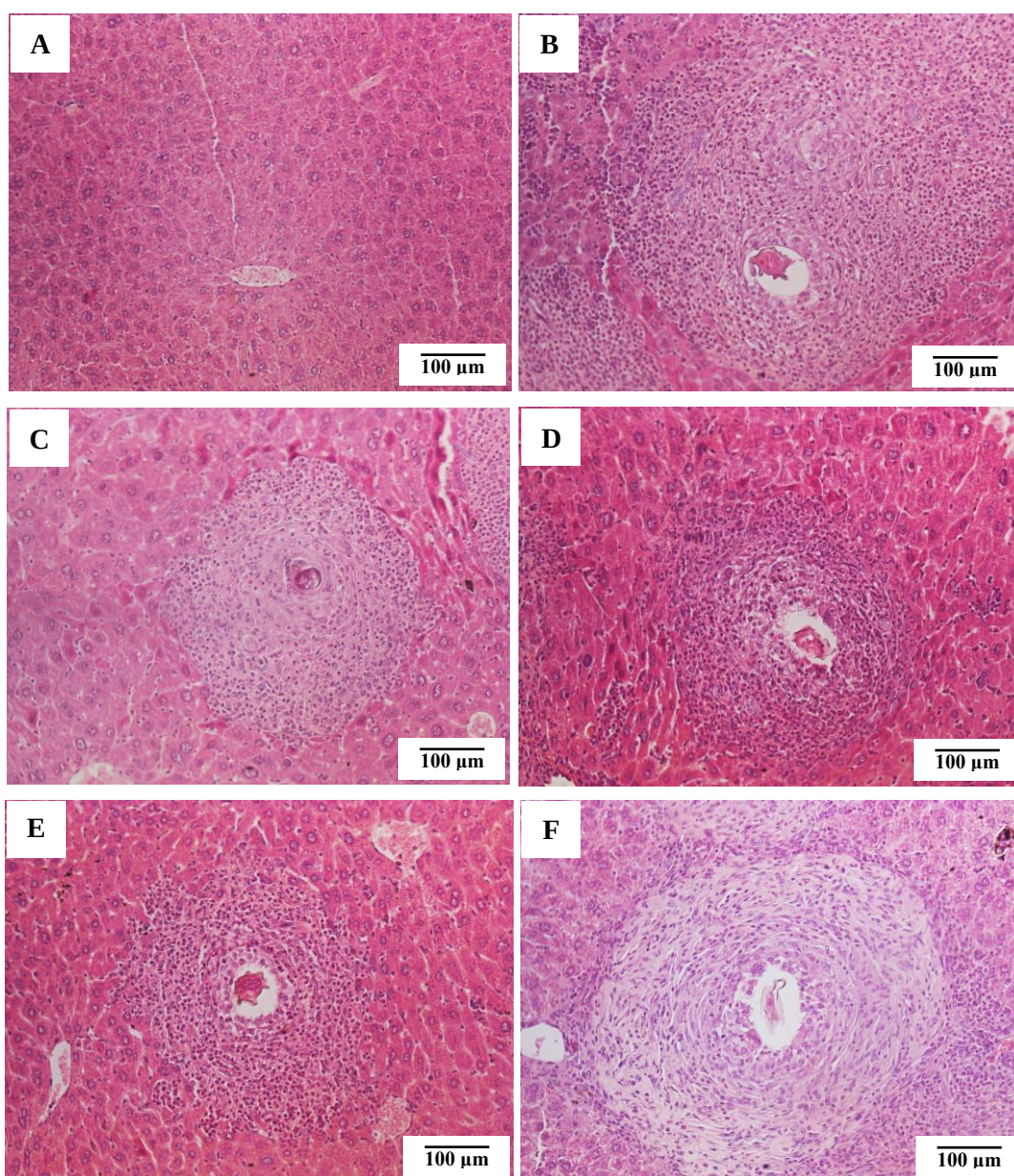


Figura 7. Fotomicrografia de cortes histológicos hepáticos de camundongos infectados ou não por *Schistosoma mansoni*, e tratados ou não com extrato hidroalcoólico de *Dysphania ambrosioides* corados com HE (20x). As imagens representam áreas dos granulomas hepáticos de animais que, no dia 0 foram infectados com 50 cercárias e eutanasiados no 60º dia. O grupo limpo (A) não foi infectado. O controle negativo (B) não recebeu

tratamento. O controle positivo (C) foi tratado (45° ao 51° dia) por via oral com praziquantel na dose de 50mg/kg. Nos dias 1 ao 7 (EHDA1) (D), 14 ao 20 (EHDA2) (E), 28 ao 34 (EHDA3) (F) e 45 ao 51 (EHDA4) (G) foram tratados por via oral com EHDA na dose de 50mg/kg.

3.3.1.3 O tratamento com EHDA promove a deposição de colágeno nos granulomas do tecido hepático de camundongos infectados por *S. mansoni*

A deposição de colágeno em torno das reações granulomatosas foi evidenciada pela coloração de Tricrômico de Masson. A análise confirmou que a deposição de colágeno nos granulomas infectados e sem tratamento acontece de forma desorganizada (Figura 8B) em comparação aos grupos tratados com PZQ (Figura 8C) e EHDA (Figura 8D, E, F e G). A presença de colágeno, evidenciada pela coloração azul, variou entre os diferentes grupos e tecidos.

No tecido hepático, os grupos infetados e tratados com EHDA na fase inicial da infecção (EHDA1), a presença de colágeno no infiltrado celular observado ao redor dos ovos retidos no tecido hepático é discreta (Figura 8D). Nas últimas fases da infecção aguda, a deposição de colágeno nos granulomas hepáticos já é intensa e concentrada mais próximo ao ovo do parasito (Figura 8F e G), diferente do observado para os granulomas de animais infectados e sem tratamento, onde as fibras são menos organizadas e intensas (Figura 8B).

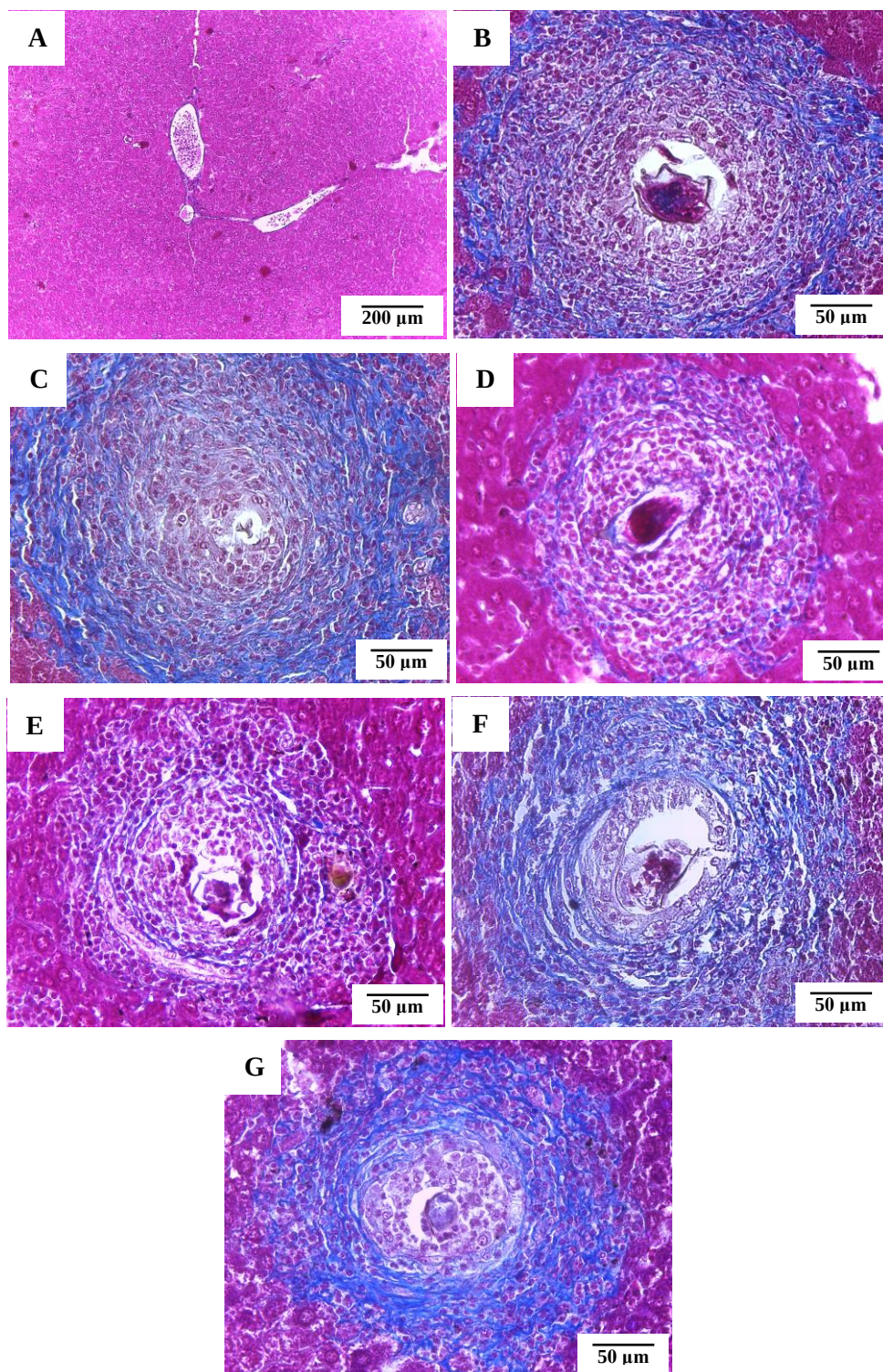
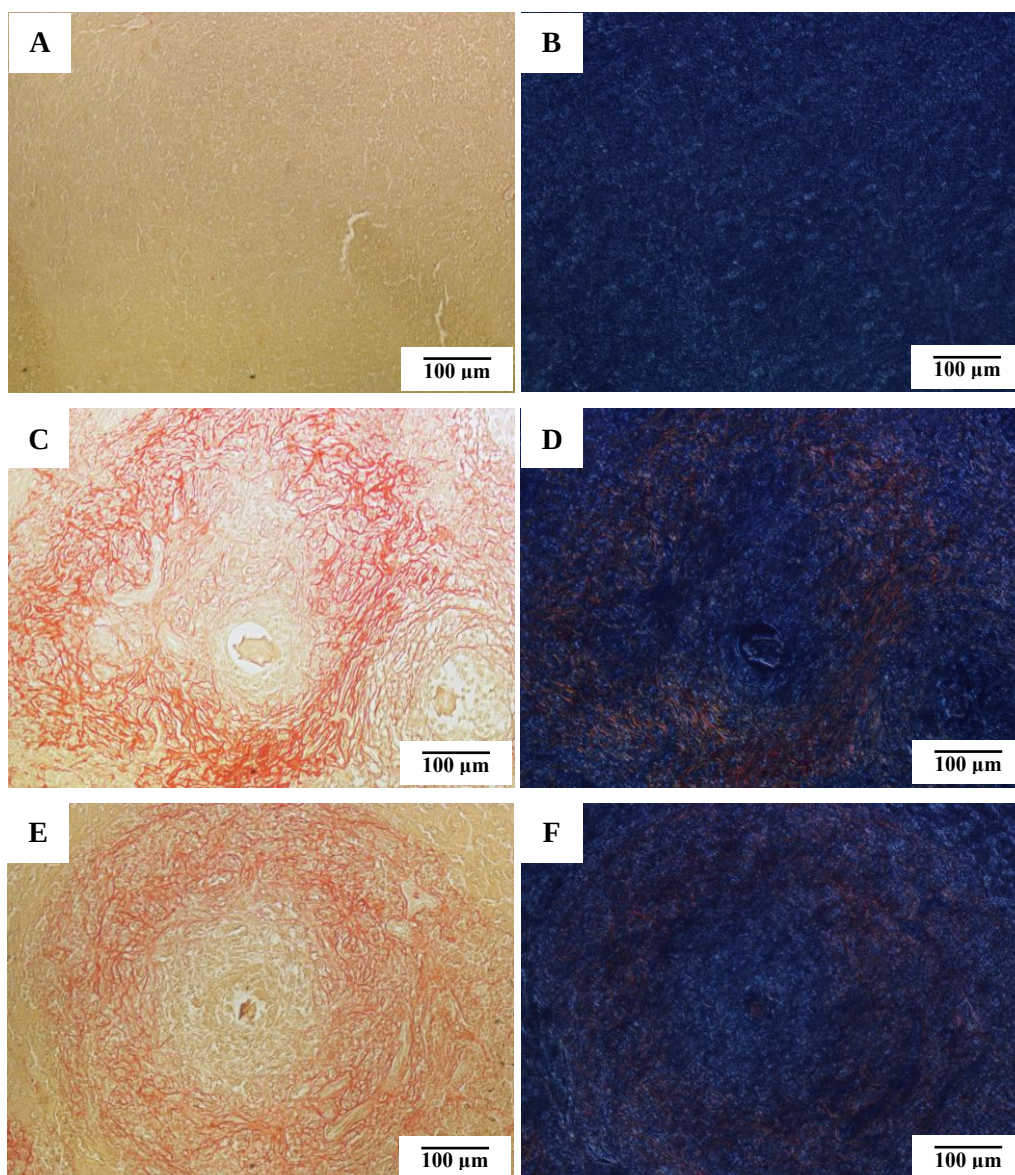


Figura 8. Fotomicrografia de cortes histológicos hepáticos de camundongos infectados ou não por *Schistosoma mansoni*, e tratados ou não com extrato hidroalcoólico de *Dysphania ambrosioides* corados **Tricrômetro de Masson (40x)**. As imagens representam áreas dos granulomas hepáticos de animais que, no dia 0 foram infectados com 50 cercárias e eutanasiados no 60º dia. O grupo limpo (A) não foi infectado. O controle negativo (B) não recebeu tratamento. O controle positivo (C) foi tratado (45º ao 51º dia) por via oral com praziquantel na dose de 50mg/kg. Nos dias 1 ao 7 (EHDA1) (D), 14 ao 20 (EHDA2) (E), 28 ao 34 (EHDA3) (F) e 45 ao 51 (EHDA4) (G) foram tratados por via oral com EHDA na dose de 50mg/kg.

3.3.1.4 O tratamento com EHDA não altera o tipo de fibra de colágeno nos granulomas do tecido hepático de camundongos infectados por *S. mansoni*

Ao longo da fase aguda da esquistossomose, observou-se que os granulomas hepáticos de animais infectados e sem tratamento, apresentaram uma coloração avermelhada dispersa por toda a lesão granulomatosa e sob a luz polarizada foi verificado um predomínio de fibras colágenas do tipo I, que são mais maduras (Figura 9C e D). Nos grupos tratados com o extrato de *D. ambrosioides* também foi constatada uma predominância de fibras colágenas do tipo I (Figura 9G-N). Nos grupos tratados com EHDA, na fase inicial do desenvolvimento de *S. mansoni*, é notável uma concentração das fibras na periferia da lesão granulomatosa, além de organização mais concêntrica e organizada das fibras quando comparado aos animais infectados e sem tratamento (Figuras 9G-L).



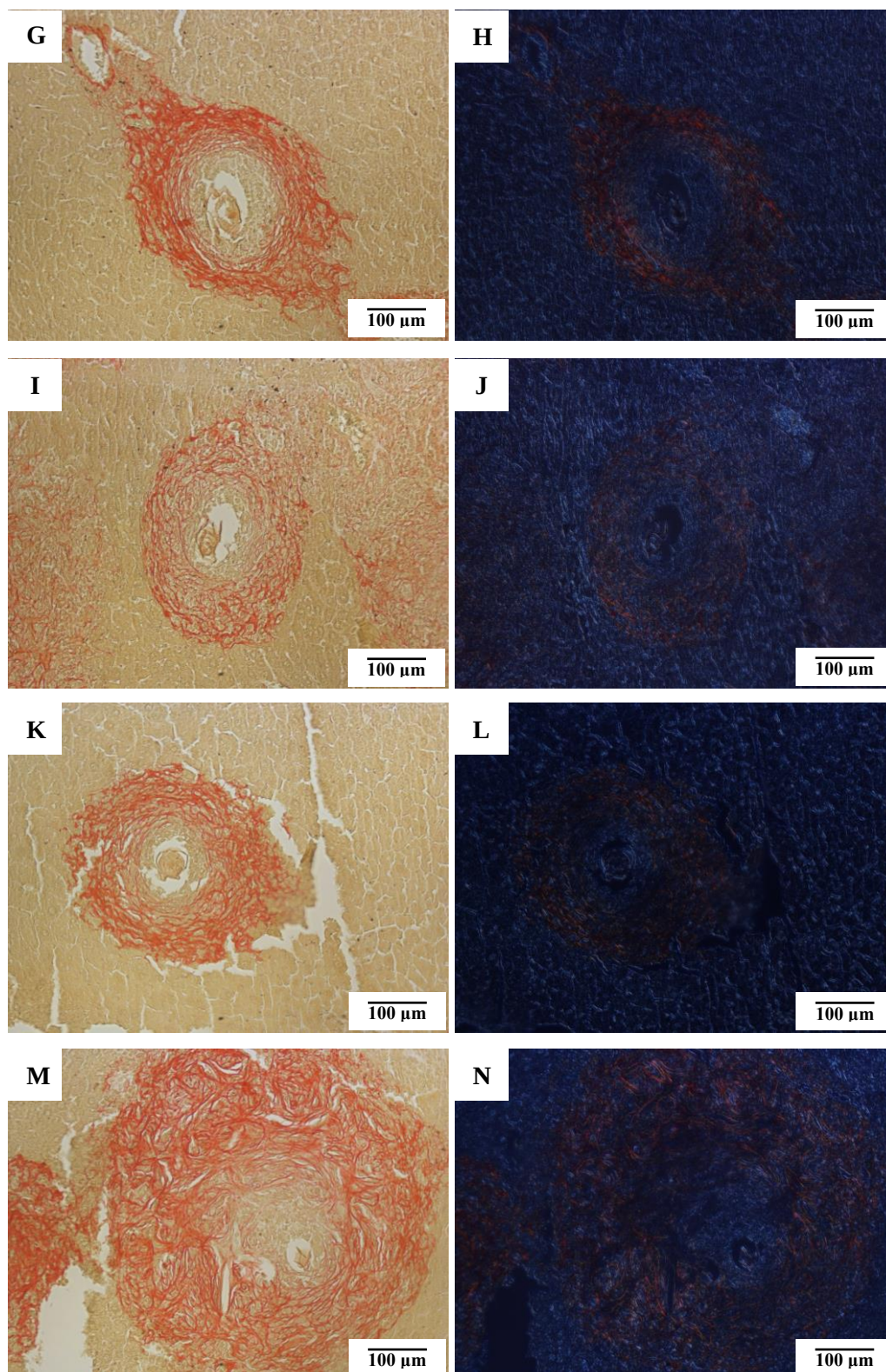


Figura 9. Fotomicrografia de cortes histológicos hepáticos de camundongos infectados ou não por *Schistosoma mansoni*, e tratados ou não com extrato hidroalcoólico de *Dysphania ambrosioides* corados picrosirius red (20x). As imagens representam áreas dos granulomas hepáticos de animais que, no dia 0 foram infectados com 50 cercárias e eutanasiados no 60º dia. As imagens A (luz comum) e B (luz polarizada) representam o grupo limpo, que não foi infectado. As imagens C (luz comum) e D (luz polarizada) representam o controle negativo, que não recebeu tratamento. As imagens E (luz comum) e F (luz polarizada) representam o controle positivo, que foi tratado (45º ao 51º dia) por via oral com praziquantel na dose de 50mg/kg. As imagens G (luz comum) e H (luz polarizada) representam os animais que foram tratados por via oral com EHDA na dose de

50mg/kg dos dias 1 ao 7 (EHDA1), I (luz comum) e J (luz polarizada), foram tratados dos dias 14 ao 20 (EHDA2), K (luz comum) e L (luz polarizada), foram tratados dos dias 28 ao 34 (EHDA3) e M (luz comum) e N (luz polarizada) foram tratados dos dias 45 ao 51 (EHDA4).

3.3.2 Análise intestinal

3.3.2.1 O tratamento com EHDA reduz lesão tecidual no intestino de camundongos infectados por *S. mansoni*

A análise histopatológica do intestino demonstrou que o controle negativo (C-) apresentou aumento nos parâmetros de infiltrado inflamatório, presença de granulomas, quantidade de ovos e extensão de granuloma em comparação com o controle limpo (Tabela 7). O tratamento com *D. ambrosioides* no grupo EHDA4 reduziu a lesão tecidual em relação ao controle limpo e ao infectado. O grupo tratado com praziquantel teve redução da extensão de granulomas quando comparado com o controle negativo (Tabela 7).

Tabela 7. Análise histopatológica do tecido intestinal de camundongos infectados ou não por *Schistosoma mansoni*, e tratados ou não com extrato hidroalcoólico de *Dysphania ambrosioides*.

Parâmetros	Grupos						
Analizados	L	C-	C+	EHDA1	EHDA2	EHDA3	EHDA4
Infiltrado inflamatório	0.0	1.5±0.75@	2.25 ±1.0@	1.5±0.0	1.25 ±1.25	1.0±0.0	1.0±0.75
Necrose	0.0	0.0	0.25 ±0.45	0.0	0.0	0.0	0.0
Lesão Tecidual	1.0±0.0	0.5 ±0.75	2.25 ±1.15@	1.5 ±0.5@	1.5 ±0.5@	1.0±0.0*	0.0@*
Presença de Granuloma	0.0	1.5±0.75@	0.5±1.0	1.5±0.75@	1.5±0.75@	1.25 ±0.5	1.25±0.5
Quantidade de Ovos	0.0	1.5±0.75@	0.5±1.0	1.5±0.75@	1.5±0.75@	1.0±0.0	1.0±0.0
Extensão dos Granulomas	0.0	1.25±0.5@	0.25±0.5*	1.0±0.0@#	1.0±0.0@#	1.0±0.0@#	1.0±0.0@#

a No dia 0 os camundongos foram infectados com 50 cercárias e eutanasiados no 60º dia. O grupo limpo (L) não foi infectado. O controle negativo (C-) não recebeu tratamento. O controle positivo (C+) foi tratado (45º ao 51º dia) por via oral com praziquantel na dose de 50mg/kg. Nos dias 1 ao 7 (EHDA1), 14 ao 20 (EHDA2), 28 ao 34 (EHDA3) e 45 ao 51 (EHDA4) foram tratados por via oral com EDA na dose de 50mg/kg. A análise foi realizada em cortes histológicos (corados com HE) da parte inicial e final do intestino delgado (4 animais por grupo). A avaliação realizada com base no escores: 0= ausente; 1= leve; 2= moderado; 3= intenso.

b Os valores representam a média ± desvio padrão de 4 animais por grupo. @ p<0.05 em comparação ao controle limpo; * p<0.05 em comparação ao controle negativo; # p<0.05 em comparação ao controle positivo.

3.3.2.2 O tratamento com EHDA reduz área e número dos granulomas no intestino de camundongos infectados por *S. mansoni*

Quanto ao número de granulomas no tecido intestinal (Figura 10A) o tratamento com praziquantel ou com *D. ambrosioides* no início da infecção (EHDA1) foi capaz de reduzir os granulomas quando comparados ao controle negativo. Os grupos EHDA3 e EHDA4 apresentaram aumento no número de granulomas em relação ao controle positivo. No que diz respeito a análise da área dos granulomas no intestino (Figuras 10B), os grupos tratados com *D. ambrosioides* (EHDA2, EHDA3 e EHDA4) apresentaram redução da área, em relação ao controle negativo.

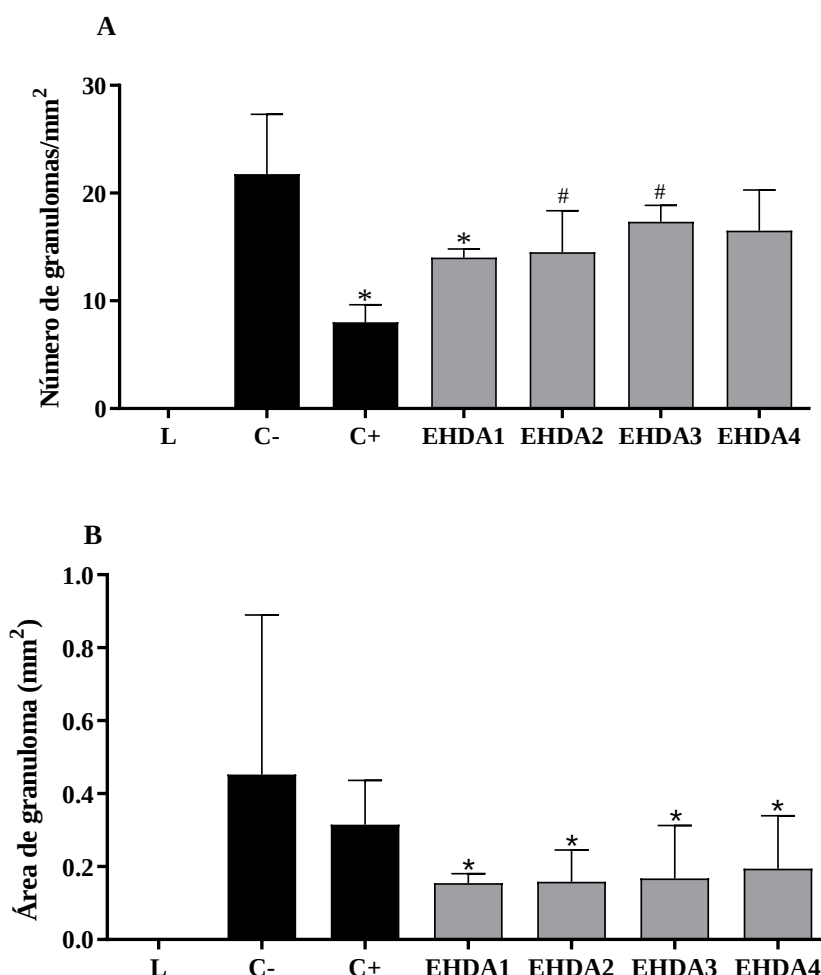


Figura 10. Análise do número (A) e da da área (B) de granulomas no tecido intestinal de camundongos infectados ou não por *Schistosoma mansoni*, e tratados ou não com extrato hidroalcoólico de *Dysphania ambrosioides*. A análise foi realizada através do software ImageJ em imagens de cortes histológicos (corados com HE) da parte inicial, média e final do intestino delgado de animais que, no dia 0 foram infectados com 50 cercárias e eutanasiados no 60º dia. O grupo limpo (L) não foi infectado. O controle negativo (C-) não recebeu tratamento. O controle positivo (C+) foi tratado (45º ao 51º dia) por via oral com praziquantel na dose de 50mg/kg. Nos dias 1 ao 7 (EHDA1), 14 ao 20 (EHDA2), 28 ao 34 (EHDA3) e 45 ao 51 (EHDA4) foram tratados por via oral com

EDA na dose de 50mg/kg. Os valores representam a média $\pm$ desvio padrão de 6 animais por grupo. * $p < 0.05$ em comparação ao controle negativo; # $p < 0.05$ em comparação ao controle positivo.

Nas análises histopatológicas do intestino, também foi possível constatar uma forma mais organizada dos granulomas dos grupos infectados e tratados (Figura 11C, D, E, F e G) quando comparados ao grupo controle negativo (Figura 11B). No entanto, é importante mencionar que os granulomas apresentam forma mais alongada, com infiltrado celular menor em relação ao tecido hepático e foi possível identificar granulomas coalescentes em muitas áreas.

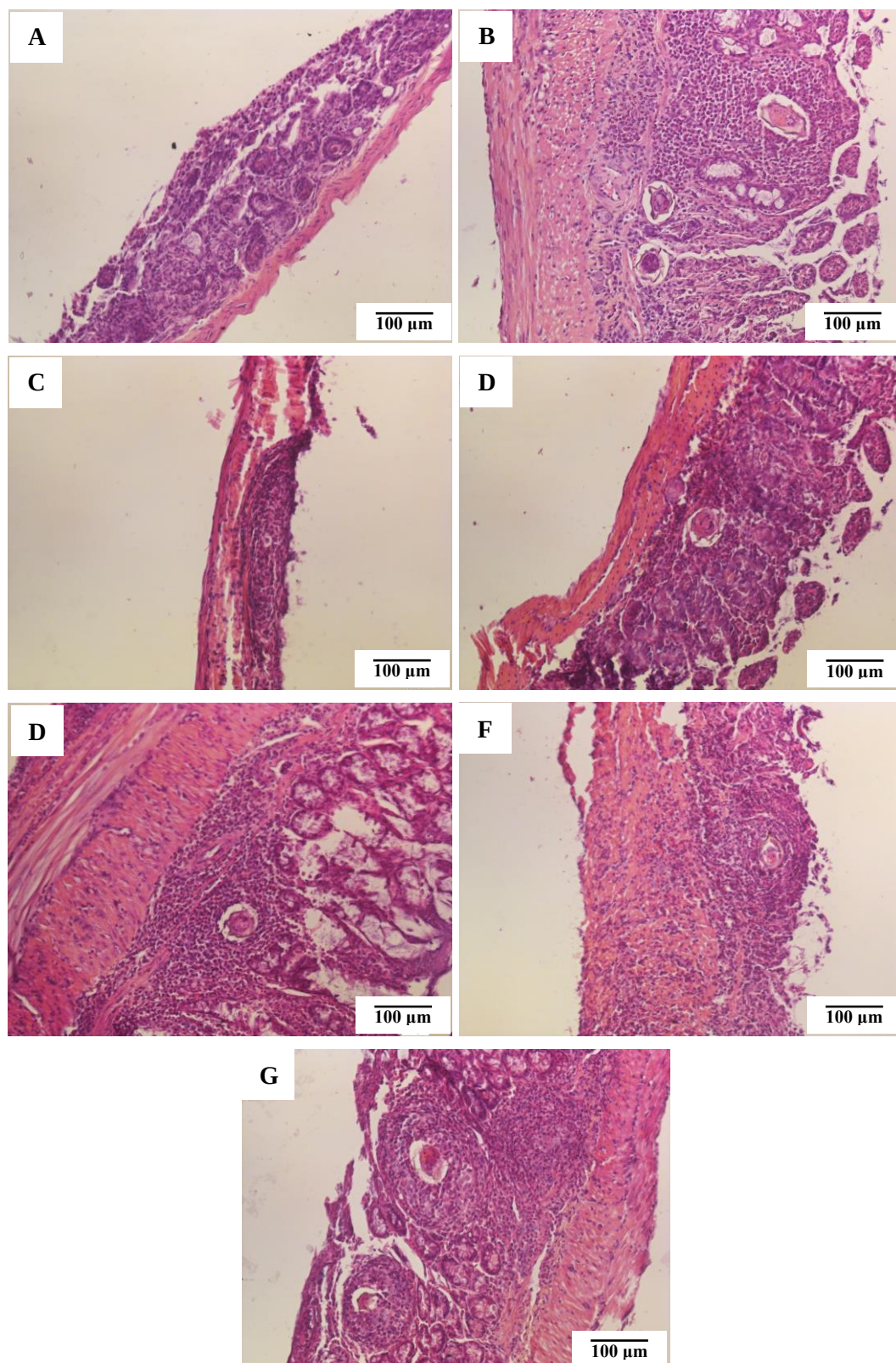
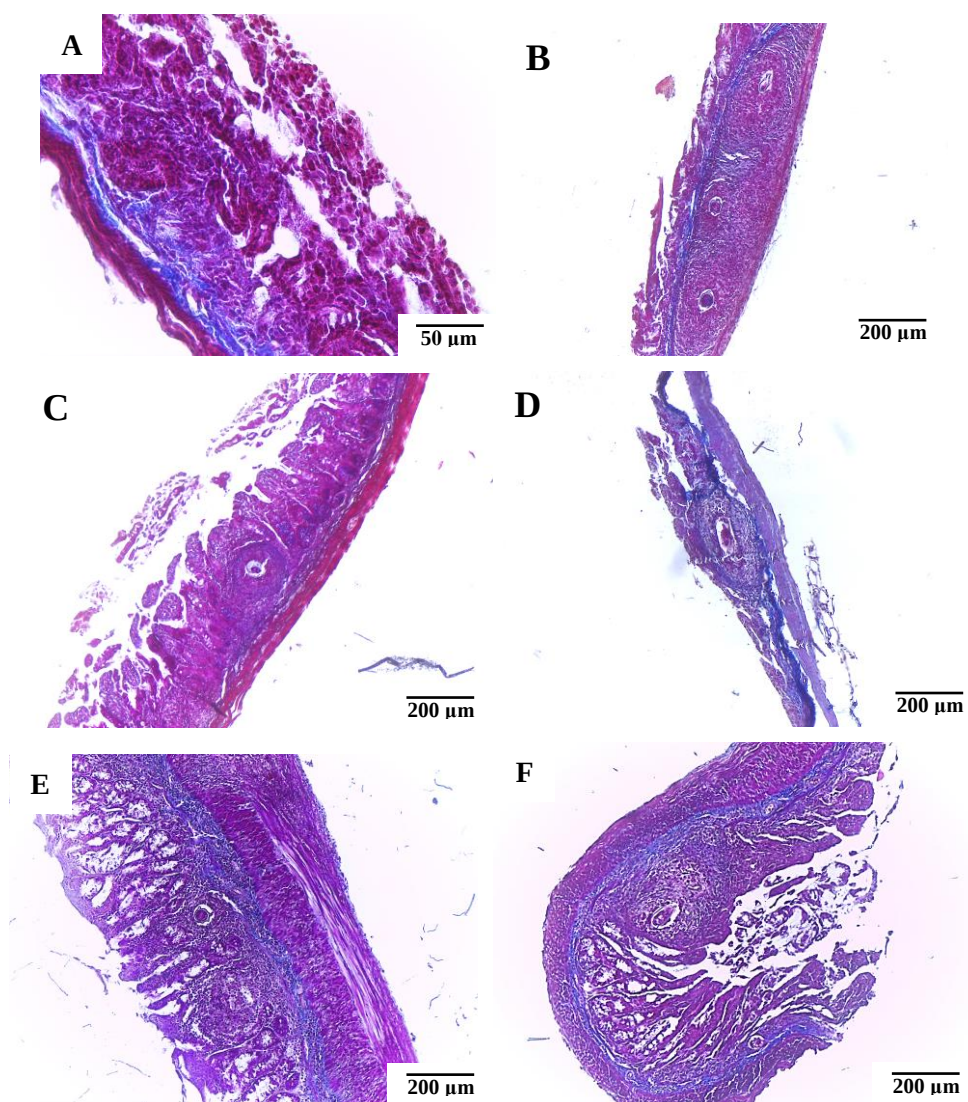


Figura 11. Fotomicrografia de cortes histológicos intestinais de camundongos infectados ou não por *Schistosoma mansoni*, e tratados ou não com extrato hidroalcoólico de *Dysphania ambrosioides* corados com HE (20x). As imagens representam áreas dos granulomas intestinais de animais que, no dia 0 foram infectados com 50 cercárias e eutanasiados no 60º dia. O grupo limpo (A) não foi infectado. O controle negativo (B) não recebeu tratamento. O controle positivo (C) foi tratado (45º ao 51º dia) por via oral com praziquantel na dose de 50mg/kg. Nos dias 1 ao 7 (EHDA1) (D), 14 ao 20 (EHDA2) (E), 28 ao 34 (EHDA3) (F) e 45 ao 51 (EHDA4) (G) foram tratados por via oral com EHDA na dose de 50mg/kg.

3.3.2.3 O tratamento com EHDA promove a deposição de colágeno nos granulomas do tecido intestinal de camundongos infectados por *S. mansoni*

A deposição de muco e colágeno no tecido intestinal se concentra na parede desse tecido. No caso dos camundongos infectados e sem tratamento, a deposição de colágeno se organiza de forma discreta ao redor do infiltrado celular (Figura 12B), diferente dos grupos tratados que é possível verificar uma organização circular das fibras colágenas ao redor da reação granulomatosa, em especial na última fase de tratamento com EHDA, que é mais intensa (Figura 12G).



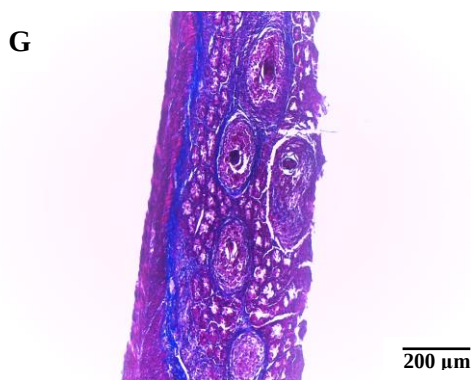
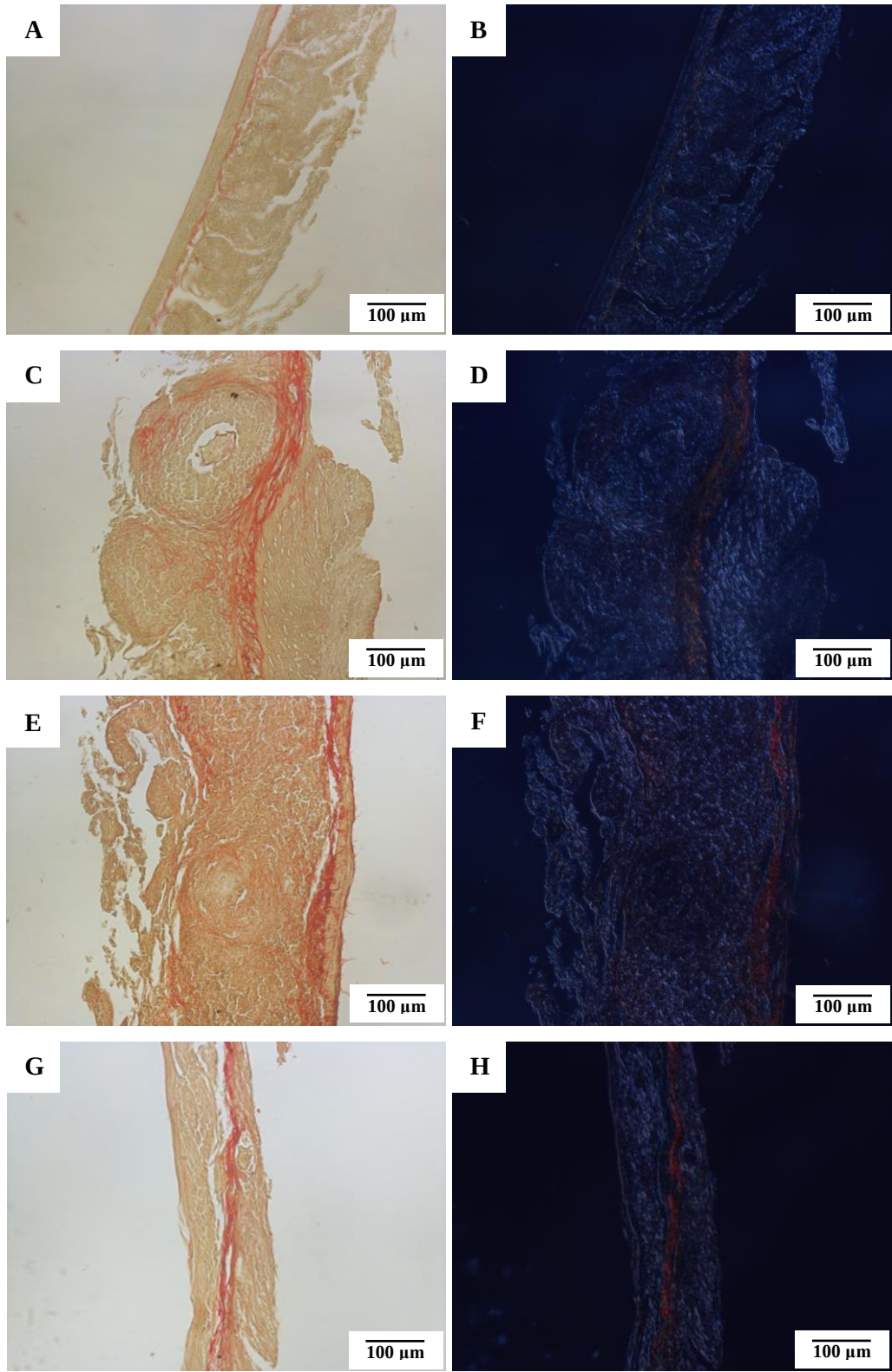


Figura 12. Fotomicrografia de cortes histológicos intestinais de camundongos infectados ou não por *Schistosoma mansoni*, e tratados ou não com extrato hidroalcoólico de *Dysphania ambrosioides* corados Tricrômero de Masson (20x). As imagens representam áreas dos granulomas intestinais de animais que, no dia 0 foram infectados com 50 cercárias e eutanasiados no 60º dia. O grupo limpo (A) não foi infectado. O controle negativo (B) não recebeu tratamento. O controle positivo (C) foi tratado (45º ao 51º dia) por via oral com praziquantel na dose de 50mg/kg. Nos dias 1 ao 7 (EHDA1) (D), 14 ao 20 (EHDA2) (E), 28 ao 34 (EHDA3) (F) e 45 ao 51 (EHDA4) (G) foram tratados por via oral com EHDA na dose de 50mg/kg.

3.3.2.4 O tratamento com EHDA não altera o tipo de fibra de colágeno nos granulomas do tecido intestinal de camundongos infectados por *S. mansoni*

Nos granulomas intestinais também foram observadas fibras colágenas avermelhadas nos animais infectados, concentradas principalmente na mucosa intestinal, e organizadas na periferia da lesão granulomatosa (Figura 13C). Sob luz polarizada foram identificadas fibras do tipo I nos granulomas intestinais.

Em relação aos grupos tratados com o EHDA, foi constatado a presença de fibras colágenas do tipo I, porém é possível verificar uma quantidade menos intensa de fibras na mucosa intestinal ou ao redor dos granulomas (Figura 13G-N) quando levado em consideração o grupo controle negativo.



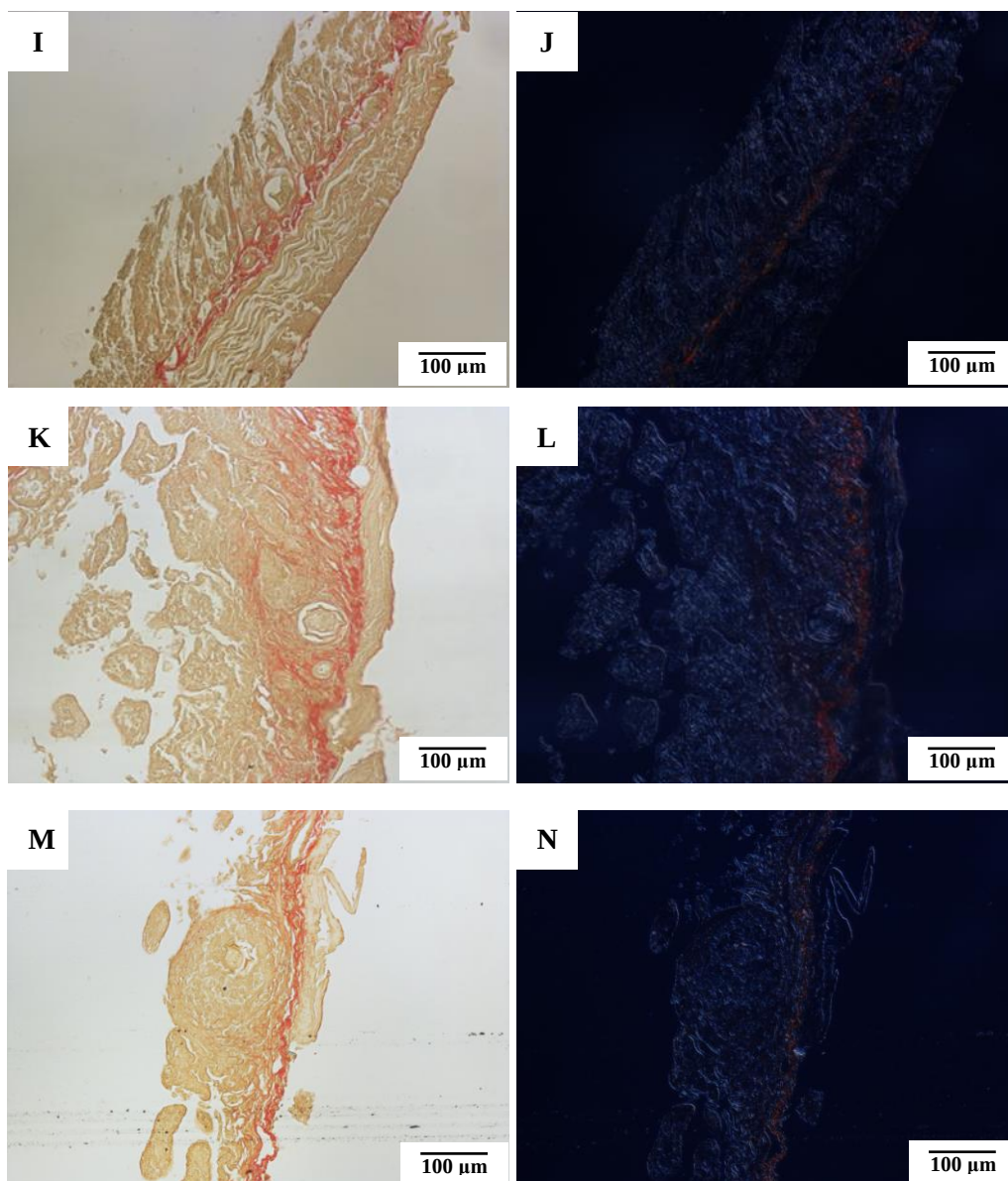


Figura 13. Fotomicrografia de cortes histológicos intestinais de camundongos infectados ou não por *Schistosoma mansoni*, e tratados ou não com extrato hidroalcoólico de *Dysphania ambrosioides* corados picrosirius red (20x). As imagens representam áreas dos granulomas intestinais de animais que, no dia 0 foram infectados com 50 cercárias e eutanasiados no 60º dia. As imagens A (luz comum) e B (luz polarizada) representam o grupo limpo, que não foi infectado. As imagens C (luz comum) e D (luz polarizada) representam o controle negativo, que não recebeu tratamento. As imagens E (luz comum) e F (luz polarizada) representam o controle positivo, que foi tratado (45º ao 51º dia) por via oral com praziquantel na dose de 50mg/kg. As imagens G (luz comum) e H (luz polarizada) representam os animais que foram tratados por via oral com EHDA na dose de 50mg/kg dos dias 1 ao 7 (EHDA1), I (luz comum) e J (luz polarizada), foram tratados dos dias 14 ao 20 (EHDA2), K (luz comum) e L (luz polarizada), foram tratados dos dias 28 ao 34 (EHDA3) e M (luz comum) e N (luz polarizada) foram tratados dos dias 45 ao 51 (EHDA4).

3.3.3 Análise pulmonar

3.3.3.1 O tratamento com EHDA reduz infiltrado inflamatório no tecido pulmonar de camundongos infectados por *S. mansoni*

A análise histopatológica do pulmão evidenciou um aumento de infiltrado inflamatório e lesão tecidual com a infecção por *S. mansoni*, sem tratamento, em comparação ao controle limpo (Tabela 8). No entanto, houve uma redução de infiltrado inflamatório no grupo EHDA1 em relação ao grupo controle negativo. Não foi constatada a presença de granulomas e ovos no tecido pulmonar de camundongos tratados com EHDA ou PZQ (Tabela 8).

Tabela 8. Análise histopatológica do tecido pulmonar de camundongos infectados ou não por *Schistosoma mansoni*, e tratados ou não com extrato hidroalcoólico de *Dysphania ambrosioides*.

Parâmetros	Grupos							
	Analizados	L	C-	C+	EHDA1	EHDA2	EHDA3	EHDA4
Infiltrado inflamatório		1.0±0.0	2.75±0.65 [@]	2.3±0 [@]	1.75±0.65 ^{@*#}	3.0±0.0 [@]	3.0±0.0 [@]	3.0±0 [@]
Necrose		0.0	0.0	0.25±0.45	0.0	0.0	0.0	0.0
Lesão Tecidual		1.0±0.0	2.75±0.55 [@]	3.0±0.0 [@]	2.75 ±0.55 [@]	3.0±0.0 [@]	3.0±0.0 [@]	3.0±0.0 [@]
Presença de Granuloma		0.0	0.25±0.45	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Quantidade de Ovos		0.0	0.25±0.45	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Extensão dos Granulomas		0.0	0.25±0.45	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0

a No dia 0 os camundongos foram infectados com 50 cercárias e eutanasiados no 60º dia. O grupo limpo (L) não foi infectado. O controle negativo (C-) não recebeu tratamento. O controle positivo (C+) foi tratado (45º ao 51º dia) por via oral com praziquantel na dose de 50mg/kg. Nos dias 1 ao 7 (EHDA1), 14 ao 20 (EHDA2), 28 ao 34 (EHDA3) e 45 ao 51 (EHDA4) foram tratados por via oral com EDA na dose de 50mg/kg. A análise foi realizada em cortes histológicos (corados com HE) do tecido pulmonar (6 animais por grupo). A avaliação realizada com base no escores: 0= ausente; 1= leve; 2= moderado; 3= intenso.

b Os valores representam a média ± desvio padrão de 4 animais por grupo. @ p<0.05 em comparação ao controle limpo; * p<0.05 em comparação ao controle negativo; # p<0.05 em comparação ao controle positivo.

3.3.3.2 O tratamento com EHDA demonstrou granulomas no pulmão apenas em camundongos infectados por *S. mansoni*

Quanto ao número de granulomas no tecido pulmonar, não foram observados granulomas nos grupos tratados com *D. ambrosioides* ou com praziquantel, apenas no controle negativo (infectado e sem tratamento). Apesar de não terem sido encontrados granulomas nos grupos tratados, foi possível verificar a presença de infiltrado celular e lesão tecidual em diversas áreas (Figura 15C, D, E, F e G).

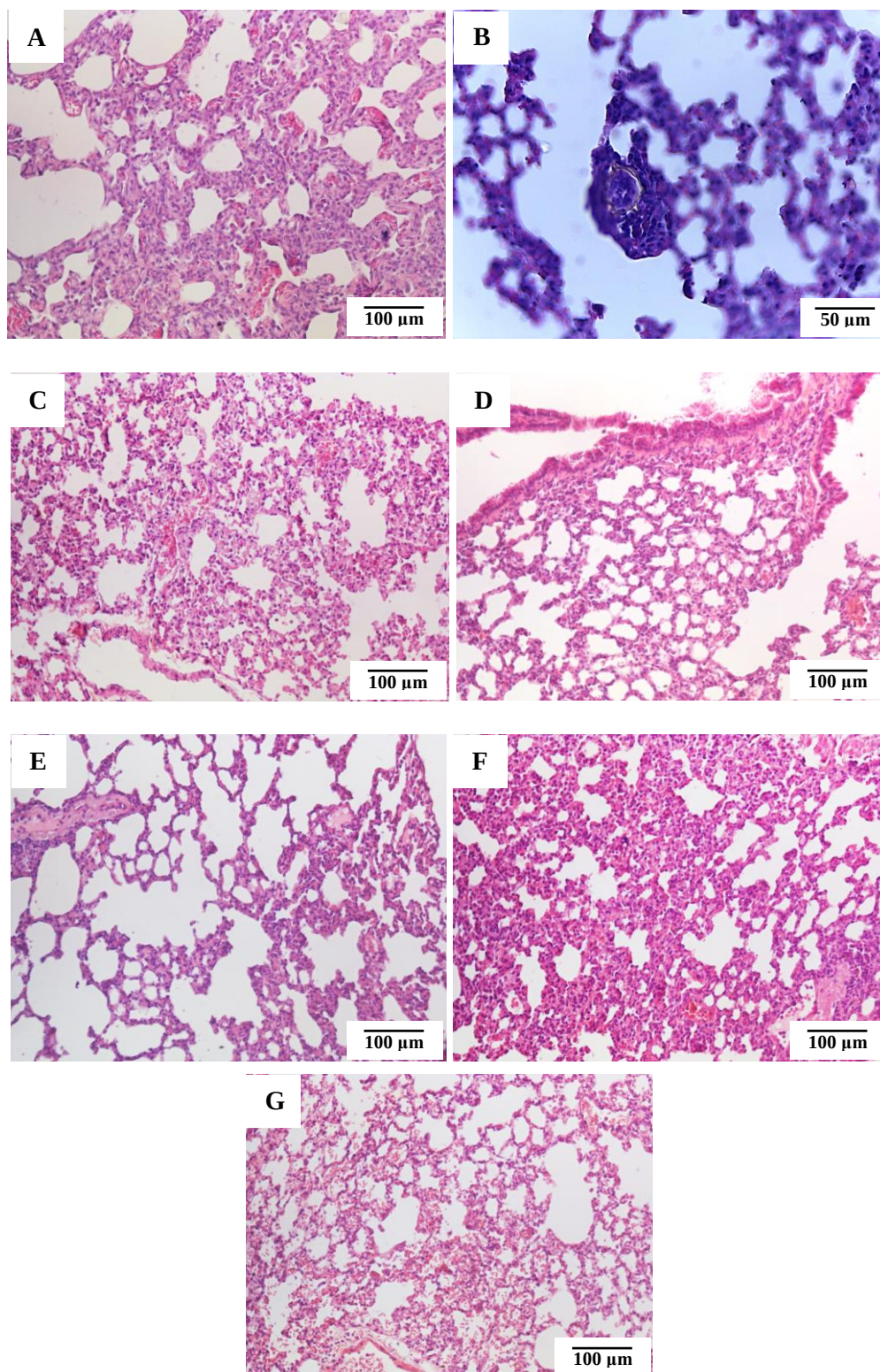
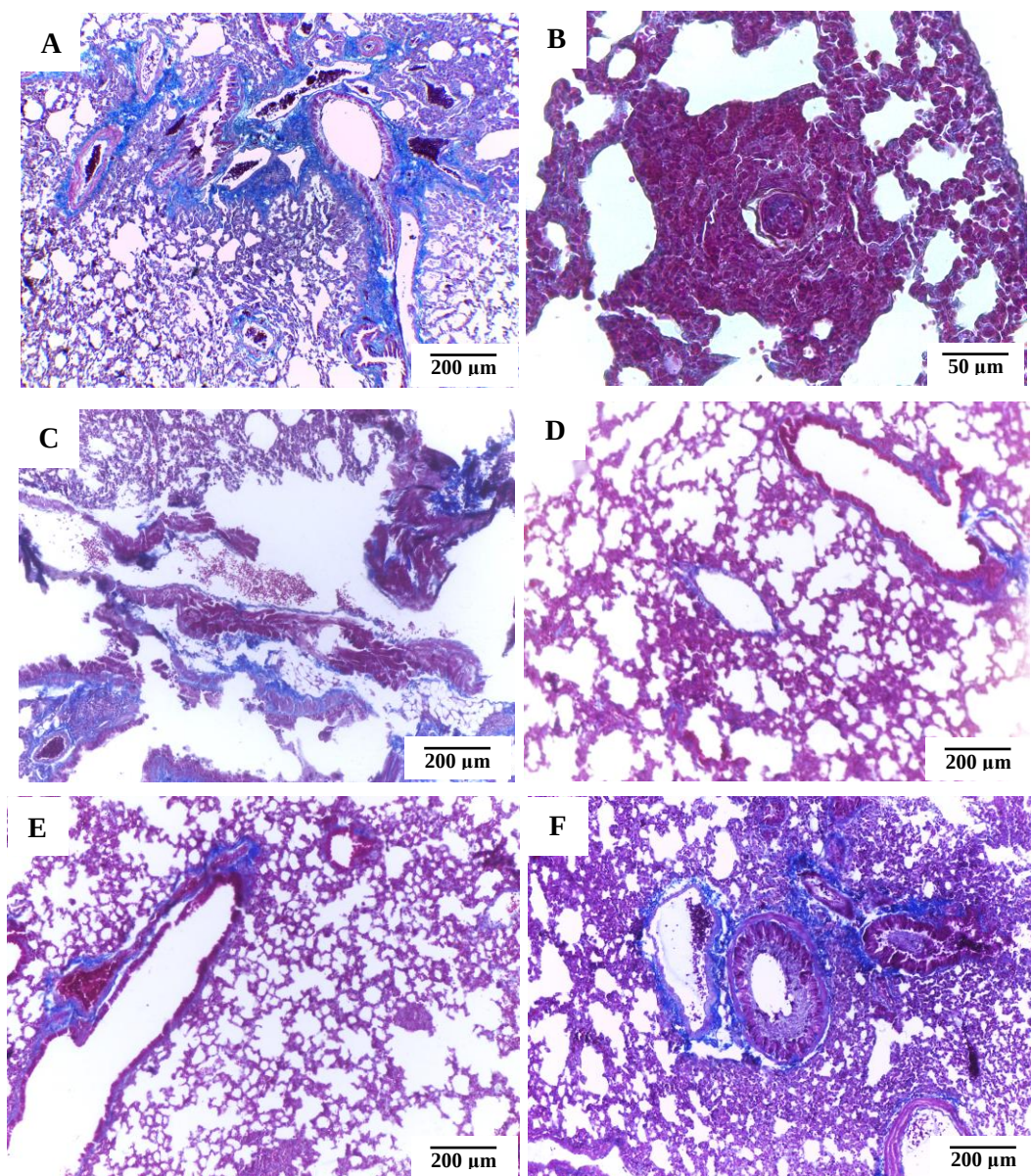


Figura 14. Fotomicrografia de cortes histológicos pulmonares de camundongos infectados ou não por *Schistosoma mansoni*, e tratados ou não com extrato hidroalcoólico de *Dysphania ambrosioides* corados com HE (20x). As imagens representam áreas dos granulomas hepáticos de animais que, no dia 0 foram infectados com 50 cercárias e eutanasiados no 60º dia. O grupo limpo (A) não foi infectado. O controle negativo (B) não recebeu tratamento. O controle positivo (C) foi tratado (45º ao 51º dia) por via oral com praziquantel na dose de 50mg/kg. Nos dias 1 ao 7 (EHDA1) (D), 14 ao 20 (EHDA2) (E), 28 ao 34 (EHDA3) (F) e 45 ao 51 (EHDA4) (G) foram tratados por via oral com EHDA na dose de 50mg/kg.

3.3.3.3 O tratamento com EHDA não altera a deposição de colágeno no pulmão

A deposição de muco e colágeno é evidenciada em várias áreas do tecido pulmonar dos animais infectados ou não. No entanto, ao redor do granuloma, há pouca deposição de colágeno quando comparado aos granulomas intestinais e hepáticos (Figura 16B).



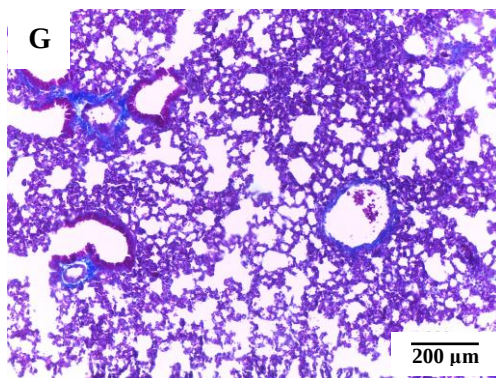
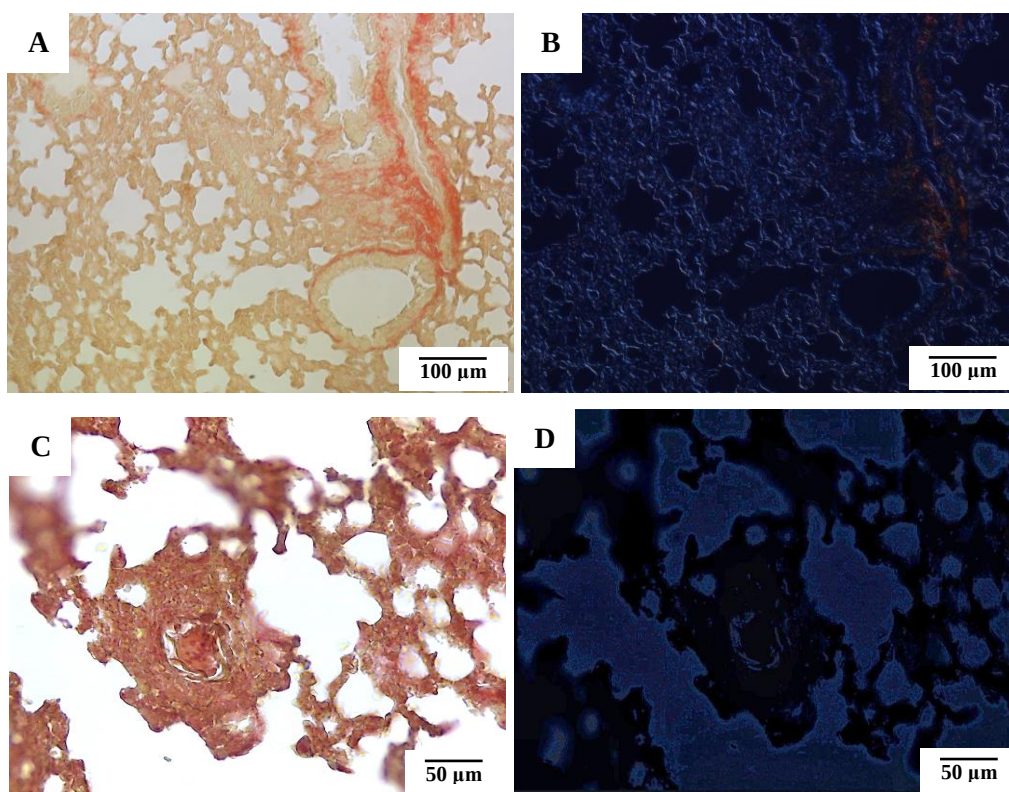
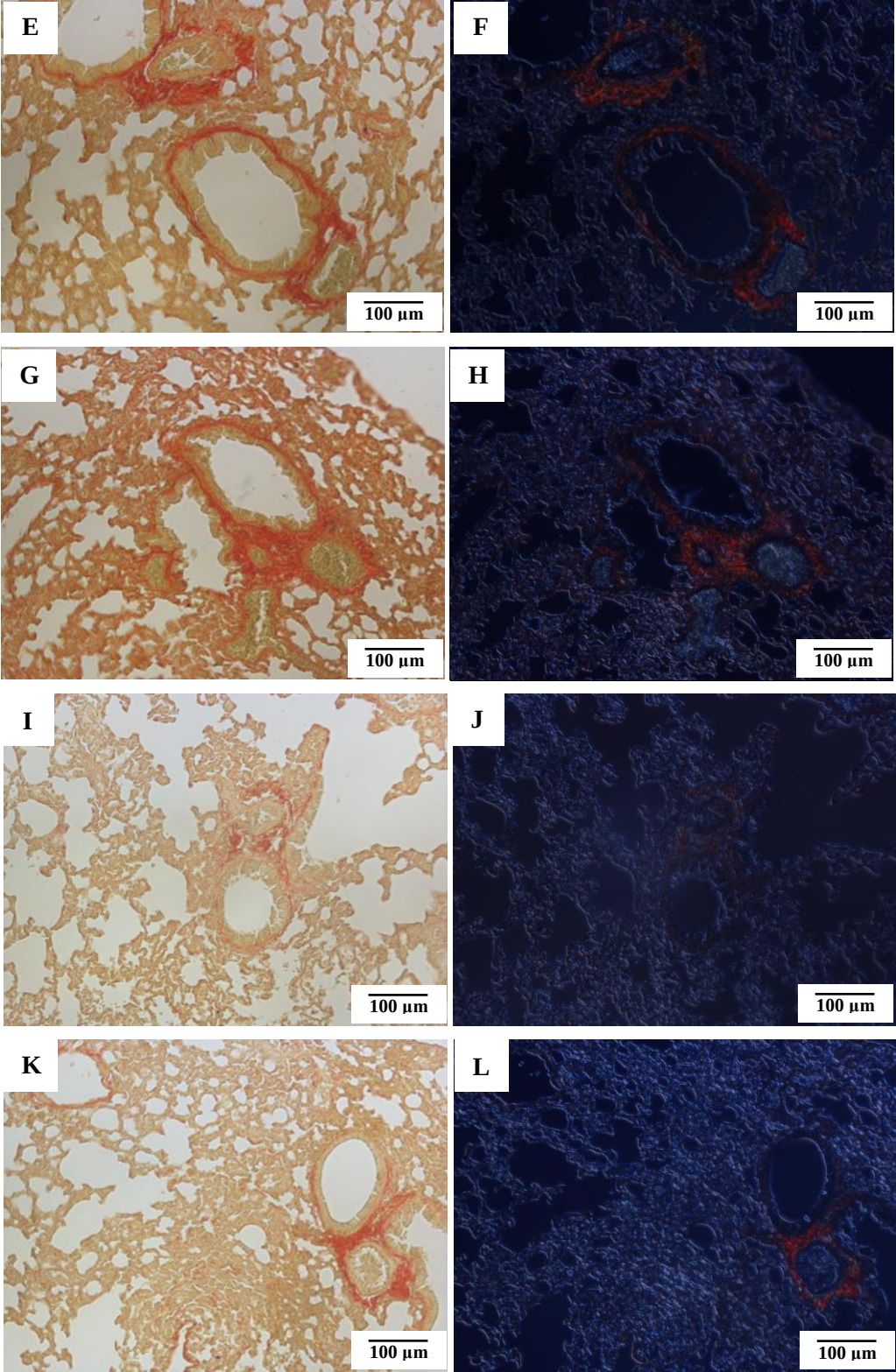


Figura 15. Fotomicrografia de cortes histológicos pulmonares de camundongos infectados ou não por *Schistosoma mansoni*, e tratados ou não com extrato hidroalcoólico de *Dysphania ambrosioides* corados Tricrômero de Masson (40x). As imagens representam áreas dos granulomas pulmonares de animais que, no dia 0 foram infectados com 50 cercárias e eutanasiados no 60º dia. O grupo limpo (A) não foi infectado. O controle negativo (B) não recebeu tratamento. O controle positivo (C) foi tratado (45º ao 51º dia) por via oral com praziquantel na dose de 50mg/kg. Nos dias 1 ao 7 (EHDA1) (D), 14 ao 20 (EHDA2) (E), 28 ao 34 (EHDA3) (F) e 45 ao 51 (EHDA4) (G) foram tratados por via oral com EHDA na dose de 50mg/kg.

3.3.3.4 O tratamento com EHDA não altera o tipo de fibra de colágeno nos granulomas do tecido pulmonar de camundongos infectados por *S. mansoni*

No tecido pulmonar as fibras colágenas do tipo I foram predominantes nas regiões de infiltrado inflamatório e hemorragias, sendo observado poucas fibras ao redor do granuloma pulmonar nos animais infectados e sem tratamento, onde não houve marcação (Figura 17C-D).





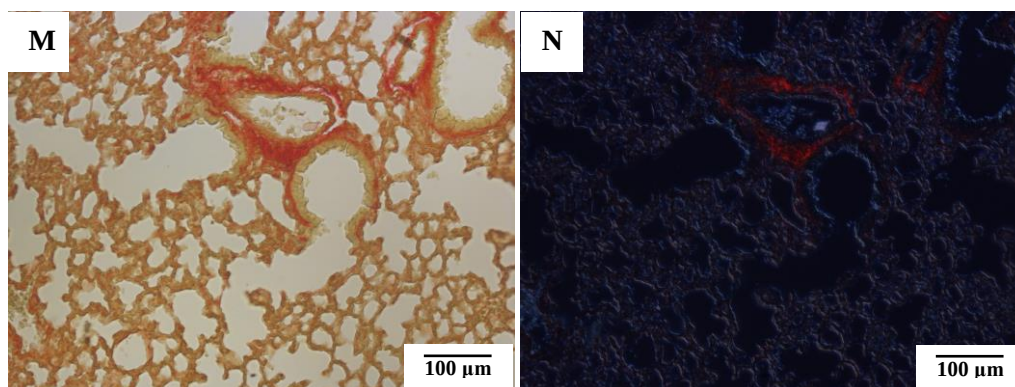


Figura 16. Fotomicrografia de cortes histológicos pulmonares de camundongos infectados ou não por *Schistosoma mansoni*, e tratados ou não com extrato hidroalcoólico de *Dysphania ambrosioides* corados picrosirius red (20x). As imagens representam áreas dos granulomas pulmonares de animais que, no dia 0 foram infectados com 50 cercárias e eutanasiados no 60º dia. As imagens A (luz comum) e B (luz polarizada) representam o grupo limpo, que não foi infectado. As imagens C (luz comum) e D (luz polarizada) representam o controle negativo, que não recebeu tratamento. As imagens E (luz comum) e F (luz polarizada) representam o controle positivo, que foi tratado (45º ao 51º dia) por via oral com praziquantel na dose de 50mg/kg. As imagens G (luz comum) e H (luz polarizada) representam os animais que foram tratados por via oral com EHDA na dose de 50mg/kg dos dias 1 ao 7 (EHDA1), I (luz comum) e J (luz polarizada), foram tratados dos dias 14 ao 20 (EHDA2), K (luz comum) e L (luz polarizada), foram tratados dos dias 28 ao 34 (EHDA3) e M (luz comum) e N (luz polarizada) foram tratados dos dias 45 ao 51 (EHDA4).

4 DISCUSSÃO

Os dados apresentados demonstram que houve um efeito do extrato hidroalcoólico de *D. ambrosioides* *in vitro* contra *S. mansoni* e a análise *in sílico* revelou que um constituinte majoritário do extrato, o kaempferol, pode ter como alvo a proteína *venus kinase receptor 2* na no parasito *S. mansoni*, o que pode estar associado aos efeitos do extrato na inibição da oviposição e na sobrevivência do parasito.

Os ensaios *in vitro* evidenciaram que o tratamento com EHDA leva a morte dos vermes adultos em todas as concentrações avaliadas antes das 72 horas. Da mesma forma, foi verificado por Rodrigues et al. (2020) ao avaliarem atividade *in vitro* do extrato de *D. ambrosioides* contra vermes adultos de *S. mansoni* com concentrações mais elevadas. No estudo de Rodrigues et al. (2020) é apontado que a ação rápida do extrato sobre os vermes ocorre devido aos constituintes majoritários presentes em *D. ambrosioides*, como quercetina e kaempferol, que interagem induzindo mudanças imunomoduladoras e neurológicas no parasito (SANGSTER et al., 2005; MARKS; MAULE, 2010; TAMAN; RIBEIRO, 2011) e inibindo a síntese de compostos essenciais para a sobrevivência de *S. mansoni*. Soares et al. (2017), mostraram efeitos semelhantes usando uma formulação de óleo essencial das folhas de *D. ambrosioides*.

É provável que a mortalidade encontrada nesse estudo pode estar associada a danos tegumentares nos vermes. Embora essa avaliação não tenha sido realizada, estudos experimentais

demonstram, que produtos à base de espécies vegetais são capazes de causar alterações nos vermes adultos de *S. mansoni* quanto ao acasalamento, motilidade, tempo de sobrevivência e ocasionar mudanças tegumentares, sendo os efeitos observados, dependentes da concentração dos extratos (YONES et al., 2016; KAMEL; EL-SHINNAWY, 2015; ALY et al., 2017; OLIVEIRA et al., 2017; JATSA et al., 2016). No que diz respeito à motilidade e sobrevivência, uma redução nos movimentos dos parasitos é relatada em virtude de tratamentos com compostos vegetais, o que acaba por interferir na taxa de sobrevivência de vermes adultos de *S. mansoni* (ALY et al., 2017; OLIVEIRA et al., 2017; JATSA et al., 2016; RODRIGUES et al., 2020). Yones et al. (2016) e Oliveira et al. (2017) constataram que os extratos de espécies vegetais podem levar à morte de 100% dos parasitos em poucas horas (de 2 a 4h). Rodrigues et al. (2020) evidenciaram que vermes adultos de *S. mansoni* podem vir a morte em poucas horas após o início do contato com o extrato de *D. ambrosioides*, do mesmo modo que foi identificado neste estudo. As consequências de extratos vegetais avaliados em terapia da esquistossomose também podem ser constatadas nos estudos de Allam (2009), Miranda et al. (2013) e Almeer et al. (2018), que revelaram modificações morfológicas e ultraestruturais no parasito *S. mansoni*, ocorrendo reduções simultâneas na carga de vermes e na carga de ovos no fígado e tecidos intestinais de camundongos tratados com extratos de produtos naturais, bem como no aumento das porcentagens de ovos mortos.

Nossos dados, apontaram que o extrato de *D. ambrosioides* afeta a oviposição de fêmeas de *S. mansoni*, sendo a primeira demonstração feita com essa espécie vegetal, e essa inibição da oviposição é muito importante, pois a patologia da esquistossomose está relacionada aos ovos do parasito que ficam retidos nos tecidos (SCHWARTZ; FALLON, 2018). É sabido que pode haver uma influência de espécies vegetais no acasalamento natural de *S. mansoni*, causando separação dos casais de vermes (KAMEL; EL-SHINNAWY, 2015; YONES et al., 2016). Por exemplo, no estudo de Yones et al. (2016) quase 95% dos casais foram separados nas primeiras 2 horas com o uso de 500µg/mL de extrato de casca de romã comestível, enquanto o grupo controle negativo demonstrou separação dos casais quase 10 horas após a incubação. Apesar disso, é importante destacar que a fêmea mesmo separada do macho continua sendo capaz de ovipor *in vitro*, pois ela possui espermateca que guarda os espermatozoides do macho. Portanto, a separação observada no estudo de Yones et al. (2016), pode ter sido apenas um sinal de que o ambiente onde o parasito se encontrava não estava adequado para o acasalamento.

Para melhor compreender o mecanismo associado com a mortalidade e redução de oviposição dos vermes em nossos ensaios *in vitro*, foi realizada a análise *in silico* permitiu constatar que o kaempferol presente no EHDA apresenta atividades biológicas que podem ser

novidades na produção de um medicamento. Esse dado é importante, visto que o tratamento atual da esquistossomose não é capaz de curar 100% dos indivíduos infectados e tratados em comunidades de alto risco, além da possibilidade do surgimento de linhagens resistentes ao *Schistosoma* (DOENHOFF; PICA-MATTOCCIA, 2006; MELMAN et al., 2009). Nesse contexto, é imperativo intensificar a ênfase na identificação de potenciais alvos e compostos, uma vez que a compreensão da estrutura e função dos constituintes majoritários e proteínas alvos em modelos experimentais potencializa ainda mais a aplicação dessas informações no contexto do desenvolvimento de agentes farmacêuticos.

O estudo de docagem molecular revelou como alvo de kaempferol, a proteína *venus kinase receptor 2*. As proteínas quinases representam moléculas bem caracterizadas no contexto da sinalização celular, desempenhando um papel crucial na ativação celular por meio da fosforilação de resíduos de serina, treonina e/ou tirosina, utilizando o trifosfato de adenosina (ATP) como fonte de fosfato, para a ativação de diversas proteínas (MANNING et al., 2002). Nos de vermes *S. mansoni*, eventos de fosforilação desempenham um papel vital em sua biologia, e modificações nos níveis de fosforilação têm o potencial crítico de afetar as funções das proteínas, comprometendo significativamente a capacidade de sobrevivência dos parasitos (CHIENWICHAH et al., 2020).

O estudo conduzido por Grevelding et al. (2018) evidenciou que aproximadamente 2% dos proteomas previstos para *S. mansoni* compreendem proteínas quinases, algumas das quais foram identificadas como essenciais para a biologia do parasito (ZHAO et al., 2017; AVELAR et al., 2019; TAVARES et al., 2020; WANG et al., 2020). Adicionalmente, várias proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPKs) foram atribuídas a papéis fundamentais em *S. mansoni*, entre elas, a quinase c-Jun N-terminal (SmJNK) destaca-se como um regulador chave da maturação e sobrevivência do esquistossomo. A inativação da proteína resultou em um aumento significativo na mortalidade de *S. mansoni*, com vermes adultos recuperados apresentando alterações morfológicas consideráveis, especialmente no tegumento (ANDRADE et al., 2014). A mesma estratégia foi empregada para a inativação de Smp38 por meio de RNAi, o que provocou alterações na sobrevivência e desenvolvimento de *S. mansoni*, resultando em uma menor produção de ovos, danos no tegumento de vermes adultos e ovários não desenvolvidos (AVELAR et al., 2019). Além disso, a análise transcricional *post-knockout* de Smp38 revelou que essa quinase desempenha um papel crucial na regulação de processos de sinalização essenciais para o parasito, incluindo homeostase e defesas antioxidantes (AVELAR et al., 2019). O RNAi direcionado a SmFES demonstrou sua participação vital na sobrevivência e reprodução de *S. mansoni*, influenciando eventos como o emparelhamento do verme adulto,

maturação do verme fêmea e redução significativa na formação de granulomas (TAVARES et al., 2020).

A partir os dados, é perceptível que as proteínas quinases devem ser consideradas como potenciais alvos para o desenvolvimento de drogas para a esquistossomose, pela medicina e por ponto de vista químico, já que tem demonstrado resultados relevantes contra *S. mansoni*, além de um número crescente de inibidores de proteínas ter sido desenvolvido e aprovado para o tratamento de doenças humanas (BOYLE; KOLESKE, 2007).

Após confirmarmos os efeitos esquistossomicidas *in vitro* e o potencial alvo de interação do kaempferol (composto majoritário do EHDA) com proteínas do parasito, foi realizada a investigação dos granulomas de *S. mansoni*. Notadamente os granulomas hepáticos e intestinais, em animais submetidos ao tratamento com EHDA, demonstraram uma organização mais pronunciada durante a fase aguda da infecção por *S. mansoni*, em comparação com os granulomas de camundongos infectados e não tratados. Essa diferença pode ser atribuída, ao menos em parte, ao potencial efeito modulatório induzido pelo extrato vegetal. A avaliação morfológica das lesões granulomatosas também revelou uma deposição mais organizada de colágeno nos granulomas de animais tratados com EHDA, evidenciada pela presença de fibras colágenas dispostas de maneira concêntrica, especialmente durante a última fase do desenvolvimento do parasito, quando os vermes estão maduros. Além disso, as avaliações do nosso grupo de pesquisa realizadas em camundongos tratados com EHDA, também demonstram que o extrato vegetal causa benefícios histopatológicos e parasitológicos, manifestados pela redução no número de ovos eliminados nas fezes ou retidos no tecido hepático (RODRIGUES et al., 2020). Parte desses benefícios está associada a capacidade do extrato em afetar a sobrevivência dos vermes adultos, como foi constatado no ensaio *in vitro*.

De acordo com Lenzi et al. (1999), o arranjo tridimensional das fibras dos granulomas serve para fornecer maior integridade dos tecidos, distribuição eficiente de compostos solúveis (fatores de crescimento e citocinas) e um fundo haptotático para as células. A organização e distribuição da rede de colágeno no granuloma esquistossomótico, mesmo em seu padrão inicial, com aspecto de malha, parece ser preferencialmente orientada em direção às células secretoras internas, como fibroblastos e/ou miofibroblastos, visando reter no lugar os tecidos que cercam a nova estrutura organoide. Portanto, a curvatura ou os ângulos entre as fibras de colágeno provavelmente dependem da organização dos fibroblastos ou dos miofibroblastos. Esse dado sugere que houve uma organização diferenciada dos fibroblastos ou miofibroblastos nos granulomas encontrados em tecidos hepático e intestinal de animais tratados com EHDA, o que pode melhorar sintomas e sequelas no contexto clínico da infecção.

Apesar dos animais tratados com EHDA nas últimas fases do desenvolvimento de *S. mansoni*, terem apresentado granulomas mais concêntricos, a literatura afirma que independentemente do órgão ou local onde os granulomas estão localizados, eles sempre tendem a ser esféricos, provavelmente pelo fato desse formato ser um processo de minimização de energia, pois esta é a forma em que forças opostas puxam igualmente de todas as direções e estão em equilíbrio (LENZI et al., 1999). A estrutura frouxa e instável do estágio exsudativo-produtivo se transforma ao longo dos dias em uma arquitetura altamente compacta e estável, pela ativação de diferentes genes envolvidos na maturação e na volumetria do granuloma (LENZI et al., 1999).

Para uma caracterização mais aprofundada do conteúdo de colágeno dos granulomas, empregou-se uma coloração específica que confirmou a predominância do colágeno tipo I nos granulomas de camundongos na fase aguda da esquistossomose. No geral, é sabido que a arquitetura do tecido do granuloma de *S. mansoni*, apresenta fibras de matriz extracelular (MEC) que são inicialmente dispostas em um padrão de malha, evoluindo para um arranjo final concêntrico e compacto. Esses dois padrões de arranjo possuem colágeno tipo III contendo fibras reticulares que, posteriormente, é substituído por colágeno tipo I contendo fibras de colágeno (JUNQUEIRA et al., 1986).

O tratamento com EHDA não alterou o tipo de colágeno na fase aguda, quando comparado ao grupo infectado e sem tratamento. Por outro lado, observações de Mata-Santos et al. (2014) indicaram que em animais infectados por *S. mansoni* e tratados com silimarina, houve redução na proliferação de células de fibroblastos e na produção de IL-13, impactando também a produção de colágeno do tipo I, em contraposição aos resultados obtidos em nosso estudo.

O colágeno, uma proteína fibrilar abundante, desempenha um papel crucial no processo de cicatrização relacionado a lesão granulomatosa e influencia a formação e a qualidade da matriz extracelular (MEC), a fim de garantir a integridade do tecido, que é essencial para a homeostase do organismo (SHENOY et al., 2022). A síntese de colágeno é mediada por fibroblastos e miofibroblastos, e proporciona a base estrutural para a matriz extracelular, favorecendo a regulação da migração celular, proliferação e diferenciação durante a reparação tecidual (REVELL et al., 2021; SHENOY et al., 2022). A degradação controlada do colágeno, sob a influência de metaloproteinases e outras enzimas, é crucial para a remodelação tecidual e a regulação precisa desse equilíbrio proteolítico é fundamental para evitar complicações, como cicatrizes hipertróficas ou contraturas (CABRAL-PACHECO et al., 2020).

Em nosso estudo, foi observado que o EHDA promove a deposição de colágeno e proliferação fibroblástica nos animais tratados. No entanto, ao avaliar outros parâmetros como lesão tecidual, extensão do infiltrado celular e necrose, por exemplo, foi notável uma menor intensidade de inflamação ativa nos animais tratados com EHDA quando comparados com os infectados e sem tratamento. Esse efeito demonstra que *D. ambrosioides* promove uma cicatrização eficiente e sugere concomitantemente uma redução nos processos fibrogênicos. Estudos científicos têm demonstrado que o extrato de *D. ambrosioides* pode estimular a produção de colágeno, o que pode contribuir para a cicatrização de feridas (SILVA et al., 2013; PINHEIRO et al., 2005). O extrato de *D. ambrosioides* foi aplicado em feridas cutâneas em camundongos, sendo demonstrado um aumento na produção de colágeno e aceleração do processo de cicatrização (SILVA et al., 2013). O colágeno é essencial para a formação de uma cicatriz, pois ele fornece a estrutura e a força necessárias para a cicatrização da ferida; portanto, o extrato de *D. ambrosioides*, ao estimular a produção de colágeno, pode acelerar o processo de cicatrização e melhorar a qualidade da cicatriz (SILVA et al., 2013). Além disso, no caso da esquistossomose, o maior depósito de colágeno pode também estar associado a modulação da infecção pela maior liberação de IL-10 nos animais tratados com *D. ambrosioides*, conforme demonstrado por Rodrigues et al. (2020). Nesse contexto, o extrato de *D. ambrosioides* pode ser uma alternativa natural para o tratamento de lesões, incluindo a lesão granulomatosa.

O mecanismo de cicatrização envolve a modulação da resposta imune e a ativação de macrófagos (MATHEW-STEINER et al., 2021). O padrão de resposta Th2, por exemplo, favorece a ativação de fibroblastos, produção de colágeno e fibrogênese (SIME; O'REILLY, 2001). O colágeno exerce uma influência significativa na resposta inflamatória, modulando a liberação de citocinas e fatores de crescimento, além de participar na angiogênese, que contribui para a provisão vascular necessária ao processo de reparação. A produção de colágeno está associada à produção de TGF- β pelos fibroblastos, algumas células endoteliais, macrófagos e células T (MESCHER; NEFF, 2005). O efeito de *D. ambrosioides* em reduzir o processo inflamatório, observado neste estudo, deve estar associado à sua capacidade imunomoduladora, estimulando a resposta imune para a via Th2. Cruz et al. (2007) verificou efeito imunoestimulante do *D. ambrosioides* decorrente da ativação de macrófagos e do recrutamento de células pelos órgãos linfoides secundários, como baço e linfonodos. *D. ambrosioides* demonstrou efeito imunomodulador na infecção por *S. mansoni* ao modular citocinas (redução de IFN- γ , TNF- α , IL-4, IL-17 e aumento de IL-10), IgE e células (neutrófilos, eosinófilos e monócitos) (RODRIGUES et al., 2020). Dessa forma, as evidências indicam que o tratamento com *D. ambrosioides* pode induzir uma melhor modulação dos granulomas e devido a isso

EHDA se torna um candidato potencial para se constituir em alternativa terapêutica futura para esquistossomose. Pois, é sabido que a desorganização e a modulação inadequada dos granulomas podem influenciar na morbidade da esquistossomose. Esses achados ressaltam o papel essencial do tratamento com EHDA no modelo esquistossomótico, interferindo na modulação da resposta imune do tipo Th2 e na composição celular dos granulomas hepáticos, intestinais e pulmonares, embora o mecanismo exato de sua atuação não esteja completamente elucidado.

EHDA foi capaz de reduzir o número total e as áreas dos granulomas hepáticos, intestinais e pulmonares. Outros produtos naturais usados no tratamento da esquistossomose revelaram melhoras nos tamanhos e quantidades de granulomas, promovendo redução, juntamente com a diminuição da fibrose tecidual, como relatado por Allam (2009) ao avaliarem a atividade de *Curcumin longa*; Almeer et al. (2018) com *Ziziphus spina-christi* e El-Refai et al. (2019) com *Callistemon citrinus*. No entanto, provavelmente essas ações positivas de compostos usados no tratamento da esquistossomose também estão associadas a uma série de fatores imunológicos que permeiam a resposta imune do hospedeiro, tanto que Rodrigues et al. (2020) demonstraram que o EHDA modula a infecção e reduz os níveis de citocinas, como a IL-4, que está envolvida no processo de formação de granuloma.

Rodrigues et al. (2020) associaram as melhorias no tecido hepático, representada pela redução no diâmetro dos granulomas, dos animais infectados e tratados com o extrato de *D. ambrosioides* aos efeitos hepatoprotetores e anti-inflamatórios do extrato da espécie vegetal, que são proporcionados pela presença de derivados da quercetina e kaempferol. Portanto, uma vez já comprovado que EHDA tem efeitos anti-inflamatórios e promoveu um aumento na IL-10 na fase aguda da infecção, foi possível sugerir que modulou favoravelmente a resposta imune granulomatosa, reduzindo os danos aos tecidos de animais infectados.

Dessa maneira, observa-se que o extrato hidroalcólico de *D. ambrosioides* pode ser uma estratégia importante para o tratamento da esquistossomose, que pode minimizar os danos colaterais nos tecidos e promover a sobrevivência do hospedeiro a longo prazo, pelas suas características anti-inflamatória, cicatrizante e imunomoduladora que permeiam a principal manifestação patológica da doença, que se caracteriza pela formação de granulomas. No mais, estudos adicionais são necessários, que incluam a avaliação de constituintes majoritários isolados do extrato, cujo resultados podem ser ainda mais promissores na terapia da doença.

5 CONCLUSÕES

Os dados demonstram que EHDA pode atuar diretamente no parasito, reduzindo a sobrevivência e a oviposição, em consequência gera uma redução na carga parasitária e melhorias nas características histopatológicas do hospedeiro infectado. O constituinte kaempferol tem como alvo a proteína *venus kinase receptor 2*, que pode atuar na inibição da oviposição de *S. mansoni* e colaborar para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas.

A análise histopatológica do fígado, intestino e pulmão, revelou que os granulomas dos animais tratados são mais organizados, com depósito de colágeno concêntrico e com predomínio de fibras do tipo I, depositadas de maneira organizada ao redor da resposta granulomatosa. A morfometria dos tecidos hepáticos, intestinais e pulmonares permitiu verificar a eficácia de EHDA para a redução do número e área de granulomas nos tecidos, sendo um dado importante por indicar o papel do extrato para a redução da gravidade da doença.

REFERÊNCIAS

- AIRES AL, XIMENES ECPAZ, BARBOS VX, GOES AJS, SOUZA VNO, ALBUQUERQUE MCPA. β -Lapachone: a naphthoquinone with promising antischistosomal properties in mice. *Phytomedicine*, 2 (3): 261–267; 2014 <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2013.08.012>.
- ALLAM G. Immunomodulatory effects of curcumin treatment on murine schistosomiasis mansoni. *Immunobiology*, 214: 712-27; 2009. <http://doi.org/10.1016/j.imbio.2008.11.017>.
- ALMEER RS, EL-KHADRAGY MF, ABDELHABIB S, MONEIM AEA. *Ziziphus spinachristi* leaf extract ameliorates schistosomiasis liver granuloma, fibrosis, and oxidative stress through downregulation of fibrinogenic signaling in mice. *PLoS One*, 13: e0204923; 2018. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0204923>.
- ALVES RRS, MENDES RODRIGUES JG, TELES-REIS A, ARAÚJO NOGUEIRA R, CORREIA LIMA LICÁ I, SAMPAIO LIRA MG, DA SILVA ALVES R, SILVA-SOUZA N, AGUIAR DOS SANTOS ANDRADE TJ, SILVA MIRANDA G. Antiparasitic effects of ethanolic extracts of *Piper arboreum* and *Jatropha gossypifolia* leaves on cercariae and adult worms of *Schistosoma mansoni*. *Parasitology*, 147: 1689-1699; 2020. <http://doi.org/10.1017/S003118202000181X>.
- ALY I, TAHER EE, EL-SAYED H, MOHAMMED FA, ELNAIN G, HAMAD RS, BAYOUMY EM. Efficacy of soluble glycoprotein fraction from *Allium sativum* purified by size exclusion chromatography on murine *schistosomiasis mansoni*. *Microbial Pathogenesis*, 17: 30128-6; 2017. <http://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.03.039>.
- ANDRADE LF, DE MOURÃO MM, GERALDO JA, COELHO FS, SILVA LL, NEVES RH, VOLPINI A, MACHADO-SILVA JR, ARAUJO N, NACIF-PIMENTA R, CAFFREY CR, OLIVEIRA G. Regulation of *Schistosoma Mansoni* Development and Reproduction by the

Mitogen-Activated Protein Kinase Signaling Pathway. *PloS Negl. Trop. Dis.* 8: e3081; 2014 doi: 10.1371/journal.pntd.0002949.

ARAÚJO-JORGE TC, CASTRO SL. orgs. Doença de chagas: manual para experimentação animal [online]. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ. Antropologia e Saúde collection, 2000; p. 368.

AVELAR L, DAS GA, GAVA SG, NEVES RH, SOARES SILVA MC, ARAÚJO N, TAVARES NC, EL KHAL A, MATTOS ACA, MACHADO-SILVA JR, OLIVEIRA G, MOURÃO MM. Smp38 MAP Kinase Regulation in *Schistosoma Mansoni*: Roles in Survival, Oviposition, and Protection Against Oxidative Stress. *Front. Immunol.* 10; 2019. doi: 10.3389/fimmu.2019.00021.

BARRON L, WYNN TA. Fibrosis is regulated by Th2 and Th17 responses and by dynamic interactions between fibroblasts and macrophages. *American Journal of Physiology Gastrointestinal and Liver Physiology*, 300 (5): 723-728; 2011.

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

BOYLE SN, KOLESKE AJ. Dissecting kinase signaling pathways. *Drug Discov Today*, 12: 717-724; 2017.

CABRAL-PACHECO GA, GARZA-VELOZ I, CASTRUITA-DE LA ROSA C, RAMIREZ-ACUÑA JM, PEREZ-ROMERO BA, GUERRERO-RODRIGUEZ JF, MARTINEZ-AVILA N, MARTINEZ-FIERRO ML. The Roles of Matrix Metalloproteinases and Their Inhibitors in Human Diseases. *Int J Mol Sci.* 20;21(24): 9739; 2020. <https://doi.org/10.3390/ijms21249739>.

CADMAN ET, THYSSE KA, BEARDER S, CHEUNG AYN, JOHNSTON AC, LEE JJ, LAWRENCE RA, NUTMAN TB. Eosinophils are important for protection, immunoregulation and pathology during infection with nematode microfilariae. *PLOS Pathogens*, 10 (3): e1003988; 2014. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003988>.

CHIENWICHAI P, AMPAWONG S, ADISAKWATTANA P, THIANGTRONGJIT T, LIMPANONT Y, CHUSONGSANG P, CHUSONGSANG Y, REAMTONG O. Effect of Praziquantel on *Schistosoma Mekongi* Proteome and Phosphoproteome. *Pathogens*, 9: 417; 2020. Doi: 10.3390/pathogens9060417.

CHUAH C, JONES MK, BURKE ML, MCMANUS DP, GOBERT GN. Cellular and chemokine-mediated regulation in schistosome-induced hepatic pathology. *Trends in Parasitology* 30 (3): 141–150; 2014. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2013.12.009>.

COLLEY DG, BUSTINDUY AL, SECOR WE, KING CH. Human schistosomiasis. *The Lancet*, 383 (9936): 2253–2264; 2014.

CRUZ GV, PEREIRA PV, PATRÍCIO FJ, COSTA GC, SOUSA SM, FRAZÃO JB, ARAGÃO-FILHO WC, MACIEL MC, SILVA LA, AMARAL FM, BARROQUEIRO ES, GUERRA RN, NASCIMENTO FR. Increase of cellular recruitment, phagocytosis ability and nitric oxide production induced by hydroalcoholic extract from *Chenopodium ambrosioides* leaves. *Journal of Ethnopharmacology*, 111:148–154; 2007.

CYSNE DN, FORTES TS, REIS AS, PAULO RIBEIRO B, SANTOS FERREIRA A, AMARAL FM, GUERRA RN, MARINHO CR, NICOLETE R, NASCIMENTO FR. Antimalarial potential of leaves of *Chenopodium ambrosioides* L. Parasitology Research, 115 (11): 4327-4334; 2016.

DALAL V, KUMAR P, RAKHAMINOV G, QAMAR A, FAN X, HUNTER H, TOMAR S, GOLEMI-KOTRA D, KUMAR P. Repurposing an ancient protein core structure: Structural studies on FmtA, a novel esterase of *Staphylococcus aureus*. J. Mol. Biol., 431 (17): 3107–3123; 2019. doi:10.1016/j.jmb. 2019.06.019.

DALLAKYAN S, OLSON AJ. Small-molecule library screening by docking with PyRx. Chem. Biol. methods Protoc., 1263: 243–250; 2015. doi:10.1007/978- 1-4939-2269-7_19

DOENHOFF MJ, HAGAN P, CIOLI D, SOUTHGATE V, PICA-MATTOCCIA L, BOTROS S, COLES G, TCHUEM TCHUENTÉ LA, MBAYE A, ENGELS D. Praziquantel: its use in control of schistosomiasis in sub-Saharan Africa and current research needs. Parasitology, 136: 1825-1835; 2009.

EL-REFAI AS, ATIA AF, MAHMOUD SF. Effects of *Callistemon citrinus* aqueous extract on prepatent and patent infections with *Schistosoma mansoni* in experimentally infected mice. Journal of Helminthology, 93: 424-433; 2019. <http://doi.org/10.1017/S0022149X1800041X>.

GERKEN SE. Efeitos da alimentação e da densidade populacional sobre o crescimento, a sobrevivência e a fecundidade de *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818). Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1977.

GREVELDING CG, LANGNER S, DISSOUS C. Kinases: Molecular Stage Directors for Schistosome Development and Differentiation. Trends Parasitol., 34: 246–260; 2018. doi: 10.1016/j.pt.2017.12.001.

GROSDIDIER A, ZOETE V, MICHELIN O. SwissDock, a protein-small molecule docking web service based on EADock DSS. Nucleic acids Res., 39 (2): W270–W277; 2011. doi:10.1093/nar/gkr366.

HAMS E, AVIELLO G, FALLON PG. The *Schistosoma* granuloma: friend or foe?. Frontiers in Immunology, 4 (89): 1-8; 2013.

HESSE M, MODOLELL M, LAFLAMME AC, SCHITO M, FUENTES JM, CHEEVER AW, PEARCE EJ, WYNN TA. Differential regulation of nitric oxide synthase-2 and arginase-1 by Type1/type2 cytokines *in vivo*: granulomatous pathology is shaped by the pattern of L-arginine metabolism. Journal Immunology, 167: 6533-6544; 2001.

HORIUCHI A, SATOU T, AKAO N, KOIKE K, FUJITA K, NIKAIDO T. The effect of free and polyethylene glycoliposome-entrapped albendazole on larval mobility and number in *Toxocara canis* infected mice. Veterinary Parasitology, 129: 83–87; 2005.

HUANG YH, SHI MN, ZHENG WD, ZHANG LJ, CHEN ZX, WANG XZ. Therapeutic effect of interleukin-10 on CCl4-induced hepatic fibrosis in rats. World Journal of Gastroenterology, 12: 1386-1391; 2006. <http://doi.org/10.3748/wjg.v12.i9.1386>.

JATSA HB, FEUSSOM NG, NKONDO ET, KENFACK CM, SIMO DN, FASSI JBK, FEMOE UM, MOABOULOU C, TSAGUE CD, DONGO E, KAMTCHOUING P, TCHUEM

TCHUENTE LA. Efficacy of *Ozoroa pulcherrima* Schweinf methanolic extract against *Schistosoma mansoni*-induced liver injury in mice. J Trad Complement Med 2018; 9: 304-311. <http://doi.org/10.1016/j.jtcme.2017.08.009>.

JATSA HB, RUSSO RC, PEREIRA CA, AGUILAR EC, GARCIA CC, ARAÚJO ES, OLIVEIRA JL, RODRIGUES VF, DE OLIVEIRA VG, ALVAREZ-LEITE JI, BRAGA FC, TCHUEM TCHUENTE LA, KAMTCHOUING P, NEGRÃO-CORRÊA DA, TEIXEIRA MM. Improvement of the liver pathology by the aqueous extract and the *n*-butanol fraction of *Sida pilosa* Retz in *Schistosoma mansoni*-infected mice. Journal Ethnopharmacology, 180: 114-23; 2016. <http://doi.org/10.1016/j.jep.2016.01.017>.

JUNQUEIRA LCU, BIGNOLAS G, BRETANI R. Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue section. Histochem J, 11: 447-455; 1979.

JUNQUEIRA LCU, MONTES GS, TOLEDO OMS, JOAZEIRO PP. Morphological, histochemical and biochemical observations on the connective tissue matrix of *in situ* and isolated hepatic granulomas in experimental murine schistosomiasis. Annals of Tropical Medicine and Parasitology, 80: 27-41; 1986.

KAMEL EG, EL-EMAM MA, MAHMOUD SSM, FOUDA FM, BAYAUMY FE. Parasitological and biochemical parameters in *Schistosoma mansoni*-infected mice treated with methanol extract from the plants *Chenopodium ambrosioides*, *Conyza dioscorides* and *Sesbania sesban*. Parasitology International, 60: 388-392; 2011. <http://doi.org/10.1016/j.parint.2011.06.016>.

KAMEL ROA, EL-SHINNAWY NA. Immunomodulatory effect of garlic oil extract on *Schistosoma mansoni* infected mice. Asian Pacific Journal of Tropical Medicine, 8: 999-1005; 2015. <http://doi.org/10.1016/j.apjtm.2015.11.016>.

KESARI P, PRATAP S, DHANKHAR P, DALAL V, MISHRA M, SINGH PK, CHAUHAN H, KUMAR P. Structural characterization and *in-silico* analysis of *Momordica charantia* 7S globulin for stability and ACE inhibition. Scientific Reports, 10(1): 1-13; 2020. [doi:10.1038/s41598-020-58138-9](https://doi.org/10.1038/s41598-020-58138-9).

KUMARI R, DHANKHAR P, DALAL V. Structure-based mimicking of hydroxylated biphenyl congeners (OHPCBs) for human transthyretin, an important enzyme of thyroid hormone system. Journal of Molecular Graphics and Modelling, 105: 107870; 2021. [doi:10.1016/j.jmgm.2021.107870](https://doi.org/10.1016/j.jmgm.2021.107870).

LENZI HL, KIMMEL E, SCHECHTMAN H, PELAJO-MACHADO M, VALE BS, PANASCO MS, LENZI JÁ. Collagen arrangement in hepatic granuloma in mice infected with *Schistosoma mansoni*: dependence on fiber radiation centers. Brazilian Journal of Medical and Biological Research, 32: 639-643; 1999.

LEVI-SCHAFFER F, GARBUZENKO E, RUBIN A, REICH R, PICKHOLTZ D, GILLERY. Human eosinophils regulate human lung and skin derived fibroblast properties in vitro: a role for transforming growth factor beta (TGF-beta). Proc Natl Acad Sci U.S.A, 96(17): 9660-9665; 1999.

LIPINSKI CA, LOMBARDO F, DOMINY BW, FEENEY PJ. Experimental and Computational Approaches to Estimate Solubility and Permeability in Drug Discovery and Development Settings. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 46: 3–26; 2001.

LUNA LG. Manual of the histologic staining methods of the armed forces institute of pathology. 3. ed. New York: McGraw Hill, 1968; p. 258.

MACIEL MCG, FIALHO EMS, GUERRA RNM, BORGES VM, KWASNIEWSKI FH, NASCIMENTO FRF. Tityus serrulatus scorpion venom improves survival and lung inflammation in lethal sepsis induced by CLP in mice. *Toxicon*, 89: 1–8; 2014. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2014.06.018>.

MALEK EA. Snail Hosts of Schistomiasis and other Snail Transmitted Diseases in Tropical América. In: BARBOSA, F. S. Tópicos de Malacologia Médica. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 1985; p. 300-310.

MALIK AA, MARTINY JBH, BRODIE EL, MARTINY AC, TRESEDER KK, ALLISON SD. Defining trait-based microbial strategies with consequences for soil carbon cycling under climate change. *The ISME Journal* (2020) 14:1–9 <https://doi.org/10.1038/s41396-019-0510-0>.

MANNING G, WHYTE DB, MARTINEZ R, HUNTER T, SUDARSANAM S. The Protein Kinase Complement of the Human Genome. *Science*, 298 (5600): 1912–1934; 2002. <https://doi.org/10.1126/science.1075762>.

MARKS NJ, MAULE AG. Neuropeptides in helminths: occurrence and distribution. *Advances Experimental Medicine Biology*, 692: 49-77; 2010.

MATA-SANTOS HA, DUTRA FF, ROCHA CC, LINO FG, XAVIER FR, CHINALIA LA, HOSSY BH, CASTELO-BRANCO MT, TEODORO AJ, PAIVA CN, DOS SANTOS PYRRHO A. Silymarin reduces profibrogenic cytokines and reverses hepatic fibrosis in chronic murine schistosomiasis. *Antimicrob Agents Chemother*, 58(4): 2076-83; 2014.

MATHEW-STEINER SS, ROY S, SEN CK. Collagen in Wound Healing. *Bioengineering (Basel)*, 11;8(5): 63; 2021. <https://doi.org/10.3390/bioengineering8050063>.

MCMANUS DP, DUNNE DW, SACKO M, UTZINGER J, VENNERVALD BJ, ZHOU XN. Schistosomiasis. *Nature Reviews Disease Primers*, 4: 1–19; 2018. <http://doi.org/10.1038/s41572-018-0013-8>.

MELMAN SD, STEINAUER ML, CUNNINGHAM C, KUBATKO LS, MWANGI IN, WYNN NB, MUTUKU MW, KARANJA DM, COLLEY DG, BLACK CL, SECOR WE, MKOJI GM, LOKER ES. Reduced susceptibility to praziquantel among naturally occurring Kenyan isolates of *Schistosoma mansoni*. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 3: e504; 2009.

MENDONÇA AMB, FEITOSA APS, VERAS DL, MATOS-ROCHA TJ, CAVALCANTI MG, BARBOSA CCG, BRAYNER FA, ALVES LC. The susceptibility of recent isolates of *Schistosoma mansoni* to praziquantel. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 58, 1-6; 2016. <https://doi.org/10.1590/S1678-9946201658007>.

MENDONÇA MAS, DE ANDRADE MONTEIRO C, MORAES-NETO RN, MONTEIRO AS, MONDEGO-OLIVEIRA R, NASCIMENTO CEC, DA SILVA LCN, LIMA-NETO LG, CARVALHO RC, DE SOUSA EM. Ethyl Acetate Fraction of *Punica Granatum* and Its

Galloyl-HHDP Glucose Compound, Alone or in Combination with Fluconazole, Have Antifungal and Antivirulence Properties against *Candida* Spp. *Antibiotics*, 11: 265; 2022.

MESCHER; NEFF, 2005. Regenerative capacity and the developing immune system. *Adv Biochem Eng Biotechnol.* 93: 39-66; 2005. <https://doi.org/10.1007/b99966>.

MIRANDA MA, KUEHN CC, CARDOSO JF, OLIVEIRA LG, MAGALHÃES LG, TIOSSI RF, RODRIGUES V, ZUCOLLOTO S, PRADO JCJR, MCCHESENEY JD, BASTOS JK. Immunomodulatory effect of the alkaloidic extract of *Solanum lycocarpum* fruits in mice infected with *Schistosoma mansoni*. *Experimental Parasitology*, 133: 396-402; 2013. <http://doi.org/10.1016/j.exppara.2012.12.012>.

MOLGAARD P, NIELSEN SB, RASMUSSEN DE, DRUMOND RB, MAKAZA N, ANDREASSEN J. Anthelmintic screening of Zimbabwean plants traditionally used against schistosomiasis. *Journal of Ethnopharmacology*, 74: 257-264; 2001.

MUTAPI F, MAIZELS R, FENWICK A, WOOLHOUSE M. Human schistosomiasis in the post mass drug administration era. *The Lancet Infectious Diseases*, 17 (2): e42-e47; 2017.

NASCIMENTO GL, OLIVEIRA MR. Severe forms of schistosomiasis mansoni: epidemiologic and economic impact in Brazil, 2010. *Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 108 (1): 29-36; 2014.

NASCIMENTO KAF. *Chenopodium ambrosioides* L.: do uso popular ao bioproduto com atividade cicatrizante. Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Maranhão, Programa de Pós-Graduação Renorbio – Doutorado em Biotecnologia 2014; 119 f.

NEGRÃO-CORRÊA D, SOUZA DG, PINHO V, BARSANTE MM, SOUZA AL, TEIXEIRA MM. Platelet-activating factor receptor deficiency delays elimination of adult worms but reduces fecundity in *Strongyloides venezuelensis*-infected mice. *Infection and Immunity*, 72: 1135-1142; 2004.

NEIVA VA, RIBEIRO MNS, CARTÁGENES MSS, MORAES-COUTINHO DF, NASCIMENTO FRF, REIS AS, AMARAL FMM. Estudos pré-clínicos de atividade giardicida de *Chenopodium ambrosioides* L. e a padronização dos extratos na pesquisa e desenvolvimento de fitoterápicos. *Revista de Ciências da Saúde*, 13 (2): 155-165; 2011.

O'BOYLE NM, BANCK M, JAMES CA, MORLEY C, VANDERMEERSCH T, HUTCHISON GR. Open Babel: An open chemical toolbox. *Journal of Cheminformatics*, 3(1): 1-14; 2011.

OLIVEIRA CNF, FREZZA TF, GARCIA VL, FIGUEIRA GM, MENDES TMF, ALLEGRETTI SM. *Schistosoma mansoni*: In vivo evaluation of *Phyllanthus amarus* hexanic and ethanolic extracts. *Experimental Parasitology*, 183: 56-63; 2017. <http://doi.org/10.1016/j.exppara.2017.10.008>.

PAGÁN AJ, RAMAKRISHNAN L. The Formation and Function of Granulomas. *Annual Review of Immunology*, 36: 23.1-23.27; 2018. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032712-100022>.

PATRÍCIO FJ, COSTA GC, PEREIRA PV, ARAGÃO-FILHO WC, SOUSA SM, FRAZÃO JB, PEREIRA WS, MACIEL MC, SILVA LA, AMARAL FM, REBÊLO JM, GUERRA RN,

RIBEIRO MN, NASCIMENTO FR. Efficacy of the intralesional treatment with *Chenopodium ambrosioides* in the murine infection by *Leishmania amazonensis*. Journal of Ethnopharmacology, 115 (2): 313-319; 2008.

PELLEGRINO J, KATZ N. Experimental chemotherapy of schistosomiasis mansoni. Advances in Parasitology, 41: 233-290; 1968.

PEREIRA, W.S., RIBEIRO, B.P., SOUSA, A.I., SERRA, I.C., MATTAR, N.S., FORTES, T.S., REIS, A.S., SILVA, L.A., BARROQUEIRO, E.S., GUERRA, R.N., NASCIMENTO, F.R. Evaluation of the subchronic toxicity of oral treatment with *Chenopodium ambrosioides* in mice. Journal of Ethnopharmacology, 127 (3): 602–605; 2010. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2009.12.018>.

PINHEIRO RM, SILVA RM, SANTOS MA. Efeito do extrato de *Dysphania ambrosioides* L. (mastruz) no reparo ósseo em ratas osteoporóticas. Revista Eletrônica Acervo Odontológico, 2(2): 1-7; 2005.

RAMOS, R.S.; BORGES, R.S.; DE SOUZA, J.S.N.; ARAUJO, I.F.; CHAVES, M.H.; SANTOS, C.B.R. Identification of Potential Antiviral Inhibitors from Hydroxychloroquine and 1,2,4,5-Tetraoxanes Analogues and Investigation of the Mechanism of Action in SARS-CoV-2. International Journal of Molecular Sciences, 23: 1781; 2022.

REVELL CK, JENSEN OE, SHEARER T, LU Y, HOLMES DF, KADLER KE Collagen fibril assembly: New approaches to unanswered questions. Matrix Biology Plus. 12: 100079; 2021.

RODRIGUES JGM, ALBUQUERQUE PSV, NASCIMENTO JR, CAMPOS JAV, GODINHO ASS, ARAÚJO SJ, BRITO JM, JESUS CM, MIRANDA GS, REZENDE MC, NEGRÃO-CORRÊA DA, ROCHA CQ, SILVA LA, GUERRA RNM, NASCIMENTO FRF. The immunomodulatory activity of *Chenopodium ambrosioides* reduces the parasite burden and hepatic granulomatous inflammation in *Schistosoma mansoni*-infection. Journal of Ethnopharmacology, 264: 113287; 2020.

SAINI G, DALAL V, SAVITA BK, SHARMA N, KUMAR P, SHARMA AK. Molecular docking and dynamic approach to virtual screen inhibitors against Esbp of *Candidatus Liberibacter asiaticus*. Journal of Molecular Graphics and Modelling, 92: 329–340; 2019. doi:10.1016/j.jmgm.2019.08.012

SANGSTER NC, SONG J, DEMELER J. Resistance as a tool for discovering and understanding targets in parasite neuromusculature. Parasitology, 131: S179-S190; 2005.

SHAH K, IGNACIO A, MCCOY KD, HARRIS NL. The emerging roles of eosinophils in mucosal homeostasis. Mucosal Immunology, 13 (4): 574–583; 2020. <https://doi.org/10.1038/s41385-020-0281-y>.

SHENOY M, ABDUL NS, QAMAR Z, BAHRI BMA, AL GHALAYINI KZK, KAKTI A. Collagen Structure, Synthesis, and Its Applications: A Systematic Review. Cureus. 9;14(5): e24856; 2022. <https://doi.org/10.7759/cureus.24856>.

SHUKLA, A.; SHARMA, P.; PRAKASH, O.; SINGH, M.; KALANI, K.; KHAN, F.; BAWANKULE, D.U.; LUQMAN, S.; SRIVASTAVA, S.K. QSAR and Docking Studies on

Capsazepine Derivatives for Immunomodulatory and Anti-Inflammatory Activity. PLoS ONE 2014, 9, e100797.

SILVA GC, SILVA AMM, SILVA JS, SILVA JM. Efeito do extrato aquoso de *Dysphania ambrosioides* L. (mastruz) na cicatrização de feridas cutâneas abertas em ratos. ConScientiae Saúde, 12(1): 29-35; 2013.

SILVEIRA-LEMOES D, TEIXEIRA-CARVALHO A, MARTINS-FILHO OA, SOUZA-SOARES AL, CASTRO-SILVA P, COSTA-SILVA MF, GUIMARÃES PH, FERRAZ HB, OLIVEIRA-FRAGA LA, TEIXEIRA MM, CORRÊA-OLIVEIRA R. Seric chemokines and chemokine receptors in eosinophils during acute human schistosomiasis mansoni. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 105: 380-386; 2010.

SIME PJ, O'REILLY KMA. Fibrosis of the lung and other tissues: new concepts in pathogenesis and treatment. Clin Immunol, 99(3): 308-19; 2001. <https://doi.org/10.1006/clim.2001.5008>.

SINGH N, DALAL V, KUMAR P. Structure based mimicking of Phthalic acid esters (PAEs) and inhibition of hACMSD, an important enzyme of the tryptophan kynurenine metabolism pathway. International Journal of Biological Macromolecules, 108: 214-224; 2018. doi:10.1016/j.ijbiomac.2017.12.005

SMITHERS SR, TERRY RJ. The infection of laboratory hosts with cercariae of *Schistosoma mansoni* and the recovery of adult worm. Parasitology, 55 (4): 695-700; 1965.

SOARES MH, DIAS HJ, VIEIRA TM, SOUZA MGM, CRUZ AFF, BADOCCO FR, NICOLELLA HD, CUNHA WR, GROppo M, MARTINS CHG, TAVARES DC, MAGALHÃES LG, CROTTI AEM. Chemical Composition, Antibacterial, Schistosomicidal, and Cytotoxic Activities of the Essential Oil of *Dysphania ambrosioides* (L.) MOSYAKIN & CLEMANTS (Chenopodiaceae). Chemistry & Biodiversity, 14: 8; 2017. <http://doi.org/10.1002/cbdv.201700149>.

SOUZA FPC, VITORINO RR, COSTA AP, JÚNIOR FCF, SANTANA LA, GOMES AP. Esquistossomose mansônica: aspectos gerais, imunologia, patogênese e história natural. Revista da Sociedade Brasileira de Clínica Médica, 9 (4): 300-7; 2011.

STADECKER MJ, HERNANDEZ HJ. The immuneresponse and immunopathology in infection with *Schistosoma mansoni*: a key role of major egg antigen Sm-p40. Parasite Immunology, 20: 217-221; 1998. <http://doi.org/10.1046/j.1365-3024.1998.00150.x>.

TAMAN A, RIBEIRO P. Glutamate-mediated signaling in *Schistosoma mansoni*: a novel glutamate receptor is expressed in neurons and the female reproductive tract. Molecular and Biochemical Parasitology, 176: 42-50; 2011.

TAVARES NC, GAVA SG, TORRES GP, DE PAIVA CÊS, MOREIRA BP, LUNKES FMN, MONTRESOR LC, CALDEIRA RL, MOURÃO MM. *Schistosoma Mansoni* FES Tyrosine Kinase Involvement in the Mammalian Schistosomiasis Outcome and Miracidia Infection Capability in *Biomphalaria Glabrata*. Front. Microbiol. 11: 963; 2020. doi: 10.3389/fmicb.2020.00963

TURNER JD, JENKINS GR, HOGG KG, AYNSLEY SA, PAVELEY RA, COOK PC, COLES MC, MOUNTFORD AP. CD4⁺CD25⁺ regulatory cells contribute to the regulation of colonic

Th2 granulomatous pathology caused by schistosome infection. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 5(8): e1269; 2011.

VALE N, GOUVEIA MJ, RINALDI G, BRINDLEY PJ, GÄRTNER F, CORREIA DA COSTA JM. Praziquantel for Schistosomiasis: Single-Drug Metabolism Revisited, Mode of Action, and Resistance. *Antimicrob Agents Chemother*, 61 (5): e02582-16; 2017.

WANG J, PAZ C, PADALINO G, COGHLAN A, LU Z, GRADINARU I, COLLINS JNR, BERRIMAN M, HOFFMANN KF, COLLINS JJ. Large-Scale RNAi Screening Uncovers Therapeutic Targets in the Parasite *Schistosoma mansoni*. *Science*, 369 (6511): 1649–1653; 2020. doi: 10.1126/science.abb7699.

WANG W, WANG L, LIANG YS. Susceptibility or resistance of praziquantel in human schistosomiasis: a review. *Parasitology Research*, 111 (5): 1871-1877; 2012.

WASS MN, KELLEY LA, STERNBERG MJ. 3DLigandSite: Predicting ligand-binding sites using similar structures. *N Nucleic Acids Research*, 38(2): W469–W473; 2010. doi:10.1093/nar/gkq406.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Schistosomiasis. Geneva; 2022.

WU Q, PENG Z, ZHANG Y, YANG J. COACH-D: Improved protein–ligand binding sites prediction with refined ligand-binding poses through molecular docking. *Nucleic Acids Research*, 46(1): W438–W442; 2018. doi:10. 1093/nar/gky439

YONES DA, BADARY DM, SAYED HMB, BAYOUMI SAH, KHALIFA AA, EL-MOGHAZY AM. Comparative Evaluation of Anthelmintic Activity of Edible and Ornamental Pomegranate Ethanolic Extracts against *Schistosoma mansoni*. *BioMed Research International*, 2016: 1-15; 2016. <http://doi.org/10.1155/2016/2872708>.

YOUSIF F, WASSEL G, BOULOS L, LABIB T, MAHMOUD K, EL-HALLOUTY S, EL BARDICY S, MAHMOUD S, RAMZY F, GOHAR L, EL-MANAWATY M, EL GENDY MAM, FAYAD W, EL-MENSHAWI B. Contribution to *in vitro* screening of Egyptian plants for schistosomicidal activity. *Pharmaceutical Biology*, 50: 732–739; 2012. <http://doi.org/10.3109/13880209.2011.625952>.

YUAN S, CHAN HS, HU Z. Using PyMOL as a platform for computational drug design. *Wiley Interdiscip. Rev. Computational Molecular Science*, 7(2): 1298; 2017. doi:10.1002/wcms.1298.

ZHAO L, HE X, GREVELDING CG, YE Q, LI Y, GASSER RB, DISSOUS C, MUGHAL MN, ZHOU YK, ZHAO JL, HU M. The RIO Protein Kinase-Encoding Gene *Sj-Riok-2* is Involved in Key Reproductive Processes in *Schistosoma Japonicum*. *Parasitology Vectors*, 10: 1–15; 2017. doi: 10.1186/ s13071-017-2524-7.

4.3 CAPÍTULO 3 - Associações histomorfométricas e imunológicas da infecção por *S. mansoni* em animais tratados ou não com *Dysphania ambrosioides* (L.) Mosyakin & Clemants

RESUMO

A esquistossomose constitui uma enfermidade parasitária causada por vermes trematódeos pertencentes ao gênero *Schistosoma*. A manifestação patológica preponderante da enfermidade consiste na formação de granulomas, os quais têm o potencial de ocasionar danos em áreas do tecido afetado. A gênese dessas estruturas implica mecanismos complexos da resposta imunológica, desencadeados durante o curso da infecção por *S. mansoni*. Apesar dos notáveis progressos na contenção da esquistossomose, intervenções suplementares são imprescindíveis para a efetiva erradicação da parasitose. No contexto delineado, a utilização de espécies vegetais como abordagem terapêutica para a esquistossomose tem sido amplamente investigada, emergindo como uma estratégia promissora. O presente estudo se propôs a investigar a correlação entre os parâmetros histomorfométricos e imunológicos durante a infecção por *S. mansoni* em animais submetidos ou não ao tratamento com o extrato de hidroalcoólico *Dysphania ambrosioides* (EHDA). Para tanto, procedeu-se às avaliações imunológicas e histomorfométricas *in vivo* do tratamento com o referido extrato em cada uma das fases do ciclo evolutivo de *S. mansoni*, utilizando camundongos infectados com 50 cercárias e eutanasiados 60 dias pós-infecção. Os animais foram distribuídos nos seguintes grupos: a) animais infectados e tratados com Praziquantel (controle positivo); b) animais infectados, sem tratamento (controle negativo); c) animais não infectados e não tratados (controle limpo); d) camundongos infectados e tratados com EHDA nas diferentes fases evolutivas do parasito: fase cutânea (EHDA1), fase pulmonar (EHDA2), vermes imaturos (EHDA3) e vermes maduros (EHDA4). O EHDA demonstrou redução nos eosinófilos sanguíneos e nos níveis de IgE, contudo, sem associação significativa com o número e área de granulomas. Com relação aos níveis de citocinas, observou-se diminuição nas respostas Th2 (IL-4 e IL-10) e Th17 (IL-17) ao longo das fases do desenvolvimento de *S. mansoni*. Uma associação negativa foi evidenciada entre as respostas Th1 e Th17 com o número e área de granulomas hepáticos e intestinais. Os resultados obtidos são fundamentais para a compreensão de como o tratamento com EHDA afeta as respostas imunes e desenvolvimento dos granulomas *S. mansoni*, proporcionando contribuições potenciais para a abordagem terapêutica da esquistossomose.

Palavras-chave: Esquistossomose; Extrato vegetal; Granuloma; Resposta Imune.

ABSTRACT

Schistosomiasis is a parasitic disease caused by trematode worms belonging to the genus *Schistosoma*. The preponderant pathological manifestation of the disease consists of the formation of granulomas, which have the potential to cause damage to areas of the affected tissue. The genesis of these structures involves complex immune response mechanisms, triggered during the course of *S. mansoni* infection. Despite notable progress in containing schistosomiasis, additional interventions are essential for the effective eradication of the parasitosis. In the outlined context, the use of plant species as a therapeutic approach for schistosomiasis has been widely investigated, emerging as a promising strategy. The present study aimed to investigate the correlation between histomorphometric and immunological

parameters during *S. mansoni* infection in animals submitted or not to treatment with the hydroalcoholic extract *Dysphania ambrosioides* (EHDA). To this end, an *in vivo* immunological and histomorphometric assessments of treatment with the aforementioned extract was carried out in each of the phases of the evolutionary cycle of *S. mansoni*, using mice infected with 50 cercariae and euthanized 60 days post-infection. The animals were distributed into the following groups: a) animals infected and treated with Praziquantel (positive control); b) infected animals, without treatment (negative control); c) uninfected and untreated animals (clean control); d) mice infected and treated with EHDA in the different evolutionary phases of the parasite: cutaneous phase (EHDA1), lung phase (EHDA2), immature worms (EHDA3) and mature worms (EHDA4). EHDA demonstrated a reduction in blood eosinophils and IgE levels, however, without a significant association with the number and area of granulomas. Regarding cytokine levels, a decrease in Th2 (IL-4 and IL-10) and Th17 (IL-17) responses was observed throughout the development phases of *S. mansoni*. A negative association was evidenced between Th1 and Th17 responses with the number and area of hepatic and intestinal granulomas. The results obtained are fundamental for understanding how treatment with EHDA affects immune responses and the development of *S. mansoni* granulomas, providing potential contributions to the therapeutic approach to schistosomiasis.

Keywords: Schistosomiasis; Plant Extract; Granuloma; Immune Response.

1 INTRODUÇÃO

A esquistossomose representa uma doença parasitária debilitante, causada por vermes trematódeos pertencentes ao gênero *Schistosoma*. Esta patologia afeta mais de 240 milhões de indivíduos em mais de 78 países (COLLEY et al., 2014). A sua incidência é proeminente em regiões tropicais e subtropicais, notadamente na África e na Ásia, mas também é endêmica na América do Sul, especialmente no Brasil, onde a espécie *S. mansoni* é a única registrada (COLLEY et al., 2014; GRYSEELS et al., 2006). A população mais afetada reside em comunidades carentes com inadequada infraestrutura sanitária, e estima-se que o *S. mansoni* seja responsável pela infecção de 4 a 6 milhões de pessoas no Brasil (MCMANUS et al., 2018).

Na infecção por *S. mansoni*, o parasito estabelece residência nos vasos sanguíneos, onde os organismos adultos se reproduzem e as fêmeas liberam ovos, que são posteriormente eliminados nas fezes (PAZ et al., 2019). O processo de aderência dos ovos ao endotélio dos vasos mesentéricos, seguido pelo deslocamento para a mucosa, desencadeia uma reação granulomatosa no tecido intestinal. Em um estágio subsequente, muitos ovos são expelidos para o lúmen intestinal, enquanto outros alcançam o fígado por meio do sistema porta, desencadeando uma resposta granulomatosa no tecido hepático (LENZI et al., 2008). Essa resposta inflamatória no fígado resulta em fibrose periportal, inflamação e hipertensão portal, eventualmente culminando na mortalidade do hospedeiro vertebrado infectado (COLLEY et al., 2014).

A resposta imune característica da infecção por esquistossomos é marcada pela indução de um perfil T *helper*-1 (Th1) que logo polariza para Th2 predominante, acompanhada pela geração de células T reguladoras (Tregs), células B reguladoras (Bregs), macrófagos alternativamente ativados (macrófagos M2), produção elevada de IgE e eosinófilos (COLLEY; SECOR, 2014; PEARCE et al., 2004; OBIEGLO et al., 2019; HUSSAARTS et al., 2011; SOUZA et al., 2020). Moléculas imunorreguladoras, produzidas pelos estágios de vida do verme *S. mansoni*, desempenham um papel crucial na modulação da resposta imune do hospedeiro (ACHARYA et al., 2021). A imunidade mediada por células T é essencial para o desenvolvimento da resistência adquirida aos esquistossomos, sendo que os mecanismos de regulação imunológica e de células T envolvidos nesse processo são complexos (PEARCE et al., 2004).

Apesar dos esforços consideráveis no controle da esquistossomose por meio da quimioterapia preventiva baseada na população, utilizando a administração em massa do medicamento praziquantel (PZQ), a prevalência da doença permanece praticamente inalterada devido à rápida reinfecção após cada programa de tratamento (COLLEY et al., 2014). O PZQ, embora eficaz, não é totalmente infalível, e sua administração não é capaz de evitar reinfecção e nem destruir os vermes imaturos (LENZI et al., 2008). O risco de resistência do parasito ao PZQ também é uma preocupação em virtude do uso generalizado do medicamento, embora evidências conclusivas de resistência clínica ainda não tenham surgido (COLLEY et al., 2014).

Diante desse cenário, mesmo que avanços significativos tenham sido alcançados no controle da esquistossomose, intervenções adicionais e abordagens multissetoriais são imperativas para a efetiva eliminação da parasitose (ACHARYA et al., 2021). Nesse contexto, o uso de espécies vegetais no tratamento da esquistossomose tem sido amplamente explorado e emerge como uma estratégia promissora (MOLGAARD et al., 2001; YOUSIF et al., 2012). A espécie vegetal *Dysphania ambrosioides*, conhecida popularmente como mastruz, possui propriedades biológicas comprovadas, incluindo efeito analgésico, anti-inflamatório, antisséptico e cicatrizante, sendo extensivamente utilizada no estado do Maranhão (NASCIMENTO, 2014). O extrato hidroalcoólico de *D. ambrosioides* (EHDA) demonstrou efeitos antiparasitários no tratamento de leishmaniose, malária e esquistossomose (PATRÍCIO et al., 2008; CYSNE et al., 2016; RODRIGUES et al., 2020).

O estudo de Rodrigues et al. (2020) evidenciou, por meio de avaliações *in vivo*, que o tratamento com EHDA induziu alterações favoráveis tanto em termos parasitológicos quanto imunopatológicos nos hospedeiros vertebrados. Os resultados indicaram que o tratamento com *D. ambrosioides* pode modular de maneira benéfica a resposta imune granulomatosa, sem

causar danos exacerbados aos tecidos dos animais (RODRIGUES et al., 2020). Diante dos efeitos positivos já relatados para *D. ambrosioides*, bem como os observados por Rodrigues et al. (2020), em relação à regulação do processo inflamatório granulomatoso, esta pesquisa teve como objetivo investigar como o tratamento com o extrato atua na dinâmica da infecção por *S. mansoni* em relação aos parâmetros imunológicos e histomorfométricos.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Extrato hidroalcólico de *Dysphania ambrosioides* (EHDA)

2.1.1 Coleta da espécie vegetal

Os exemplares foliares de *D. ambrosioides* foram coletados no Município da Raposa, especificamente no Bairro Alto do Farol (S 2°27'34,6" W 44°08'47,5"), localizado em São Luís – MA, durante o período matutino. Uma porção representativa da planta foi utilizada para a confecção da exsicata e posterior identificação no Herbário do Maranhão (MAR) da Universidade Federal do Maranhão, situado no Campus Bacanga.

2.1.2 Produção do extrato hidroalcoólico de *Dysphania ambrosioides* (EHDA)

As folhas de *D. ambrosioides* foram submetidas à secagem em estufa a uma temperatura de 37°C e, posteriormente, foram trituradas em um moinho de facas, resultando em 250 gramas de pó. Este material foi macerado em 1000 mL de Etanol a 70% por um período de duas horas. Subsequentemente, o material foi submetido a um processo de percolação exaustiva. O extrato percolado foi submetido a um processo de rotaevaporação para a remoção do solvente, seguido por liofilização (LIOTOP, L101) para a eliminação de água, resultando na obtenção do extrato seco. Todos os procedimentos descritos foram realizados conforme as diretrizes estabelecidas por Neiva et al. (2011).

2.2 Experimentações *in vivo*

2.2.1 Aquisição e infecção de camundongos

Camundongos machos da linhagem Swiss, com idades compreendidas entre 3 e 4 meses, foram fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal do Maranhão (UFMA) e

alojados no Biotério Setorial da Pós-Graduação do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde (CCBS), em um ambiente controlado, com acesso livre a água e ração. Os animais foram infectados por via percutânea com 50 cercárias viáveis de *S. mansoni*, originárias de exemplares de *Biomphalaria glabrata* da cepa LE de Belo Horizonte – MG. Todas as fases, desde a manutenção até as experimentações com os camundongos utilizados neste estudo, foram conduzidas em conformidade com os protocolos estabelecidos pela Comissão de Ética e Experimentação Animal (CEUA) da Universidade Federal do Maranhão, registrado sob o número 23115.002254/2020-18 (ANEXO A).

2.2.2 Caracterização dos Conjuntos Experimentais

Os camundongos foram distribuídos em sete grupos, cada um composto por seis animais, sendo seis grupos infectados e um grupo não infectado, como descrito detalhadamente no Quadro 1.

Quadro 1. Grupos experimentais por dia de eutanásia durante as fases do ciclo biológico de *Schistosoma mansoni*. Fonte: Elaborado pela autora com base no protocolo de RODRIGUES et al. (2020).

Grupos	Caracterização
Controle Limpo (L)	Camundongos não infectados e não tratados que foram utilizados como parâmetro fisiológico.
Controle Negativo (C-)	Camundongos infectados sem tratamento.
Controle Positivo (C+)	Camundongos que foram tratados entre os dias 45 e 51 dias de infecção com Praziquantel durante sete dias seguidos.
Extrato hidroalcolico de <i>D. ambrosioides</i> (EHDA1) (Dia 1 ao 7)	Camundongos que foram tratados no 1º dia de infecção, na fase cutânea (esquistossômulo de pele), por sete dias consecutivos com EHDA.
Extrato hidroalcolico de <i>D. ambrosioides</i> (EHDA2) (Dia 14 ao 20)	Camundongos que foram tratados no 14º dia de infecção, na fase pulmonar (esquistossômulo pulmonar), por sete dias consecutivos com EHDA.
Extrato hidroalcolico de <i>D. ambrosioides</i> (EHDA3) (Dia 28 ao 34)	Camundongos que foram tratados no 28º dia de infecção, na fase de vermes imaturos (antes da ovipostura), por sete dias consecutivos com EHDA.
Extrato hidroalcolico de <i>D. ambrosioides</i> (EHDA4) (Dia 45 ao 51)	Camundongos que foram tratados 45º dia de infecção, na fase de vermes maduros (após início da oviposição), por sete dias consecutivos com EHDA.

Os camundongos dos grupos que foram tratados com EHDA receberam uma dose diária de 50mg/Kg por via oral, fazendo o uso da técnica de gavagem (RODRIGUES et al., 2020). Em relação ao grupo controle positivo, que recebeu tratamento com PZQ, foi utilizada a dose de 50mg/Kg por via oral (RODRIGUES et al., 2020). Os grupos controle limpo e negativo não receberam nenhum tipo de tratamento.

2.2.3 Eutanásia dos camundongos

Os roedores foram submetidos a uma pesagem prévia antes de serem eutanasiados por meio de uma sobredosagem de anestésico (solução 2:1 de Cloridrato de Xilasina 2% a uma dose de 10mg/kg e Cloridrato de Ketamina 10% a uma dose de 90mg/kg, administrados por via intraperitoneal). Essa medida foi adotada como parte dos procedimentos para a execução dos ensaios *in vivo* propostos. Vale ressaltar que todas as fases desta pesquisa foram conduzidas em estrita conformidade com os princípios técnicos e éticos estabelecidos pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

2.3 Avaliação do tratamento sobre a resposta imune

2.3.1 Obtenção de sangue e análise leucométrica

Após a anestesia dos animais, o sangue foi obtido da região retro orbital. Foi feita a coleta em tubo cônico sem anticoagulante de 2mL, sendo imediatamente utilizados 10µL de cada amostra para a realização do esfregaço sanguíneo. Em seguida, 20µL foram diluídos em 400µL do Líquido de Turck (100mL de solução de ácido acético 2%, 1mL de solução de violeta genciana) para contagem dos leucócitos totais (ARAÚJO-JORGE; CASTRO, 2000). Após cinco minutos de descanso a temperatura ambiente, o tubo com o sangue foi acondicionado em caixa com gelo, até a formação do coágulo. Após centrifugação (290 G /4°C/10 minutos), o soro coletado foi congelado a - 20°C.

A contagem global de leucócitos foi realizada em câmara Neubauer da marca Kasvi®, com auxílio de microscópio óptico de luz comum (Olympus CX40), sob aumento de 40X. Ao total de células contadas (N), foi aplicada a fórmula: Leucócitos/mm³ = N x 50 (ARAÚJO-JORGE; CASTRO, 2000).

A contagem diferencial dos leucócitos foi realizada no esfregaço sanguíneo corado com o kit panótico rápido (Laborclin), com auxílio de microscópio óptico de luz comum, sob

aumento de 100X. Foi estabelecida a quantidade de cada tipo de célula, encontrada ao final da contagem de 100 leucócitos (MACIEL et al., 2014).

2.3.2 Dosagem de IgE Total

A concentração de IgE total no soro foi estimada pela utilização de um kit de ELISA comercialmente disponível, seguindo-se as instruções do fabricante (Bethyl Laboratories Inc, Montgomery, Texas). Sucintamente, placas de 96 poços foram sensibilizadas com 1µL de anticorpo de captura diluído em 100µL de tampão de carbonato-bicarbonato com pH 9,6, para cada poço, permanecendo por 1h a temperatura ambiente. Após este período, as placas foram lavadas 3 vezes com tampão de lavagem (tampão Tris-NaCl: Tris 50mM, NaCl 0,14M, contendo 0,05% Tween 20, pH 8). As placas foram bloqueadas por 30 minutos com tampão Tris-NaCl contendo 1% de BSA e lavadas como descrito anteriormente. As amostras de soro foram diluídas (1:200) em tampão de diluição (tampão de lavagem contendo 1 % BSA). A concentração conhecida da proteína recombinante fornecida pelo fabricante também foi diluída em tampão de diluição (250 – 3,9ng/mL), e aplicada nas placas para gerar a curva padrão utilizada para transformar as leituras de absorbância das amostras em concentração de proteína. As placas contendo as amostras foram incubadas a temperatura ambiente por 1h, e lavadas por 3 vezes com tampão de lavagem. Imunoglobulina E (IgE) presente nos poços foi revelada pela incubação com o anticorpo de detecção conjugado com peroxidase (1:10000) por 1h a temperatura ambiente seguida por 3 lavagens, e revelação da reação por meio da adição do substrato (H₂O₂ 0,5M em solução de OPD 4mM diluído em tampão citrato pH 5). As placas foram incubadas durante 20 minutos a temperatura ambiente, ao abrigo da luz, e a reação foi interrompida pela adição de solução 2N de H₂SO₄ (50µL/poço). A leitura da intensidade de cor da placa de ELISA foi realizada no leitor de microplacas com filtro de 492nm.

2.3.3 Obtenção de células de baço e preparação de cultura

Os baços foram retirados dos camundongos e homogeneizados em 3mL de solução salina tamponada com fosfato (PBS) estéril, seguido pela obtenção da suspensão celular que foi mantida em temperatura reduzida e diluída 50 vezes em PBS para fins de quantificação. As células do baço (após o processo de hemólise) foram alocadas em placas de cultura de 96 poços, cada poço contendo uma concentração de 2×10^5 células, em meio de cultura RPMI 1640 complementado com 2mM de L-glutamina, 23mM de L-asparagina, 0,1mM de ácido pirúvico,

1mM de ácido fólico, 1% de estreptomicina (100µg/mL), penicilina G (100µg/mL) e 2% de soro fetal bovino. As células foram incubadas a 37°C e 5% de dióxido de carbono por um período de 48 horas, conforme relatado por Yang et al. (2011).

2.3.4 Quantificação de citocinas

As concentrações de IFN- γ , TNF- α , IL-12, IL-17, IL-4 e IL-10 foram estimadas da cultura de baço dos animais, por ensaio imunoenzimático (ELISA) usando kits disponíveis comercialmente e seguindo as recomendações do fabricante (DuoSet, R&D Systems, Minneapolis, MN). Conforme descrito por Negrão-Corrêa et al. (2004), uma microplaca de 96 poços foi sensibilizada com 25µl/poço de PBS contendo a concentração apropriada do anticorpo de captura específico para a citocina de interesse. A placa foi incubada durante a noite, seguida por três lavagens com PBS contendo 0,05% Tween 20. Em seguida, 75µl/poço da solução PBS contendo 1% de albumina de soro bovino (BSA - Sigma) foram adicionados e incubados por 1h à temperatura ambiente. Após nova lavagem, 25 µl/poço da solução diluente (PBS com 0,1% de BSA) contendo a citocina recombinante de interesse em concentrações conhecidas (diluídas 1:2) foram adicionados, seguidos de incubação por 2h. Após outro ciclo de lavagem, 25µl/poço do anticorpo de detecção conjugado à biotina na concentração especificada pelo fabricante foram adicionados, e a placa foi incubada por 2h à temperatura ambiente. Posteriormente, após lavagem, 25µl/poço do diluente contendo Streptoavidina conjugada à peroxidase (diluído 1:200) foram adicionados. Após 20 minutos, a placa foi lavada e a reação foi revelada pela adição de 25µl/poço de substrato (substrato A - peróxido de hidrogênio e substrato B - tetrametilbenzeno misturado em partes iguais no momento do uso - DuoSet, R&D Systems, Minneapolis, MN) por 30 minutos, sendo a reação interrompida com solução 4N de H₂SO₄. O produto foi então detectado por colorimetria em um leitor de placas de ELISA (Status-Labsystems Multiskan RC, Helsinki, Finland) a um comprimento de onda de 450nm. Para estimar as quantidades de citocinas presentes nas amostras, a leitura de absorbância das amostras foi interpolada com a curva padrão gerada por diluição seriada de quantidades conhecidas de citocinas. Concentrações conhecidas das proteínas recombinantes foram empregadas para gerar a curva padrão e converter a densidade óptica (OD) para pg/m

2.4 Avaliação histopatológica e histomorfométrica

No que diz respeito à análise histológica, foram coletadas amostras do fígado (parte central do lobo lateral esquerdo), pulmão e intestino dos camundongos, as quais foram fixadas em formol a 10% durante 48 horas. As amostras foram submetidas a uma sequência de imersões em álcool, começando por concentrações de 70%, 80%, 95% e, finalmente, álcool absoluto 1 e 2. Em seguida, foram imersas em xilol 1 e 2 para clarificação, sendo posteriormente incluídas em parafina histológica. Após a inclusão em parafina, os blocos foram seccionados em um micrótomo com espessura de 5µm, e os cortes resultantes foram desparafinados, hidratados e corados com hematoxilina-eosina (HE) (LUNA, 1968).

As seções hepáticas, intestinais e pulmonares coradas com hematoxilina-eosina (HE) foram empregadas nas análises morfométricas dos granulomas. Para essa avaliação, foram utilizados dados provenientes de 9 a 23 granulomas hepáticos, 8 a 30 granulomas intestinais e 3 granulomas pulmonares. A histomorfometria foi conduzida por meio do software ImageJ, em imagens de 6 campos aleatórios por amostra histológica, para a contagem do número e da área dos granulomas. A mensuração da área do granuloma considerou aqueles que apresentavam ovos no centro, contendo miracídio, na fase exsudativa, e que não estavam coalescentes com outros granulomas. As imagens foram capturadas utilizando um microscópio óptico invertido (NIKON®, modelo eclipse Ti-U) acoplado a uma câmera digital e sistema de computador (NIS-Elements advanced research). Todas as avaliações foram realizadas por observadores "duplo-cegos".

2.5 Análise estatística

As análises dos dados foram realizadas pelo Software GraphPad Prism versão 8 (Prism Software, Irvine, Califórnia, EUA). Eles foram avaliados pelo teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov e os resultados foram apresentados como média ± desvio padrão. Para análise dos dados foi utilizado o teste t de Student ou análise de variância (ANOVA), com pós-teste de Bonferroni. Foram feitas correlações pelo teste Pearson. Em todos os casos, o nível de significância estabelecido foi de 5% ($p < 0,05$).

3 RESULTADOS

3.1 Avaliação imunológica *in vivo*

3.1.1 EHDA reduz a quantidade de eosinófilos no sangue

EHDA reduz o número de eosinófilos no sangue de camundongos tratados quando comparados aos animais infectados. Da mesma forma, foi notável redução de eosinófilos nos animais controles positivos, que receberam tratamento com PZQ, em relação ao controle negativo (Figura 1).

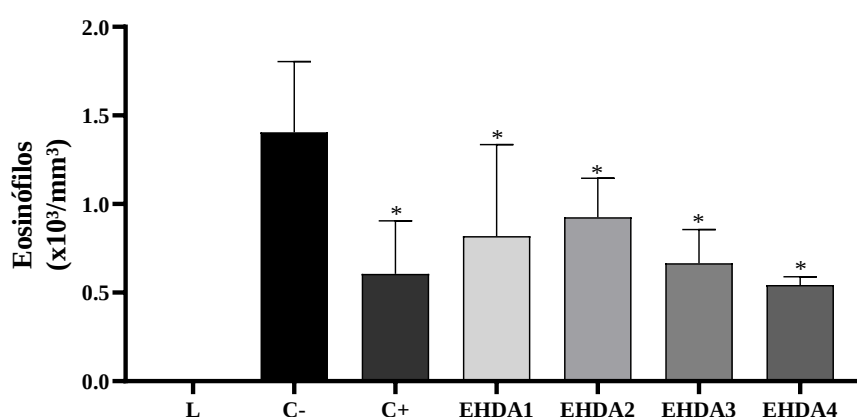


Figura 1. Efeito do tratamento com extrato hidroalcoólico bruto de *Dysphania ambrosioides* sobre eosinófilos sanguíneos. Os animais foram infectados e tratados por via oral com EHDA nos dias 1-7 (EHDA1), 14-20 (EHDA2), 28-34 (EHDA3) e 45-51 (EHDA4) ou tratados com Praziquantel® (50 mg / kg) em dias 45-51 (C +). O grupo controle negativo (C-) continha apenas animais infectados. O grupo limpo (L) teve animais não infectados e não tratados. Os dados representam a média $\pm$ DP de 6 animais por grupo. * $p < 0,05$ comparado ao controle negativo.

3.1.2 O tratamento com EHDA induz redução de concentrações séricas de IgE total

O tratamento com o EHDA reduziu as concentrações séricas de IgE total, em relação ao controle negativo, nos grupos tratados nas fases finais da infecção por *S. mansoni* (EHDA3 e EHDA4). Além disso, o controle negativo apresentou aumento nos níveis de IgE quando comparado ao controle limpo (Figura 2).

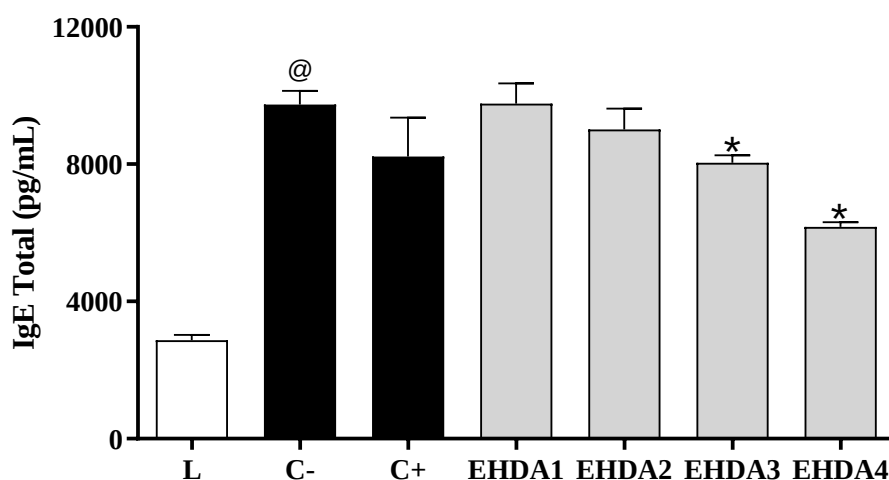


Figura 2. Concentrações séricas de IgE total de camundongos infectados ou não por *Schistosma mansoni*, e tratados ou não com extrato hidroalcoólico de *Dysphania ambrosioides*. O soro foi obtido de animais que, no dia 0 foram infectados com 50 cercárias e eutanasiados no 60º dia. O grupo limpo (L) não foi infectado. O controle negativo (C-) não recebeu tratamento. O controle positivo (C+) foi tratado (45º ao 51º dia) por via oral com praziquantel na dose de 50mg/kg. Nos dias 1 ao 7 (EHDA1), 14 ao 20 (EHDA2), 28 ao 34 (EHDA3) e 45 ao 51 (EHDA4) os animais foram tratados por via oral com EHDA na dose de 50mg/kg. @ $p < 0.05$ em comparação ao controle limpo; * $p < 0.05$ em comparação ao controle negativo. Rodrigues et al., 2020.

3.1.3 O tratamento com EHDA reduz os níveis de citocinas

Os camundongos tratados com EHDA tiveram os níveis das citocinas de resposta Th2 (IL-4) e Th17 (IL-17) reduzidos em quase todas as fases do parasito, a exceção do grupo EHDA3 (Figura 3). Em contrapartida, as citocinas de resposta Th1 (IFN- γ , TNF- α e IL-12) não foram alteradas de forma significativa em comparação ao controle negativo (Figura 3).

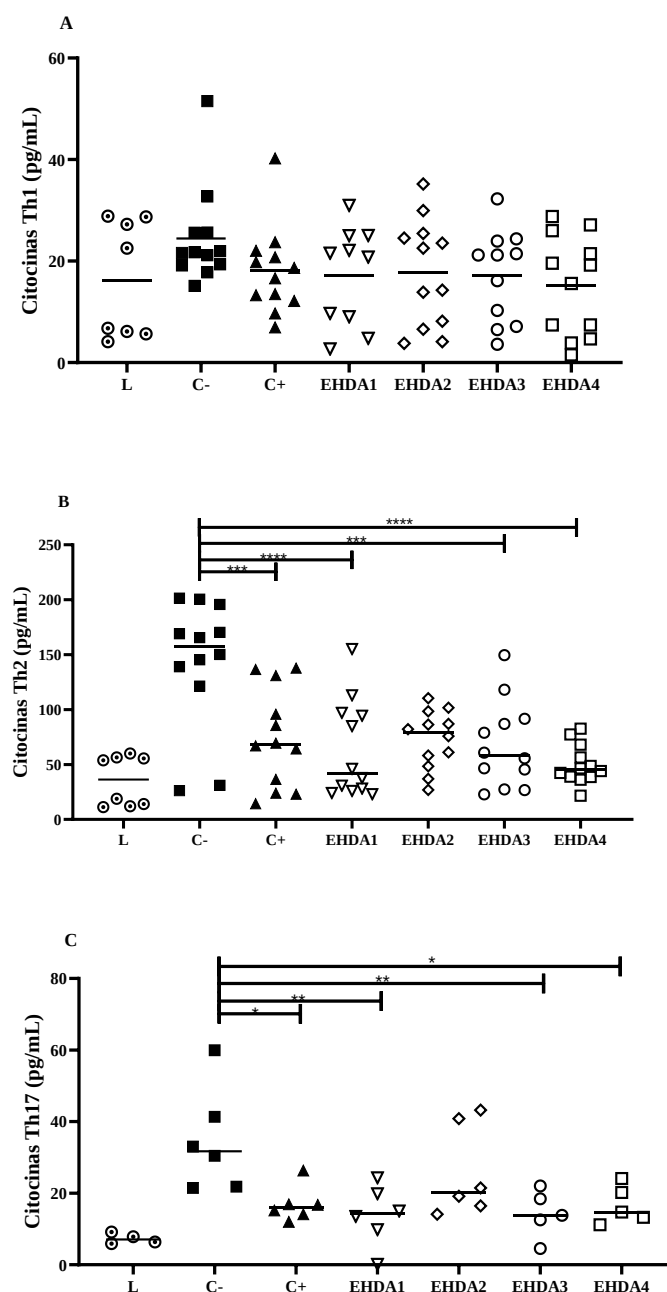


Figura 3. Efeito do tratamento com extrato hidroalcoólico bruto de *Dysphania ambrosioides* nos níveis de citocinas de respostas Th1 (A), Th2 (B) e Th17 (C) em sobrenadante da cultura de células do baço de camundongos infectados com *Schistosoma mansoni*. Os animais foram infectados e tratados por via oral com EHDA nos dias 1-7 (EHDA1), 14-20 (EHDA2), 28-34 (EHDA3) e 45-51 (EHDA4) ou tratados com Praziquantel® (50 mg / kg) em dias 45-51 (C +). O grupo controle negativo (C-) continha apenas animais infectados. O grupo limpo (L) teve animais não infectados e não tratados. @ $p < 0.05$ em comparação ao controle limpo; * $p < 0.05$ em comparação ao controle negativo.

3.2 Correlações entre parâmetros imunológicos e histomorfométricos

3.2 Correlações entre perfis de citocinas e dados histomorfométricos dos tecidos

3.2.1 Os níveis de citocinas de perfis Th1 e Th17 se correlacionam com os dados parâmetros histomorfométricos do tecido hepático de animais tratados com EHDA

Foi correlacionado o perfil de citocina Th1 com dados histomorfométricos (número e área de granulomas em tecido hepático) encontrados para os animais infectados e tratados ou não com EHDA. Dessa forma, foram constatadas correlações negativas entre os parâmetros histomorfométricos de tecido hepático e os níveis de citocinas de perfil Th1 nos animais que receberam tratamento com o extrato, indicando que quanto menor os níveis de citocinas Th1 maior o número e área de granulomas hepático (Figura 4).

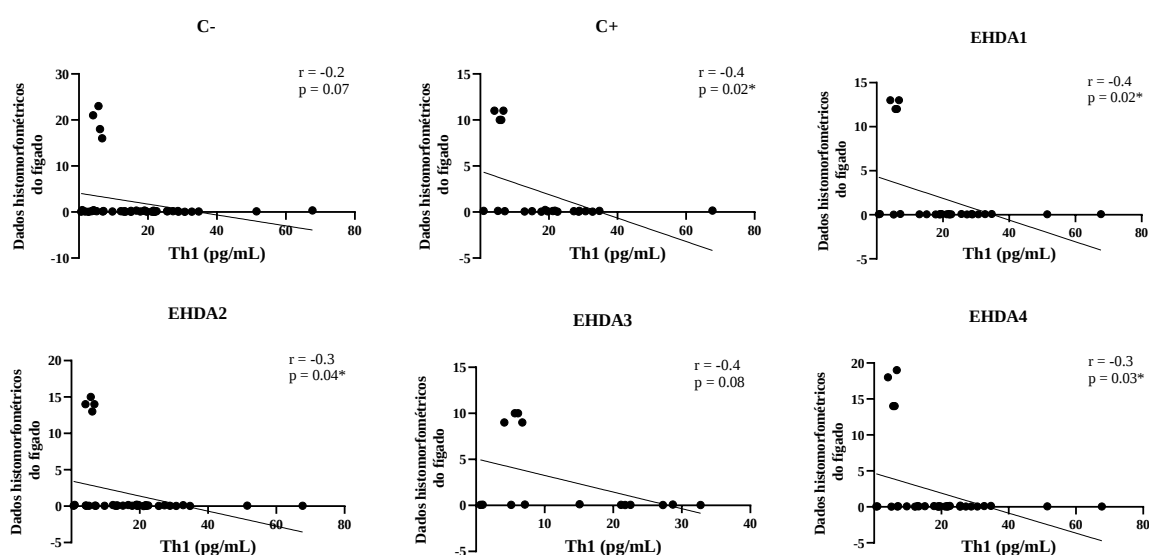


Figura 4. Correlação entre citocinas de resposta Th1 e dados histomorfométricos de tecido hepático em animais infectados por *Schistosoma mansoni* e tratados ou não. Correlação entre citocinas Th1 e dados histomorfométricos no grupo controle negativo (C-), que continha apenas animais infectados; grupo tratado com Praziquantel® (50 mg / kg) em dias 45–51 (C+); grupo de animais que foram infectados e tratados por via oral com EHDA nos dias 1-7 (EHDA1), 14–20 (EHDA2), 28–34 (EHDA3) e 45–51 (EHDA4). As correlações foram feitas pelo teste Pearson. O valor r gera a linha teórica de melhor ajuste e o valor p indica a significância da correlação. Nível de significância, $p < 0,05$.

Ao correlacionar os níveis de citocinas de perfil Th2 aos dados histomorfométricos do tecido hepático, não foram observadas correlações (Figura 5).

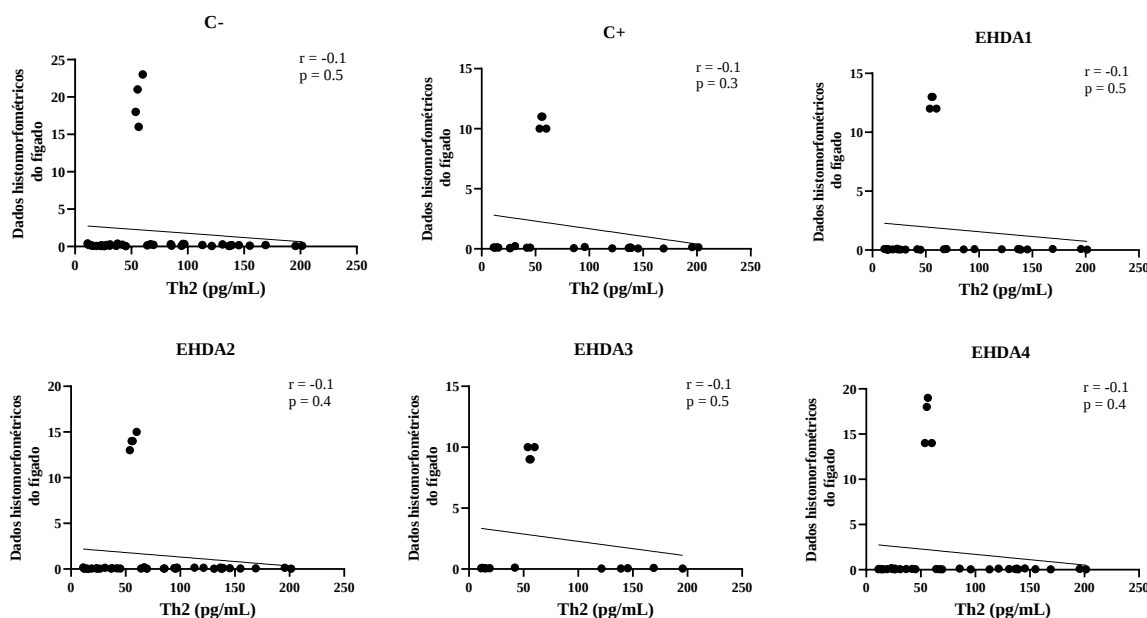


Figura 5. Correlação entre citocinas de resposta Th2 e dados histomorfométricos de tecido hepático em animais infectados por *Schistosoma mansoni* e tratados ou não. Correlação entre citocinas Th2 e dados histomorfométricos no grupo controle negativo (C-), que continha apenas animais infectados; grupo tratado com Praziquantel® (50 mg / kg) em dias 45–51 (C+); grupo de animais que foram infectados e tratados por via oral com EHDA nos dias 1-7 (EHDA1), 14–20 (EHDA2), 28–34 (EHDA3) e 45–51 (EHDA4). As correlações foram feitas pelo teste Pearson. O valor r gera a linha teórica de melhor ajuste e o valor p indica a significância da correlação. Nível de significância, $p < 0,05$.

Nas correlações entre os níveis de citocina de resposta Th17 foram observadas correlações negativas entre os parâmetros histomorfométricos de tecido hepático e os níveis de citocina Th17 nos animais que receberam tratamento com o extrato, da mesma forma como ocorreu com os animais infectados e sem tratamento (Figura 6).

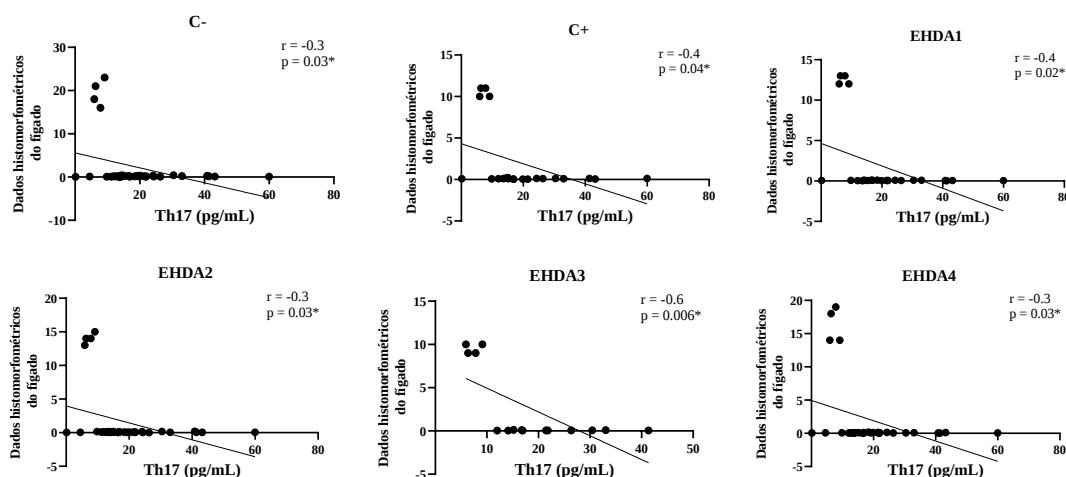


Figura 6. Correlação entre citocinas de resposta Th17 e dados histomorfométricos de tecido hepático em animais infectados por *Schistosoma mansoni* e tratados ou não. Correlação entre citocinas Th17 e dados histomorfométricos no grupo controle negativo (C-), que continha apenas animais infectados; grupo tratado com Praziquantel® (50 mg / kg) em dias 45–51 (C+); grupo de animais que foram infectados e tratados por via oral com EHDA nos dias 1-7 (EHDA1), 14–20 (EHDA2), 28–34 (EHDA3) e 45–51 (EHDA4). As correlações foram feitas pelo teste Pearson. O valor r gera a linha teórica de melhor ajuste e o valor p indica a significância da correlação. Nível de significância, $p < 0,05$.

3.2.2 Os níveis citocinas de perfis Th1 e Th17 se correlacionam com os dados parâmetros histomorfométricos do tecido intestinal de animais tratados com EHDA

Na correlação entre os níveis de citocinas de perfil Th1 com os parâmetros histomorfométricos de tecido intestinal, foi observada correlação negativa entre os dois parâmetros no grupo de animais tratados com EHDA na fase de esquistossômulos pulmonar (EHDA2) (Figura 7).

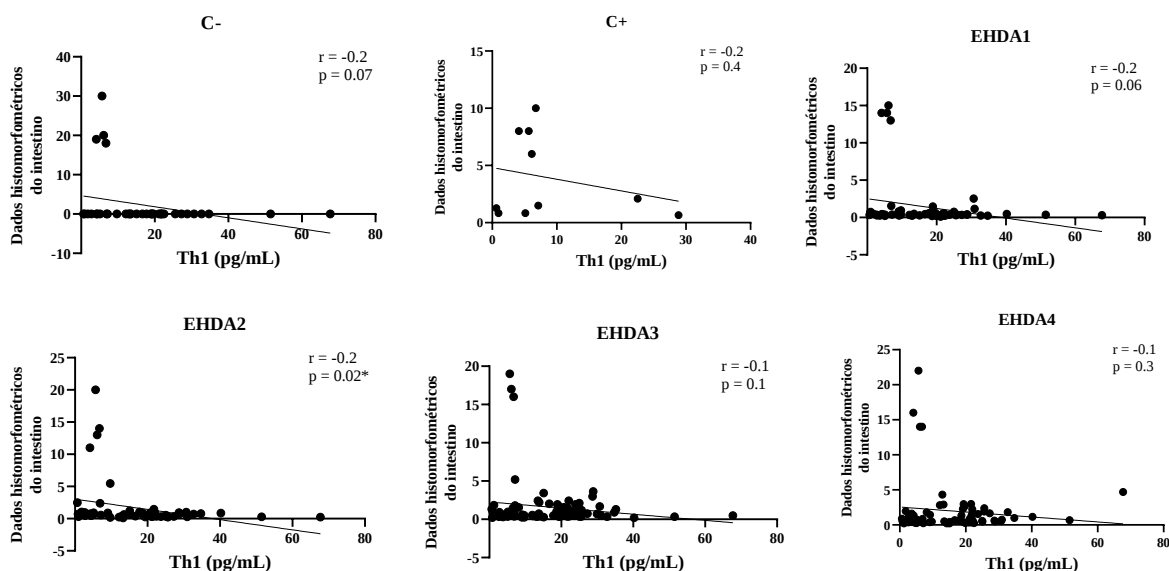


Figura 7. Correlação entre citocinas de resposta Th1 e dados histomorfométricos de tecido intestinal em animais infectados por *Schistosoma mansoni* e tratados ou não. Correlação entre citocinas Th1 e dados histomorfométricos no grupo controle negativo (C-), que continha apenas animais infectados; grupo tratado com Praziquantel® (50 mg / kg) em dias 45–51 (C+); grupo de animais que foram infectados e tratados por via oral com EHDA nos dias 1-7 (EHDA1), 14–20 (EHDA2), 28–34 (EHDA3) e 45–51 (EHDA4). As correlações foram feitas pelo teste Pearson. O valor r gera a linha teórica de melhor ajuste e o valor p indica a significância da correlação. Nível de significância, $p < 0,05$.

Ao correlacionar os níveis de citocinas de perfil Th2 aos dados histomorfométricos do tecido hepático, não foram observadas correlações (Figura 8).

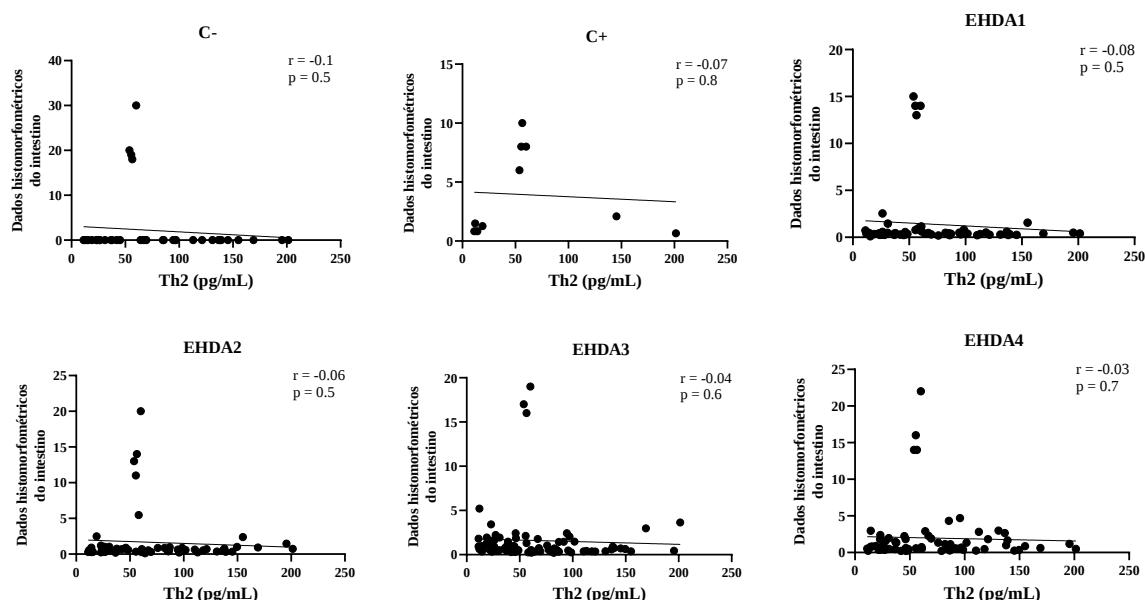


Figura 8. Correlação entre citocinas de resposta Th2 e dados histomorfométricos de tecido intestinal em animais infectados por *Schistosoma mansoni* e tratados ou não. Correlação entre citocinas Th2 e dados histomorfométricos no grupo controle negativo (C-), que continha apenas animais infectados; grupo tratado com Praziquantel® (50 mg / kg) em dias 45–51 (C+); grupo de animais que foram infectados e tratados por via oral com EHDA nos dias 1-7 (EHDA1), 14–20 (EHDA2), 28–34 (EHDA3) e 45–51 (EHDA4). As correlações foram feitas pelo teste Pearson. O valor r gera a linha teórica de melhor ajuste e o valor p indica a significância da correlação. Nível de significância, $p < 0,05$.

Ao correlacionar os níveis de citocinas de perfil Th17 com os parâmetros histomorfométricos de tecido intestinal, foi observada correlação negativa entre os dois parâmetros no grupo de animais tratados com EHDA nas fases cutânea (EHDA1), pulmonar (EHDA2) e de vermes maduros (EHDA4) (Figura 9).

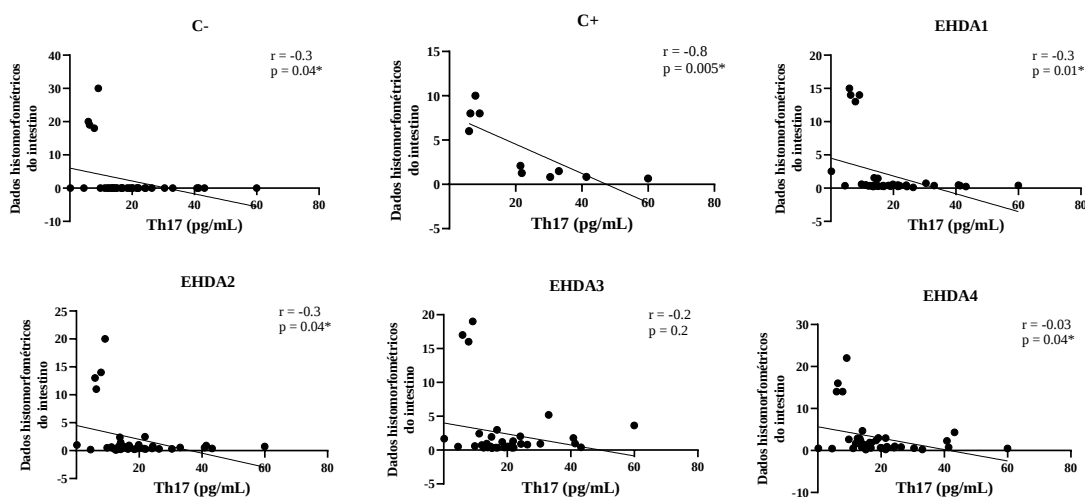


Figura 9. Correlação entre citocinas de resposta Th17 e dados histomorfométricos de tecido intestinal em animais infectados por *Schistosoma mansoni* e tratados ou não. Correlação entre citocinas Th17 e dados histomorfométricos no grupo controle negativo (C-), que continha apenas animais infectados; grupo tratado com Praziquantel® (50 mg / kg) em dias 45–51 (C+); grupo de animais que foram infectados e tratados por via oral com EHDA nos dias 1-7 (EHDA1), 14–20 (EHDA2), 28–34 (EHDA3) e 45–51 (EHDA4). As correlações foram feitas pelo teste Pearson. O valor r gera a linha teórica de melhor ajuste e o valor p indica a significância da correlação. Nível de significância, $p < 0,05$.

3.2.3 Os níveis de citocinas dos perfis Th1, Th2 e Th17 não se correlacionam aos dados histomorfométricos do pulmão nos animais infectados e sem tratamento

Quando foram correlacionadas as citocinas de perfis Th1, Th2 e Th17 aos dados histomorfométricos do tecido pulmonar dos animais infectados e sem tratamento, não foram observadas correlações (Figura 10). Nos demais grupos não foram observados o desenvolvimento de granulomas.

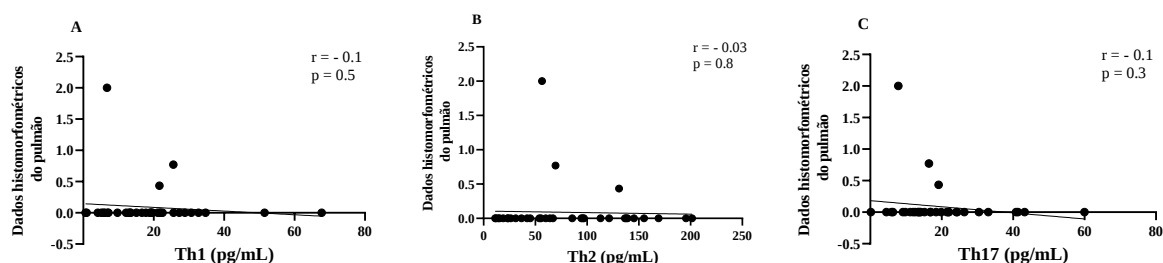


Figura 10. Correlação entre citocinas de resposta Th1 (A), Th2 (B) e Th17 (C) e dados histomorfométricos de pulmonar em animais infectados por *Schistosoma mansoni* e tratados ou não. Correlação entre citocinas Th1, Th2 e Th17 e dados histomorfométricos no grupo controle negativo (C-), que continha apenas animais infectados e onde foram observados granulomas de *S. mansoni*. As correlações foram feitas pelo teste Pearson. O valor r gera a linha teórica de melhor ajuste e o valor p indica a significância da correlação. Nível de significância, $p < 0,05$.

3.2.4 Os níveis de eosinófilos sanguíneos não se correlacionam com a área e número de granulomas

Os eosinófilos sanguíneos foram correlacionados aos números e área de granulomas encontrados nos tecidos hepáticos, intestinais e pulmonares, não sendo constatada correlação entre os parâmetros (Figuras 11, 12 e 13).

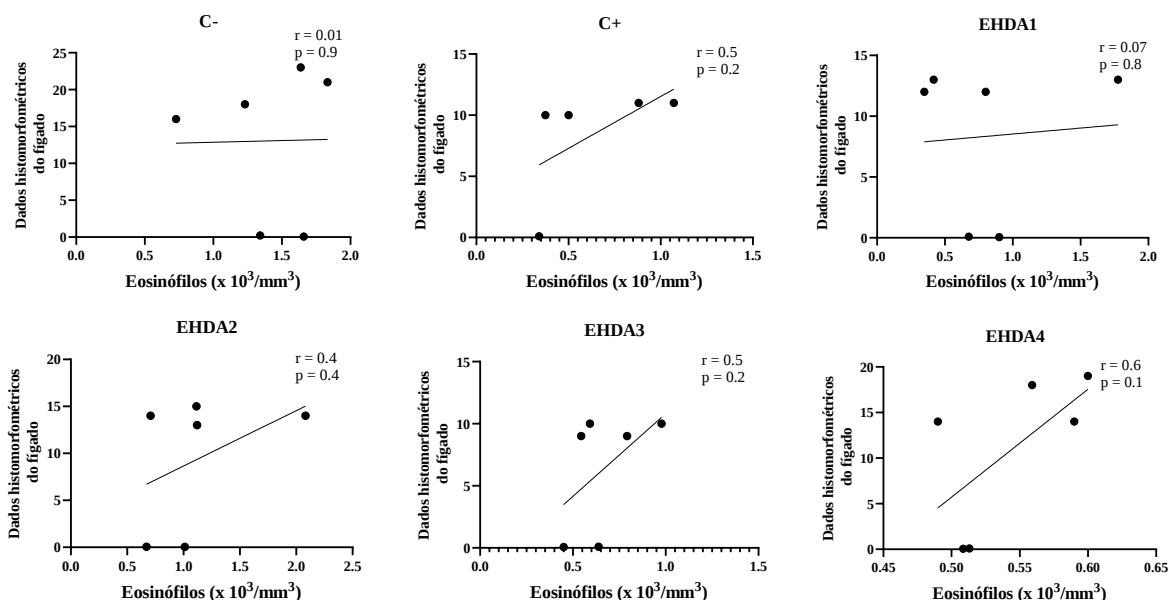


Figura 11. Correlação entre eosinófilos sanguíneos e dados histomorfométricos de tecido hepático em animais infectados por *Schistosoma mansoni* e tratados ou não. Correlação entre eosinófilos sanguíneos e dados histomorfométricos no grupo controle negativo (C-), que continha apenas animais infectados; grupo tratado com Praziquantel® (50 mg / kg) em dias 45–51 (C+); grupo de animais que foram infectados e tratados por via oral com EHDA nos dias 1-7 (EHDA1), 14–20 (EHDA2), 28–34 (EHDA3) e 45–51 (EHDA4). As correlações foram feitas pelo teste Pearson. O valor r gera a linha teórica de melhor ajuste e o valor p indica a significância da correlação. Nível de significância, $p < 0,05$.

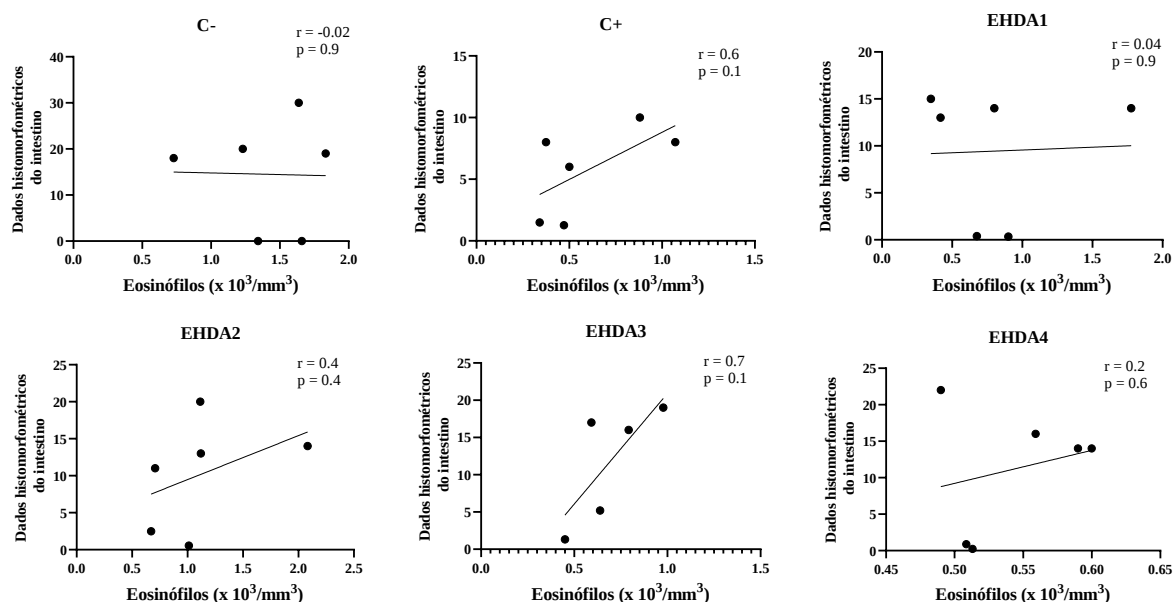


Figura 12. Correlação entre eosinófilos sanguíneos e dados histomorfométricos de tecido intestinal em animais infectados por *Schistosoma mansoni* e tratados ou não. Correlação entre eosinófilos sanguíneos e dados histomorfométricos no grupo controle negativo (C-), que continha apenas animais infectados; grupo tratado com Praziquantel® (50 mg / kg) em dias 45–51 (C+); grupo de animais que foram infectados e tratados por via oral com EHDA nos dias 1-7 (EHDA1), 14–20 (EHDA2), 28–34 (EHDA3) e 45–51 (EHDA4). As correlações foram feitas pelo teste Pearson. O valor r gera a linha teórica de melhor ajuste e o valor p indica a significância da correlação. Nível de significância, $p < 0,05$.

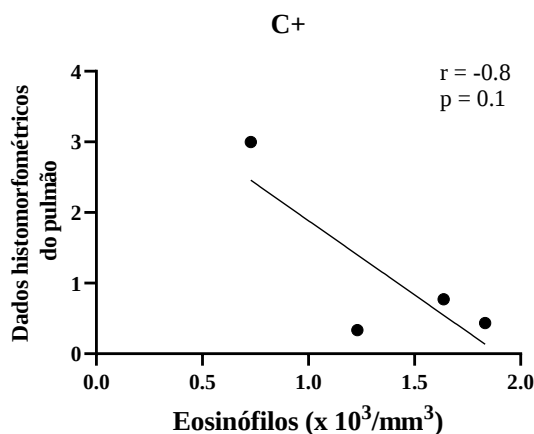


Figura 13. Correlação entre eosinófilos sanguíneos e dados histomorfométricos de tecido pulmonar em animais infectados por *Schistosoma mansoni* e tratados ou não. Correlação entre IgE Total e dados histomorfométricos no grupo controle negativo (C-), que continha apenas animais infectados e onde foram observados granulomas de *S. mansoni*. A correlação foi feita pelo teste Pearson. O valor r gera a linha teórica de melhor ajuste e o valor p indica a significância da correlação. Nível de significância, $p < 0,05$.

3.2.5 Os níveis de IgE não se correlacionam com a área e número de granulomas

Os níveis de IgE Total foram correlacionados aos números e área de granulomas encontrados nos tecidos, não sendo constatada correlação entre os parâmetros (Figuras 14, 15 e 16).

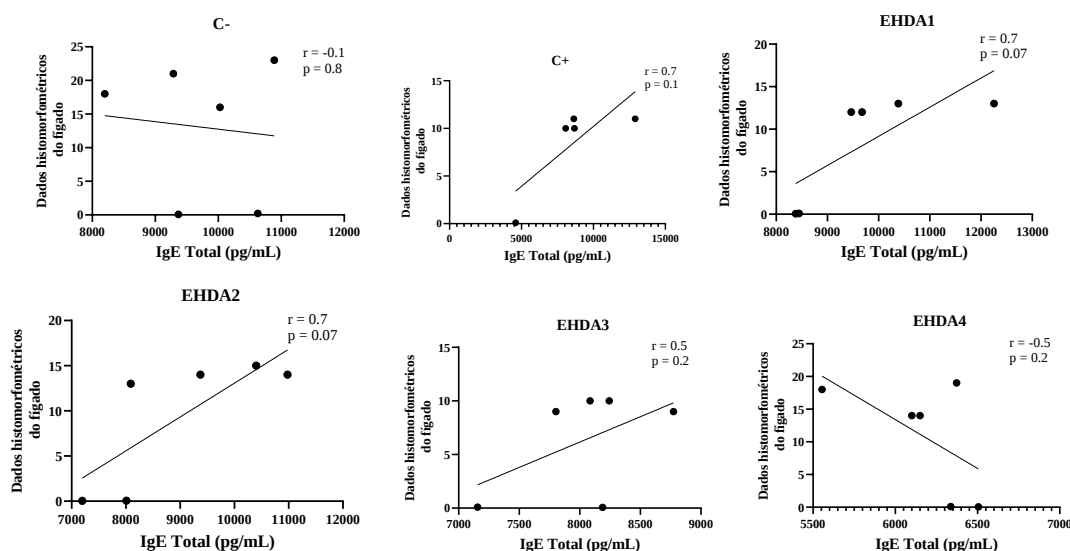


Figura 14. Correlação entre os níveis de IgE Total e dados histomorfométricos de tecido hepático em animais infectados por *Schistosoma mansoni* e tratados ou não. Correlação entre IgE Total e dados histomorfométricos no grupo controle negativo (C-), que continha apenas animais infectados; grupo tratado com Praziquantel® (50 mg / kg) em dias 45–51 (C +); grupo de animais que foram infectados e tratados por via oral com EHDA nos dias 1-7 (EHDA1), 14–20 (EHDA2), 28–34 (EHDA3) e 45–51 (EHDA4). As correlações foram feitas pelo teste Pearson. O valor r gera a linha teórica de melhor ajuste e o valor p indica a significância da correlação. Nível de significância, $p < 0,05$.

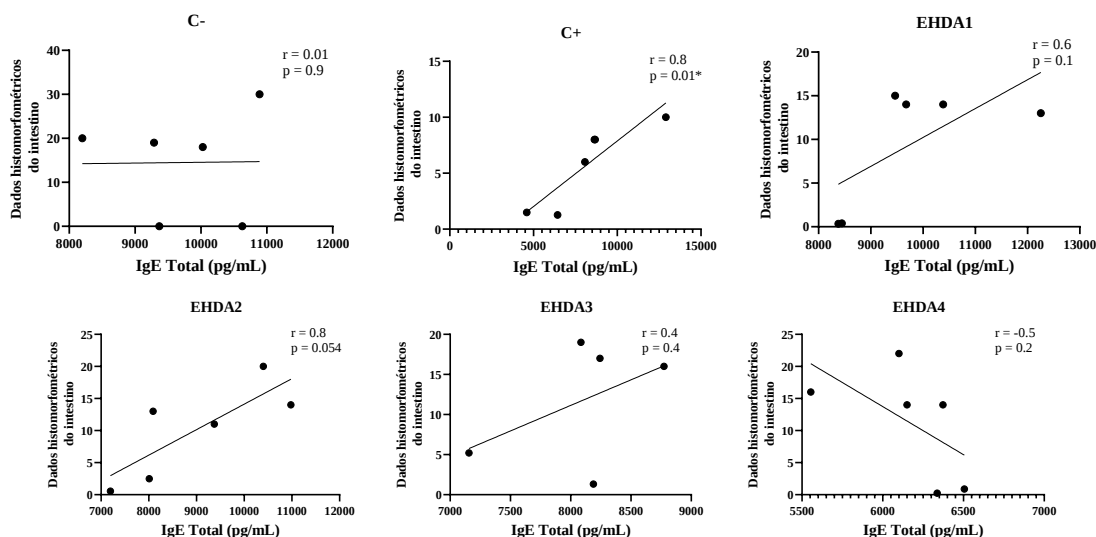


Figura 15. Correlação entre os níveis de IgE Total e dados histomorfométricos de tecido intestinal em animais infectados por *Schistosoma mansoni* e tratados ou não. Correlação entre IgE Total e dados histomorfométricos no grupo controle negativo (C-), que continha apenas animais infectados; grupo tratado com Praziquantel® (50 mg / kg) em dias 45–51 (C +); grupo de animais que foram infectados e tratados por via oral com EHDA nos dias 1-7 (EHDA1), 14–20 (EHDA2), 28–34 (EHDA3) e 45–51 (EHDA4). As correlações foram feitas pelo teste Pearson. O valor r gera a linha teórica de melhor ajuste e o valor p indica a significância da correlação. Nível de significância, $p < 0,05$.

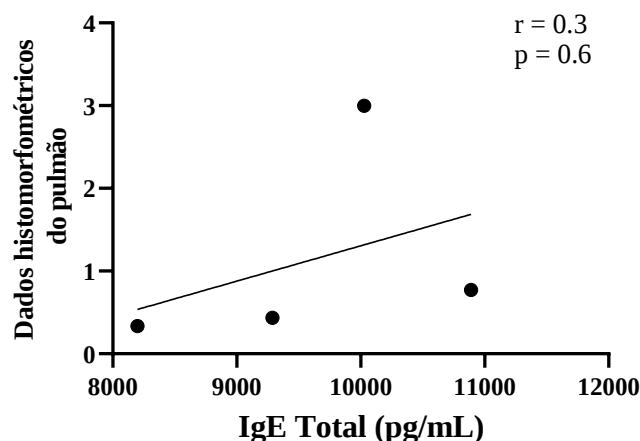


Figura 16. Correlação entre IgE Total e dados histomorfométricos de tecido pulmonar em animais infectados por *Schistosoma mansoni* e tratados ou não. Correlação entre IgE Total e dados histomorfométricos no grupo controle negativo (C-), que continha apenas animais infectados e onde foram observados granulomas de *S. mansoni*. A correlação foi feita pelo teste Pearson. O valor r gera a linha teórica de melhor ajuste e o valor p indica a significância da correlação. Nível de significância, $p < 0,05$.

4 DISCUSSÃO

Os resultados apresentados corroboram com a evidência de que o extrato hidroalcólico de *D. ambrosioides* desempenha um papel na modulação do sistema imune do hospedeiro infectado por *S. mansoni*, potencialmente influenciando o processo de formação de granulomas nos tecidos hepáticos, intestinais e pulmonares.

Os eosinófilos, células altamente plásticas, destacam-se como componentes primordiais no granuloma induzido pela infecção aguda por *S. mansoni*, evidenciando um incremento progressivo durante tal fase (ABDALA-VALENCIA et al., 2018). Consoante à literatura, nossos resultados corroboram com o aumento numérico de eosinófilos em animais infectados não submetidos a tratamento. Em contrapartida, grupos tratados com EHDA e praziquantel apresentaram redução dessas células, restabelecendo níveis normais. Extratos de outras espécies vegetais, como *Curcumin longa* e *Sida pilosa*, também resultaram na diminuição de eosinófilos, presumivelmente inibindo seu recrutamento no tecido hepático de camundongos infectados (ALLAM, 2009; JATSA et al., 2016; JATSA et al., 2018). Este fenômeno é congruente com as descobertas de Rodrigues et al. (2020), que observaram a redução de eosinófilos em animais tratados com extrato hidroalcoólico de *D. ambrosioides*, reforçando o potencial terapêutico do extrato vegetal.

Não encontramos associação entre os níveis de eosinófilos e os dados hitomorfométricos dos tecidos hepáticos, intestinais e pulmonares, possivelmente indicando que essas células não desempenham um papel significativo no controle da carga parasitária ou na retenção de ovos no fígado, conforme indicado por Oliveira et al. (2022). Contudo, Oliveira et al. (2022) sugerem que a ausência de eosinófilos durante a infecção por *S. mansoni* pode resultar em níveis reduzidos de citocinas Th2, Th17 e regulatórias, enquanto há aumento nas citocinas Th1 nos fígados de camundongos infectados.

A elevação dos níveis de anticorpos IgE é um marcador clássico da infecção por *S. mansoni* (CAPRON; CAPRON, 1994). A IgE é considerada um componente crucial na defesa contra a esquistossomose, direcionando células efetoras contra larvas invasoras em reações mediadas por anticorpos. Nossos achados indicam que o EHDA atua como um modulador potente da expressão de IgE, corroborando com Rodrigues et al. (2020), que evidenciaram a redução da concentração de IgE nos estágios de vermes imaturos e maduros de *S. mansoni*. No entanto, não foram observadas alterações nos estágios iniciais da infecção, quando os parasitos estão em estágios evolutivos de esquistossômulos cutâneos e pulmonares.

Não foram identificadas correlações entre os níveis de IgE e os dados hismorfométricos, possivelmente devido ao fato de que antígenos de vermes em desenvolvimento não provocam aumentos substanciais de anticorpos IgE na fase aguda, sendo que a IgE sérica torna-se detectável quando os vermes amadurecem e depositam ovos (EL RIDI et al., 2002). Adicionalmente, a ação progressiva do extrato em normalizar os níveis dessa imunoglobulina pode contribuir para a ausência de correlações observadas.

Em relação a resposta imune, desencadeada em cada estágio do ciclo de vida de *S. mansoni*, é descrita uma sequência de ações que foi comprovada com os dados iniciais de Rodrigues et al. (2020), onde foi verificado um aumento das citocinas de perfil T *helper* 1 (Th1), nos grupos infectados e sem tratamento, em cada fase do desenvolvimento de *S. mansoni*. Também foi notável uma regulação positiva da citocina IL-4, de resposta Th2, quando levado em consideração o grupo controle negativo. No entanto, houve restabelecimento dos níveis dessas citocinas nos grupos que receberam tratamento com *D. ambrosioides* em todas as fases do desenvolvimento do parasito *S. mansoni*.

Os dados dessa pesquisa revelaram aumento de citocinas de perfil Th1, Th2 e Th17 nos animais infectados e não tratados, mas houve uma redução dos níveis de citocinas nos grupos tratados com o extrato vegetal, em especial de maneira significativa na resposta Th2 e Th17, que são respostas normalmente associadas ao processo de formação de granulomas (ZHENG et al., 2020). Provavelmente, esse é um dos fatores responsáveis por desencadear redução da resposta granulomatosa nos grupos que receberam tratamento, havendo redução no número e área do granuloma em tecido hepático, intestinal e pulmonar. Esses desequilíbrios nos perfis de citocinas, proporcionados pelo tratamento com EHDA, pode ser devido ao efeito imunomodulador deste extrato e os seus efeitos linfoproliferativos na regulação da secreção de citocinas, que podem atuar diretamente na resposta imunopatológica e reduzir a formação de granulomas (RODRIGUES et al., 2020).

No geral, por meio de infecções experimentais de *S. mansoni*, principalmente em modelos murinos, estabeleceu-se uma resposta imunológica de que entre a 4^a e 5^a semanas, inicia-se o estágio de pré-patência, onde ocorre a migração de esquistossomos e vermes juvenis, que induzem uma resposta imune mista de Th1 predominante e Th2 de baixo nível (de OLIVEIRA FRAGA et al., 2010).

As duas respostas são caracterizadas por diferentes citocinas, que funcionam como mediadores e agentes valiosos na resposta imune, que regulam a resposta imunoinflamatória e desempenham um papel importante no tratamento da esquistossomose (MIRANDA et al., 2013; YONES et al., 2016; RODRIGUES et al., 2020). Por isso, nesse estudo, foram avaliados os dados imunológicos encontrados e os demonstrados no estudo de Rodrigues et al. (2020) e correlacionados aos dados histomorfométricos a fim de entender as relações que ocorrem durante a resposta imune do hospedeiro a infecção e ao tratamento com EHDA.

Partindo da resposta imunológica da infecção por *S. mansoni*, os dados encontrados neste estudo apontam que quando os animais recebem tratamento com *D. ambrosioides*, à medida que diminui os níveis de citocinas de resposta Th1 e Th17 na fase aguda, maiores são

os números e áreas de granulomas hepáticos e intestinais. Isso sugere que ocorre uma modulação para aumento de resposta Th2 com o surgimento dos granulomas e transição para a fase crônica.

Com o avanço da infecção, em especial no final da fase aguda, é possível que parâmetros imunológicos e parasitológicos e/ou histomorfométricos estejam associados, assim como demonstrado nos trabalhos de Beshay et al. (2018) e Jatsa et al. (2019), com os grupos controle negativos, em que foi evidenciado aumento de ovos, vermes e na quantidade de granulomas hepáticos no decorrer da infecção e com o aumento de resposta Th2. É importante lembrar, que os processos de formação dos granulomas e fibrose são desencadeados por antígenos liberados por ovos de *Schistosoma*, que ficam presos no tecido e induzem uma resposta Th2 (CHUAH et al., 2014).

A resposta Th1, se fundamenta pela produção das citocinas pró-inflamatórias IL-1, IL-2, IL-6, IL-12, TNF- α e IFN- γ (TURNER et al., 2011). Em nosso estudo, foram consideradas as citocinas IFN- γ e TNF- α na avaliação da resposta Th1 e para correlação com os parâmetros histomorfométricos. A citocina IFN- γ está relacionada a resposta inicial à infecção pela esquistossomose, sendo importante para o controle da carga parasitária nos tecidos, por meio da ativação de macrófagos (SOUZA, 2015). Da mesma forma, TNF- α recruta leucócitos para o local da inflamação ou ativa células inflamatórias, sendo importante para o início da formação do granuloma por meio da regulação positiva da molécula de adesão intracelular 1 (ICAM-1) (RASSOUL et al., 2006; HO et al., 2014). Possivelmente, por serem citocinas características no início da infecção, foram demonstradas correlações entre elas e os dados histomorfométricos no fígado e intestino, embora de forma negativa, possivelmente pelo restabelecimento dos níveis desses mediadores nos animais tratados. A redução nos níveis de IFN- γ e TNF- α nos animais tratados, possivelmente pode ter gerado menos ovos retidos nos tecidos hepáticos, intestinais ou pulmonares, diminuindo em consequências o número de granulomas no total.

Com o avanço da infecção o perfil Th1 sofre uma mudança dramática em torno de 5 a 6 semanas, com a produção de ovos induzindo a imunidade do hospedeiro para um perfil predominantemente Th2, havendo a regulação positiva das interleucinas IL-4, IL-5 e IL-13. Esse ambiente do Tipo 2 supera e neutraliza o perfil inicial do Tipo 1 (GRZYCH et al., 1991), por volta de 8 a 10 semanas após a infecção, e é crítico para a inflamação granulomatosa coordenada (FALLON et al., 2000; PHYTHIAN-ADAMS et al., 2010). A resposta Th2 adequadamente regulada é essencial para a sobrevivência do hospedeiro e do parasito (CHUAH et al., 2014; REIMAN et al., 2006), onde relata-se que os esquistossomos produzem uma série

de moléculas que guiam a imunidade do hospedeiro para um fenótipo do tipo 2 (ABDALA-VALENCIA et al., 2018; JUNG et al., 2015; SHAH et al., 2020), enquanto simultaneamente encorajam a expansão de resposta reguladora que regula negativamente e resolve a inflamação crônica (ABDALA-VALENCIA et al., 2018; JUNG et al., 2015; CADMAN et al., 2014).

A citocina IL-4, de perfil Th2, não esteve correlacionada com o número e área de granulomas nos tecidos intestinais e hepáticos. A IL-4 é uma citocina importante para o início da resposta inflamatória do tipo Th2 (SILVEIRA-LEMOS et al., 2008), exibindo uma função protetora para o hospedeiro e sendo capaz de minimizar a carga global da doença (COLLEY; SECOR, 2014). É possível que pelo fato de o presente estudo experimental ter sido realizado apenas até o final da fase aguda tenha-se verificado não tenham sido observada correlação nesse caso. Pois, é demonstrado que a diminuição da carga parasitária é dependente de citocinas como IL-4, assim como a diminuição da fibrinogênese que é dependente da expressão de citocinas como TGF- β e IL-13, apontadas nos estudos de Kaviratne et al. (2004), Wang et al. (2017), Almeer et al. (2018).

Ainda sobre a IL-4, verificou-se que os níveis dessa citocina de perfil Th2 diminuí nos grupos tratados com EHDA, o que também pode ter sido um fator responsável pela redução de granulomas nesses animais. Sendo assim, o extrato de *D. ambrosioides* é capaz de inibir a expressão de IL-4, a qual tem papel fundamental na formação de granuloma, assim como demonstrado por Siddiqui et al., (2006), Sharma et al. (2007) e Rodrigues et al. (2020), ao avaliarem ação de compostos naturais no tratamento da esquistossomose. Sugere-se que a diminuição da expressão de IL-4, nos animais tratados, provavelmente reduziu a formação da inflamação granulomatosa em número, como demonstrado em nossos resultados, associado a expressão de outras citocinas como a TNF- α .

À medida que as infecções progridem para a cronicidade, a resposta do tipo 2 diminui e as respostas regulatórias prevalecem (TAYLOR et al., 2009; SMITS et al., 2007). No caso dos animais tratados com EHDA, foi revelado um aumento mais acentuado nos níveis da citocina IL-10 (RODRIGUES et al., 2020), que segundo Lundy e Lukacs (2013) pode funcionar como um mecanismo de regulação entre as respostas clássicas Th1/Th2.

Com a evolução da infecção por *S. mansoni* a liberação da citocina IL-10, inibe a ação de citocinas pro-inflamatórias como IL-1, TNF- α e IL-6, e estimula a produção endógena de citocinas anti-inflamatórias (OLIVEIRA et al., 2011). A IL-10 pode ter uma função anti-inflamatória ao inibir a função das células acessórias, resultando na diminuição da inflamação, na expressão de moléculas coestimuladoras e na regulação de linfócitos T (STADECKER; HERNANDEZ, 1998). A baixa produção de IL-10 está associada a alto risco de fibrose

derivada da infecção por *S. mansoni*. Assim, a IL-10 pode reduzir a patologia da esquistossomose, regulando a resposta imune e controlando a morbidade crônica em pacientes (SILVEIRA-LEMOS et al., 2008). Macrófagos alternativamente ativados e IL-10 fazem parte de um feedback regulatório da resposta Th2, portanto limitando a inflamação granulomatosa inicial (COLLEY; SECOR, 2014). Nesse contexto, não foi observado aumento proporcional de IL-10 e área de granulomas provavelmente por essa citocina ter esse papel de reduzir a inflamação e regular a resposta imune, fato que seria melhor observado com uma análise da infecção realizada após a 12ª semana.

Reconhece-se, ainda, a resposta Th17 durante a esquistossomose, embora considerada de baixo nível em relação às respostas Th2 ou Th1 (LARKIN et al., 2012; KALANTARI et al., 2019). A citocina IL-17, característica da resposta Th-17, em nossos dados, reduziu nos animais que receberam tratamento com EHDA, ao compararmos com os animais infectados e sem tratamento. Sugere-se que a IL-17 atua no sentido de promover a patologia imunológica em vez de beneficiar o hospedeiro (PONICHTERA et al., 2014; RUTITZKY et al., 2009), o que explica a correlação negativa entre os níveis dessa citocina com os critérios histomorfométricos do fígado e intestino de animais infectados e tratados.

Portanto, nota-se que no decorrer do ciclo de vida de *S. mansoni*, são empregadas pelo hospedeiro amplas possibilidades de estratégias de evasão imunológica e manipulação que permitem a redução contra danos colaterais nos tecidos e a promoção da sobrevivência a longo prazo (EVERTS et al., 2010), as quais permeiam a principal causa patológica da doença, que se caracteriza pelas formações de granulomas.

5 CONCLUSÕES

Os dados demonstram que as características imunológicas e histomorfométricas estão correlacionadas ao longo da fase aguda da infecção por *S. mansoni*, sugerindo uma dinâmica proporcional de aumento ou redução nessas características ao longo da infecção ou durante o tratamento com EHDA.

O extrato também promove mudanças nos perfis de citocinas, e provavelmente na ativação e recrutamento de células, restabelecendo os níveis de citocinas na fase aguda e sugerindo uma atividade anti-inflamatória em ascensão nas últimas fases da infecção por *S. mansoni* avaliada nesse estudo.

REFERÊNCIAS

- ABDALA-VALENCIA H, CODEN ME, CHIARELLA SE, JACOBSEN EA, BOCHNER BS, LEE JJ, BERDNIKOVS S. Shaping eosinophil identity in the tissue contexts of development, homeostasis, and disease. *Journal of Leukocyte Biology*, 104: 95–108; 2018 <https://doi.org/10.1002/JLB.1MR1117-442RR>.
- ACHARYA S, DA'DARA AA, SKELLY PJ. Schistosome immunomodulators. *PLoS Pathog*, 17(12): e1010064; 2021. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1010064>.
- ARAÚJO-JORGE TC, CASTRO SL. orgs. Doença de chagas: manual para experimentação animal [online]. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ. Antropologia e Saúde collection, 2000; p. 368.
- BESHAY EVN, RADY AA, AFIFI AF, MOHAMED AH. Schistosomicidal, antifibrotic and antioxidant effects of *Cucurbita pepo* L. seed oil and praziquantel combined treatment for *Schistosoma mansoni* infection in a mouse model. *Journal of Helminthology*, 93: 286–294; 2019. <http://doi.org/10.1017/S0022149X18000317>.
- COLLEY DG, BUSTINDUY AL, SECOR WE, KING CH. Human schistosomiasis. *The Lancet*, 383 (9936): 2253–2264; 2014.
- COLLEY DG, SECOR WE. Immunology of human schistosomiasis. *Parasite Immunology*, 36,347–357; 2014. <https://doi.org/10.1111/pim.12087>.
- CYSNE DN, FORTES TS, REIS AS, PAULO RIBEIRO B, SANTOS FERREIRA A, AMARAL FM, GUERRA RN, MARINHO CR, NICOLETE R, NASCIMENTO FR. Antimalarial potential of leaves of *Chenopodium ambrosioides* L. *Parasitology Research*, 115 (11): 4327–4334; 2016.
- de OLIVEIRA FRAGA LA, TORRERO MN, TOCHEVA AS, MITRE E, DAVIES SJ. Induction of Type 2 Responses by Schistosome Worms During Prepatent Infection. *The Journal of the Infectious Diseases*, 201:464–72; 2010. <https://doi.org/10.1086/649841>.
- EVERTS B, SMITS HH, HOKKE CH, YAZDANBAKHS M. Helminths and Dendritic Cells: Sensing and Regulating via Pattern Recognition Receptors, Th2 and Treg Responses.. *European Journal of Immunology*, 40:1525–37; 2010. <http://doi.org/10.1002/eji.200940109>
- FALLON PG, RICHARDSON EJ, MCKEN-ZIE GJ, ANDMCKENZIE AN. Schistosome infection of transgenic mice defines distinct and contrasting pathogenic roles for IL-4 and IL-13: IL-13 is a profibrotic agent. *Journal of Immunology*, 164(5): 2585–2591; 2000.
- GRYSEELS BC, POLMAN K, CLERINX J, KESTENS L. Human schistosomiasis. *Lancet*, 368: 11; 2006.
- GRZYCH JM, PEARCE E, CHEEVER A, CAULADA ZA, CASPAR P, HEINY S, LEWIS F, SHER A. Egg deposition is the major stimulus for the production of Th2 cytokines in murine schistosomiasis mansoni. *The Journal of Immunology*, 146 (4): 1322–1327; 1991.
- HO SL, CHAN HM, WONG RN, LI HW. Self-assembling protein platform for direct quantification of circulating microRNAs in serum with total internal reflection fluorescence

microscopy. *Analytica Chimica Acta*, 823:61–68; 2014. <http://doi.org/10.1016/j.aca.2014.03.020>.

HUSSAARTS L, VAN DER VLUGT LE, YAZDANBAKHS M, SMITS HH. Regulatory B-cell induction by helminths: implications for allergic disease. *J Allergy Clin Immunol*, 128(4):733–9; 2011. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2011.05.012>.

JATSA HB, FEUSSOM NG, NKONDO ET, KENFACK CM, SIMO DN, FASSI JBK, FEMOE UM, MOABOULOU C, TSAGUE CD, DONGO E, KAMTCHOUING P, TCHUEM TCHUENTE LA. Efficacy of *Ozoroa pulcherrima* Schweinf methanolic extract against *Schistosoma mansoni*-induced liver injury in mice. *J Trad Complement Med*, 9:304-311; 2019. <http://doi.org/10.1016/j.jtcme.2017.08.009>.

JUNG Y, WEN T, MINGLER MK, CALDWELL JM, WANG YH, CHAPLIN DD, LEE EH, JANG MH, WOO SY, SEOH JY, MIYASAKA M, ROTHENBERG ME. IL-1 β in eosinophil-mediated small intestinal homeostasis and IgA production. *Mucosal Immunology*, 8(4): 930–942; 2015. <https://doi.org/10.1038/mi.2014.123>.

KALANTARI P, BUNNELL SC, STADECKER MJ. The C-Type Lectin Receptor-Driven, Th17 Cell-Mediated Severe Pathology in Schistosomiasis: Not All Immune Responses to Helminth Parasites Are Th2 Dominated. *Frontier Immunology*, 10: 26; 2019. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00026>.

KAVIRATNE M, HESSE M, LEUSINK M, CHEEVER AW, DAVIES SJ, MCKERROW JH, et al. IL-13 Activates a Mechanism of Tissue Fibrosis That is Completely TGF- β Independent. *Journal Immunology*, 173:4020–9; 2004. <http://doi.org/10.4049/jimmunol.173.6.4020>

LARKIN BM, SMITH PM, PONICHTERA HE, SHAINHEIT MG, RUTITZKY LI, STADECKER MJ. Induction and Regulation of Pathogenic Th17 Cell Responses in Schistosomiasis. *Seminars in Immunopathology*, 34:873–88; 2012. <http://doi.org/10.1007/s00281-012-0341-9>.

LENZI HL, KIMMEL E, SCHECHTMAN H, PELAJO-MACHADO M, VALE BS, PANASCO MS, LENZI JÁ. Collagen arrangement in hepatic granuloma in mice infected with *Schistosoma mansoni*: dependence on fiber radiation centers. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 32: 639-643; 1999.

LUNA LG. Manual of the histologic staining methods of the armed forces institute of pathology. 3. ed. New York: McGraw Hill, 1968; p. 258.

LUNDY S, LUKACS N. Chronic schistosome infection leads to modulation of granuloma formation and systemic immune suppression. *Frontiers in Immunology*, 4: 39; 2013. <http://doi.org/10.3389/fimmu.2013.00039>.

MACIEL MCG, FIALHO EMS, GUERRA RNM, BORGES VM, KWASNIEWSKI FH, NASCIMENTO FRF. Tityus serrulatus scorpion venom improves survival and lung inflammation in lethal sepsis induced by CLP in mice. *Toxicon*, 89: 1–8; 2014. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2014.06.018>.

MCMANUS DP, DUNNE DW, SACKO M, UTZINGER J, VENNERVALD BJ, ZHOU XN. Schistosomiasis. *Nature Reviews Disease Primers*, 4: 1–19; 2018. <http://doi.org/10.1038/s41572-018-0013-8>.

MOLGAARD P, NIELSEN SB, RASMUSSEN DE, DRUMOND RB, MAKAZA N, ANDREASSEN J. Anthelmintic screening of Zimbabwean plants traditionally used against schistosomiasis. *Journal of Ethnopharmacology*, 74: 257-264; 2001.

NASCIMENTO KAF. *Chenopodium ambrosioides* L.: do uso popular ao bioproduto com atividade cicatrizante. Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Maranhão, Programa de Pós-Graduação Renorbio – Doutorado em Biotecnologia 2014; 119 f.

NEGRÃO-CORRÊA D, SOUZA DG, PINHO V, BARSANTE MM, SOUZA AL, TEIXEIRA MM. Platelet-activating factor receptor deficiency delays elimination of adult worms but reduces fecundity in *Strongyloides venezuelensis*-infected mice. *Infection and Immunity*, 72: 1135-1142; 2004.

NEIVA VA, RIBEIRO MNS, CARTÁGENES MSS, MORAES-COUTINHO DF, NASCIMENTO FRF, REIS AS, AMARAL FMM. Estudos pré-clínicos de atividade giardicida de *Chenopodium ambrosioides* L. e a padronização dos extratos na pesquisa e desenvolvimento de fitoterápicos. *Revista de Ciências da Saúde*, 13 (2): 155-165; 2011.

OBIEGLO K, COSTAIN A, WEBB LM, OZIR-FAZALALIKHAN A, BROWN SL, MACDONALD AS, SMITS HH. Type I interferons provide additive signals for murine regulatory B cell induction by *Schistosoma mansoni* eggs. *Eur J Immunol*, 49(8):1226–34; 2019. <https://doi.org/10.1002/eji.201847858>.

OLIVEIRA CMB, SAKATA RK, ISSY AM, GEROLA LR, SALOMÃO R. Citocinas y dolor. *Revista Brasileira de Anestesiologia*, 61: 260-265; 2011.

PATRÍCIO FJ, COSTA GC, PEREIRA PV, ARAGÃO-FILHO WC, SOUSA SM, FRAZÃO JB, PEREIRA WS, MACIEL MC, SILVA LA, AMARAL FM, REBÊLO JM, GUERRA RN, RIBEIRO MN, NASCIMENTO FR. Efficacy of the intralesional treatment with *Chenopodium ambrosioides* in the murine infection by *Leishmania amazonensis*. *Journal of Ethnopharmacology*, 115 (2): 313-319; 2008.

PAZ VRF; FIGUEIREDO-VANZAN D, PYRRHO AS. Interaction and involvement of cellular adhesion molecules in the pathogenesis of *Schistosomiasis mansoni*. *Immunology Letters* 206, 11-18. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2018.11.011>.

PEARCE EJ, KANE CM, SUN J, TAYLOR JJ, MCKEE AS, CERVI L. Th2 response polarization during infection with the helminth parasite *Schistosoma mansoni*. *Immunological Reviews* 2004; 201: 117-126.

PHYTHIAN-ADAMS AT, COOK PC, LUNDIE RJ, JONES LH, SMITH KA, BARR TA, et al. CD11c Depletion Severely Disrupts Th2 Induction and Development *In Vivo*. *Journal of Experimental Medicine*, 207:2089–96; 2010. <https://doi.org/10.1084/jem.20100734>.

PONICHTERA HE, SHAINHEIT MG, LIU BC, RAYCHOWDHURY R, LARKIN BM, RUSSO JM, SALANTES DB, LAI CQ, PARNELL L, YUN TJ, CHEONG C, BUNNELL SC, HACHOEN N, STADECKER MJ. CD209a Expression on Dendritic Cells is Critical for the Development of Pathogenic Th17 Cell Responses in Murine *Schistosomiasis*. *Journal of Immunology*, 192: 4655–65; 2014. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1400121>.

RASSOUL F, SALVETTER J, REISSIG D, SCHNEIDER W, THIERY J, RICHTER V. The influence of garlic (*Allium sativum*) extract on interleukin 1 alpha-induced expression of

endothelial intercellular adhesion molecule-1 and vascular cell adhesion molecule-1. *Phytomedicine*, 2006; 13 (4): 230-235. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2005.01.010>.

REIMAN RM, THOMPSON RW, FENG CG, HARI D, KNIGHT R, CHEEVER AW, ROSENBERG HF, WYNN TA, Interleukin-5 (IL-5) augments the progression of liver fibrosis by regulating IL-13 activity. *Infection and Immunity*, 74 (3): 1471–1479; 2006. <https://doi.org/10.1128/IAI.74.3.1471-1479.2006>.

RODRIGUES JGM, ALBUQUERQUE PSV, NASCIMENTO JR, CAMPOS JAV, GODINHO ASS, ARAÚJO SJ, BRITO JM, JESUS CM, MIRANDA GS, REZENDE MC, NEGRÃO-CORRÊA DA, ROCHA CQ, SILVA LA, GUERRA RNM, NASCIMENTO FRF. The immunomodulatory activity of *Chenopodium ambrosioides* reduces the parasite burden and hepatic granulomatous inflammation in *Schistosoma mansoni*-infection. *Journal of Ethnopharmacology*, 264: 113287; 2020.

RUTITZKY L, SMITH P, STADECKER M. T-Bet Protects Against Exacerbation of Schistosome Egg-Induced Immunopathology by Regulating Th17-Mediated Inflammation. *European Journal of Immunology*, 39: 2470–81; 2009. <https://doi.org/10.1002/eji.200939325>.

SHARMA S, CHOPRA K, KULKARNI SK, AGREWALA JN. Resveratrol and curcumin suppress immune response through CD28/CTLA-4 and CD80 co-stimulatory pathway. *Clinical & Experimental Immunology*, 147:155–163; 2007. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2006.03257.x>.

SIDDIQUI AM, CUI X, WU R, DONG W, ZHOU M, HU M, SIMMS HH, WANG P. The anti-inflammatory effect of curcumin in an experimental model of sepsis is mediated by up-regulation of peroxisome proliferator-activated receptor- γ . *Critical Care Medicine*, 34: 1874–1882; 2006. <http://doi.org/10.1097/01.CCM.0000221921.71300.BF>.

SILVEIRA-LEMOES D, TEIXEIRA-CARVALHO A, MARTINS-FILHO OA, ALVES OLIVEIRA LF, COSTA-SILVA MF, MATOSO LF, SOUZA LJ, GAZZINELLI A, CORRÊA-OLIVEIRA, R. Eosinophils activation status, cytokines and liver fibrosis in *Schistosoma mansoni* infected patients. *Acta Tropica*, 108,150–159; 2008. <http://doi.org/10.1016/j.actatropica.2008.04.006>.

SMITS HH, HAMMAD H, VAN NIMWEGEN M, SOULLIE T, WILLART MA, LIEVERS E, et al. Protective Effect of *Schistosoma mansoni* Infection on Allergic Airway Inflammation Depends on the Intensity and Chronicity of Infection. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 120: 932–40; 2007. <http://doi.org/10.1016/j.jaci.2007.06.009>.

SOUZA COS, GARDINASSI LG, RODRIGUES V, FACCIOLI LH. Monocyte and Macrophage-Mediated Pathology and Protective Immunity During Schistosomiasis. *Front Microbiol*, 11: 1973; 2020. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01973>.

SOUZA RP. Fatores imunológicos associados à resistência a infecção pelo *schistosoma mansoni* em uma área endêmica da Bahia, Brasil. Tese (pós-graduação em imunologia). Universidade Federal da Bahia, Salvador; 2015.

TAYLOR JJ, KRAWCZYK CM, MOHRS M, PEARCE EJ. Th2 Cell Hyporesponsiveness During Chronic Murine Schistosomiasis is Cell Intrinsic and Linked to GRAIL Expression. *Journal of Clinical Investigation*, 119:1019–28; 2009. <http://doi.org/10.1172/JCI36534>.

WANG Q, DA'DARA AA, SKELLY PJ. The human blood parasite *Schistosoma mansoni* expresses extracellular tegumental calpains that cleave the blood clotting protein fibronectin. *Scientific Reports*, 7: 12912; 2017. <http://doi.org/10.1038/s41598-017-13141-5>.

YOUSIF F, WASSEL G, BOULOS L, LABIB T, MAHMOUD K, EL-HALLOUTY S, EL BARDICY S, MAHMOUD S, RAMZY F, GOHAR L, EL-MANAWATY M, EL GENDY MAM, FAYAD W, EL-MENSHAWI B. Contribution to *in vitro* screening of Egyptian plants for schistosomicidal activity. *Pharmaceutical Biology*, 50: 732–739; 2012. <http://doi.org/10.3109/13880209.2011.625952>.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com capítulo 1 desse estudo foi possível evidenciar as principais ações imunomoduladoras e antiparasitárias de produtos naturais com base em espécies vegetais que vem sendo utilizados no tratamento da esquistossomose nos últimos anos, abordando os seus metabólitos primários e secundários, trazendo um conhecimento sobre os benefícios imunopatológicos que essas frações imunomoduladoras podem trazer para o hospedeiro em tratamento para esquistossomose.

O capítulo 2 demonstrou que o extrato de *D. ambrosioides* pode reduzir a sobrevivência e inibir a oviposição de *S. mansoni*, em especial em concentrações mais elevadas, o que promove melhorias na carga parasitária e características histopatológicas. Além do mais, a análise *in silico* revelou que principal constituinte do extrato, kaempferol, tem como alvo a proteína Venus Kinase Receptor 2, que pode atuar na inibição da oviposição de *S. mansoni* e colaborar para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas. Quanto a análise histopatológica do fígado, intestino e pulmão, foi demonstrado os granulomas dos animais tratados com EHDA são mais organizados, com depósito de colágeno concêntrico e com predomínio de fibras do tipo I, depositadas de maneira organizada ao redor da resposta granulomatosa. A morfometria dos tecidos hepáticos, intestinais e pulmonares permitiu verificar a eficácia de EHDA para a redução do número e área de granulomas nos tecidos, sendo um dado importante por indicar o papel do extrato para a redução da gravidade da doença.

Com o capítulo 3 foi evidenciado que EHDA é capaz de promover mudanças nos níveis de eosinófilos sanguíneos, IgE total e citocinas pró e anti-inflamatórias, gerando provavelmente mudanças na ativação e recrutamento de células, o que restabelece os níveis desses parâmetros e pode gerar consequências positivas no desenvolvimento de granulomas nos tecidos.

Em última análise, a pesquisa permite abrir caminhos para novas abordagens e investigações imunoterapêuticas, apresentando diferentes perspectivas que possam minimizar a implantação da parasitose e, conseqüentemente, evitar a evolução das formas mais graves da infecção. Esses resultados podem impactar de forma significativa o âmbito científico, regional e social, visto que a esquistossomose é uma preocupação prevalente no contexto de saúde pública e ainda permanece endêmica em alguns municípios do Maranhão e de outros estados brasileiros.

REFERÊNCIAS

- ACHEAMPONG DO, OWUSU-ADZORAH N, ARMAH FA, ANINAGYEI E, ASIAMAHA EA, THOMFORD AK, ANYAN WK. Ethnopharmacological evaluation of schistosomicidal and cercaricidal activities of some selected medicinal plants from Ghana. *Trop Med Health* 2020; 48: 19. <https://doi.org/10.1186/s41182-020-00205-y>
- ALEBIE G, ERKO B, AEMEROM, PETROS B. Epidemiological study on *Schistosoma mansoni* infection in Sanja area, Amhara region, Ethiopia. *Paras Vect BioMed Central*. 2014; 7: 15. doi: 10.1186/1756-3305-7-15.
- ALIBERTI JCS, CARDOSO MA, MARTINS GA, GAZZINELLI RT, VIEIRA LQ, SILVA JS. Interleukin-12 mediates resistance to *Trypanosoma cruzi* in mice and is produced by murine macrophages in response to live trypomastigotes. *Infect. Immun*. 1996; 64: 1961-1967. <http://dx.doi.org/10.1128 / IAI.64.6.1961-1967.1996>
- ALLAM G. Immunomodulatory effects of curcumin treatment on murine schistosomiasis mansoni. *Immunobiology* 2009; 214: 712-27. <http://doi.org/10.1016/j.imbio.2008.11.017>.
- ALMEER RS, EL-KHADRAGY MF, ABDELHABIB S, MONEIM AEA. *Ziziphus spinachristi* leaf extract ameliorates schistosomiasis liver granuloma, fibrosis, and oxidative stress through downregulation of fibrinogenic signaling in mice. *PLoS One* 2018; 13: e0204923. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0204923>.
- ALMEIDA, ANDRADE ZA, ANDRADE ZA, ANDRADE ZA. Effect of chemotherapy on experimental pulmonary schistosomiasis. *Am J Trop Med Hyg*. 1983; 32: 10491054.
- AL-OLAYAN EM, EL-KHADRAGY MF, ALAJMI RA, OTHMAN MS, BAUOMY AA, IBRAHIM SR, MONEIM AEA. *Ceratonía siliqua* pod extract ameliorates *Schistosoma mansoni*-induced liver fibrosis and oxidative stress. *BMC Complement Altern Med* 2016; 16: 434. <http://doi.org/10.1186/s12906-016-1389-1>.
- AMARAL KB, SILVA TP, DIAS FF, MALTA KK, ROSA FM, COSTA-NETO SF, GENTILE R, MELO RCN. Histological assessment of granulomas in natural and experimental *Schistosoma mansoni* infections using whole slide imaging. *PLoS ONE* 2017; 12: e0184696. doi: 10.1371/journal.pone.0184696.
- AMMAR A, HEFNAWY N, MAHMOUD S, SABRY H, GAWISH F, ALY I, REFAHY L. Evaluation of *Callistemon citrinus*, *Punica granatum* and pumpkin against molluscicidal and free larval stages of *Schistosoma mansoni*. *International J Biol Pharm All Sci* 2016; 5:2863–2884. <http://doi.org/10.1017/S0022149X1800041X>
- ANDRADE LF, de MOURÃO M, de GERALDO JAM, COELHO FS, SILVA LL. Regulation of *Schistosoma mansoni* development and reproduction by the mitogenactivated protein kinase signaling pathway. *PLoS Neglect Trop Dis*. 2014; 8: e2949. doi: 10.1371/journal.pntd.0002949.
- ANDRADE ZA, SANTANA TS. Angiogenesis and schistosomiasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2010; 105: 436–9. Doi: 10.1590/S0074-02762010000400013.

APPIAH AD, DEVLAS SJ. Interpreting low praziquantel cure rates of *Schistosoma mansoni* infections in Senegal. Trends Parasitol 2000; 18:125–9. [http://doi.org/10.1016/s1471-4922\(01\)02209-7](http://doi.org/10.1016/s1471-4922(01)02209-7).

ARIYARATNE A, FINNEY CAM. Eosinophils and macrophages within the Th2-induced granuloma: balancing killing and healing in a tight space. Infect. Immun. 87:e127-19; 2019. <http://doi.org/10.1128/IAI.00127-119>.

ÁVILA-BLANCO ME, RODRÍGUEZ MG, MORENO DUQUE JL, MUÑOZ-ORTEGA M, VENTURA-JUÁREZ J. Amoebicidal activity of essential oil of *Dysphania ambrosioides* (L.) Mosyakin & Clemants in an amoebic liver abscess hamster model. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine 2014; 2014: 930208. <https://doi.org/10.1155/2014/930208>.

AZIZ NA, MUSAIGWA F, MOSALA P, BERKIKS I, BROMBACHER F. Type 2 immunity: a two-edged sword in schistosomiasis immunopathology. Trends in immunology 2022; 43: P657-673.

BAH S, DIALLO D, DEMBÉLÉ S, PAULSEN BS. Ethnopharmacological survey of plants used for the treatment of schistosomiasis in Niono District, Mali. Journal of Ethnopharmacology 2006; 25 (3): 387-399. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2005.11.026>.

BAIS S, GREENBERG RM. TRP channels as potential targets for antischistosomes. Int J Parasitol-Drug 2018; 8:511-517. <http://doi.org/10.1016/j.ijpddr.2018.08.003>.

BARRIE JÁ, GRANT AR, DONALD PM. Role of resident liver cells in the pathogenesis of schistosomiasis. Trends Parasitol. 2012; 28: 572-579. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pt.2012.09.005>.

BARRON L, WYNN TA. Fibrosis is regulated by Th2 and Th17 responses and by dynamic interactions between fibroblasts and macrophages. American Journal of Physiology Gastrointestinal and Liver Physiology 2011; 300 (5): 723-728.

BERGQUIST NR. Schistosomiasis: from risk assessment to control. Trends Parasitol. 2002; 18: 309-314. [http://doi.org/10.1016/s1471-4922\(02\)02301-2](http://doi.org/10.1016/s1471-4922(02)02301-2).

BIESKI IGC, LEONTI M, ARNASON JT, FERRIER J, RAPINSKI M, VIOLANTE IMP, BALOGUN SO, PEREIRA JFCA, FIGUEIREDO RCF, LOPES CRAS, SILVA DR, PACINI A, ALBUQUERQUE A, MARTINS DTO. Ethnobotanical study of medicinal plants by population of valley of Juruena region, legal amazon, Mato Grosso, Brazil. Journal Ethnopharmacol 2015; 173: 383-423.

BLANCKAERT I et al. Ethnobotanical, morphological, phytochemical and molecular evidence for the incipient domestication of Epazote (*Chenopodium ambrosioides* L.: Chenopodiaceae) in a semi-arid region of Mexico. Gen Res Crop Evol 2012; 59(4), pp. 557–573. Available at: <https://doi.org/10.1007/s10722-011-9704-7>

BOCKARIE MJ, REBOLLO M, MOLYNEUZ DH. Preventive chemotherapy as a strategy of elimination of neglected tropical parasitic diseases: endgame challenges. Phil Trans R Soc B 2013; 368: 1–11.

BOROS DL, ed. Granulomatous Infections and Inflammations: Cellular and Molecular Mechanisms. Washington, DC: ASM, 2003.

BOUTKHIL S, IDRISSE ME, AMECHROUQ A, CHBICHEB A, CHAKIR S, BADAOUI KE. Chemical composition and antimicrobial activity of crude, aqueous, ethanol extracts and essential oils of *Dysphania ambrosioides* (L.) Mosyakin & Clemants. Acta Botanica Gallica, 2009; 156(2): 201–209. <https://doi.org/10.1080/12538078.2009.10516151>.

BRAGUINE CG, COSTA ES, MAGALHÃES LG, RODRIGUES V, SILVA FILHO AA, BASTOS JK, SILVA MLA, CUNHA WR, JANUÁRIO AH, PAULETTI PM. Schistosomicidal evaluation of *Zanthoxylum naranjillo* and its isolated compounds against *Schistosoma mansoni* adult worms. Zeitschrift fur Naturforschung C J Biosci 2010; 64: 793–797. <http://doi.org/10.1515/znc-2009-11-1207>.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Coordenação-Geral de Desenvolvimento da Epidemiologia em Serviços. Guia de Vigilância em Saúde: volume 3. 1.ed. atual. Brasília: Ministério da Saúde; 2017.

BROWN DS. Freshwater snails of Africa and their medical importance. Boca Raton: CRC Press; 2014.

BRUUN B, AAGAARD-HANSEN J. The social context of schistosomiasis and its control: an introduction and annotated bibliography. Geneva: World Health Organization; 2008.

BURKE M, MCMANUS D, RAMM GA, DUQUE M, LI Y, JONES MK, GOBERT GN. Temporal expression of chemokines dictates the hepatic inflammatory infiltrate in a murine model of schistosomiasis. PLoS Negl Trop Dis. 2010; 4(2): e598.

BURKE ML, JONES MK, GOBERT GN, LI YS, ELLIS MK, MCMANUS DP. Immunopathogenesis of human schistosomiasis. Parasite Immunol 2009; 31, 163–76. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-3024.2009.01098.x>

BUSTINDUY AL, KING CH. Schistosomiasis. In: Manson's Tropical Infectious Diseases. 23rd ed. Elsevier 2014; 8: 698–725.e6. doi: 10.1016/B978-0-7020-5101-2.00053-4.

BUTROUS G. Schistosome infection and its effect on pulmonary circulation. Global Cardiology Science and Practice 2019;5 <https://doi.org/10.21542/gcsp.2019.5>.

CALDAS IR, CAMPI-AZEVEDO AC, OLIVEIRA LF, SILVEIRA AM, OLIVEIRA RC, GAZZINELLI G. Human schistosomiasis mansoni: immune responses during acute and chronic phases of the infection. Acta Tropica 2008; 108 (2-3): 3109-311.

CANTANHEDE SPD, FERNANDEZ MA, MATTOS AC, MONTRESOR LC, SILVA-SOUZA N, THIENGO SC. Freshwater gastropods of the Baixada Maranhense Microregion, an endemic area for schistosomiasis in the State of Maranhão, Brazil: I - qualitative study. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 2014; 47(1), 2014.

CHEEVER AW, HOFFMANN KF, WYNN TA. Immunopathology of schistosomiasis mansoni in mice and men. Immunology Today 2000; 21(9): 465-466.

CHIARAMONTE MG, DONALDSON DD, CHEEVER AW, WYNN TA. An IL-13 inhibitor blocks the development of hepatic fibrosis during a T-helper type 2-dominated inflammatory response. *J. Clin. Invest.* 1999; 104: 777– 85. <http://dx.doi.org/10.1172/JCI7325>.

CHUAH C, JONES MK, BURKE ML, MCMANUS DP, GOBERT GN. Cellular and chemokine-mediated regulation in schistosome-induced hepatic pathology. *Trends in Parasitology* 2014; 30 (3): 141–150. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2013.12.009>.

CIOLI D, PICA-MATTOCCIA L, BASSO A, GUIDI A. Schistosomiasis control: praziquantel forever? *Mol Biochem Parasitol*, 2014; 195: 23-29.

CLEENEWERK L, GARSSSEN J, HOGENKAMP A. Clinical Use of *Schistosoma mansoni* Antigens as Novel Immunotherapies for Autoimmune Disorders. *Frontiers in Immunology* 2020; 11: 182. doi: 10.3389/fimmu.2020.01821.

COLLEY DG, BUSTINDUY AL, SECOR WE, KING CH. Human schistosomiasis. *The Lancet* 2014; 383 (9936): 2253–2264.

CORDELL GA. Phytochemistry and traditional medicine – The revolution continues. *Phytochem Lett* 2014; 10: xxviii–xl. <http://doi.org/10.1016/j.phytol.2014.06.002>.

COURA JR, AMARAL RS. Epidemiological and control aspects of Schistosomiasis in Brazilian endemic areas. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2004; 99(1): 13-19.

COUTO FF, COELHO PM, ARAÚJO N, KUSEL JR, KATZ N, JANNOTTI-PASSOS LK, MATTOS AC. *Schistosoma mansoni*: a method for inducing resistance to praziquantel using infected *Biomphalaria glabrata* snails. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2011; 106:153-157

CRELLEN T, WALKER M, LAMBERTON PH, KABATEREINE NB, TUKAHEBWA EM, COTTON JA, WEBSTER JP. Reduced efficacy of praziquantel against *Schistosoma mansoni* is associated with multiple rounds of mass drug administration. *Clinical Infectious Diseases* 2016; 63(9): 1151–1159.

CRUZ GV, PEREIRA PV, PATRÍCIO FJ, COSTA GC, SOUSA SM, FRAZÃO JB, ARAGÃO-FILHO WC, MACIEL MC, SILVA LA, AMARAL FM, BARROQUEIRO ES, GUERRA RN, NASCIMENTO FR. Increase of cellular recruitment, phagocytosis ability and nitric oxide production induced by hydroalcoholic extract from *Chenopodium ambrosioides* leaves. *Journal of Ethnopharmacology* 2007; 111:148–154.

CYSNE DN, FORTES TS, REIS AS, PAULO RIBEIRO B, SANTOS FERREIRA A, AMARAL FM, GUERRA RN, MARINHO CR, NICOLETE R, NASCIMENTO FR. Antimalarial potential of leaves of *Chenopodium ambrosioides* L. *Parasitology Research* 2016; 115 (11): 4327-4334.

Da SILVA FILHO AA RESENDE DO, FUKUI MJ, SANTOS FF, PAULETTI PM, CUNHA WR, SILVA ML, GREGÓRIO LE, BASTOS JK, NANAYAKKARA NP. *In vitro* antileishmanial, antiplasmodial and cytotoxic activities of phenolics and triterpenoids from *Baccharis dracunculifolia* D. C. (Asteraceae). *Fitoterapia* 2009; 80:478-4782. <http://doi.org/10.1016/j.fitote.2009.06.007>.

De CASTRO CC, DIAS MM, PESSOA, de REZENDE T, MAGALHÃES LG, DA SILVA FILHO AA. Natural Products with Activity Against *Schistosoma Species*. Chapter 8. In: RAI

MHK, KON KV (org) Fighting Multidrug Resistance with Herbal Extracts, Essential Oils and their Components, 1st ed, Elsevier, Londres, 2013; pp 109-134.

DEJANIA NN, SOUZA LZ, OLIVEIRA SRP, NERISA DM, RODOLPHO JMA, CORREIA RO, RODRIGUES V, SACRAMENTO LVS, FACCIOLIE LH, AFONSO A, ANIBALA FF. Immunological and parasitological parameters in *Schistosoma mansoni*-infected mice treated with crude extract from the leaves of *Mentha x piperita* L. Immunobiology 2014; 219: 627–632. <http://doi.org/10.1016/j.imbio.2014.03.015>.

DESSEIN AJ, HILLAIRE D, ELWALI NE, MARQUET S, MOHAMED-ALI Q, MIRGHANI A, HENRI S, ABDELHAMEED AA, SAEED OK, MAGZOUB MM, ABEL L. Severe hepatic fibrosis in *Schistosoma mansoni* infection is controlled by a major locus that is closely linked to the interferon-gamma receptor gene. The American Journal of Human Genetics, 1999; 65(3):709-21. doi: 10.1086/302526.

DIAS JURBERG A, CRUZ O, AHMAD B, OTHMAN A, REISINGER EC, SOMBETZKI M, et al. Host defense versus immunosuppression: unisexual infection with male or female *Schistosoma mansoni* differentially impacts the immune response against invading cercariae. Immunology 2018; 9: 24. doi: 10.3389/fimmu.2018.00861.

DOENHOFF MJ, HAGAN P, CIOLI D, SOUTHGATE V, PICA-MATTOCCIA L, BOTROS S, COLES G, TCHUEM TCHUENTÉ LA, MBAYE A, ENGELS D. Praziquantel: its use in control of schistosomiasis in sub-Saharan Africa and current research needs. Parasitology 2009; 136: 1825-1835.

EKPO IA, AGBOR RB, OSUAGWU AN, EKANEM BE, OKPAKO EC, URUA IS. Phytochemical and comparative studies of the stem bark and root of *Xylopia aethiopica* (Dunal.) A. Rich. World J. Biol. Res. 2012; 5(2): 41–44.

EL-KOTT AF, MOHAMMED RT, ISMAIL NR. Efficacy of garlic and mirazid in treatment of the liver granuloma in mice infected with *Schistosoma mansoni*. Res J Parasitol 2011; 6: 151–159. <http://doi.org/10.3923/jp.2011.151.159>.

EL-SHENAWY NS, SOLIMAN MFM, REYAD SI. The effect of antioxidant properties of aqueous garlic extract and *Nigella sativa* as anti-schistosomiasis agents in mice. Rev Inst Med trop S Paulo 2008; 50: 29-36. <https://doi.org/10.1590/S0036-46652008000100007>.

FALLON PG, RICHARDSON EJ, MCKEN-ZIE GJ, AND MCKENZIE AN. Schistosome infection of transgenic mice defines distinct and contrasting pathogenic roles for IL-4 and IL-13: IL-13 is a profibrotic agent. Journal Immunol 2000; 164(5): 2585–2591.

FENWICK A, JOURDAN P. Schistosomiasis elimination by 2020 or 2030. International Journal of Parasitology 2016; 46: 385–8.

FENWICK A. Praziquantel: do we need another antischistosome treatment? Future Med. Chem. 2015; 7: 677–680.

FINKELMAN FD, SHEA-DONOHUE T, MORRIS SC, GILDEA L, STRAIT R, MADDEN KB, SCHOPF L, URBAN JR JF. Interleukin-4- and interleukin-13-mediated host protection against intestinal nematode parasites. Immunol. Rev. 2004; 201:139–55.

GELFAND M. Cor-pulmonale and cardio-pulmonary schistosomiasis. Trans R Soc Trop Med Hyg [Internet]. 1957; 51: 533-540. Available from: [https://www.surgpath.theclinics.com/article/0035-9203\(57\)90043-3/abstract](https://www.surgpath.theclinics.com/article/0035-9203(57)90043-3/abstract) [cited 2018 Aug 31].

GENTILE R, NETO SFN, D'ANDREA PS. Uma revisão sobre a participação do rato d'água *Nectomys squamipes* na dinâmica de transmissão da esquistossomose mansônica: um estudo multidisciplinar de longo prazo em uma área endêmica. Rev. Oecologia Australis, 2010; 14 (3): 711-725.

GRENCIS RK. Immunity to helminths: resistance, regulation, and susceptibility to gastrointestinal nematodes. Annu. Rev. Immunol. 2015; 33: 201–25.

GRYSEELS B. Schistosomiasis. Infectious Diseases Clinics of North American 2012; 26 (9541): 383-397.

GURARIE D, YOON N, LI E, NDEFFO-MBAH M, DURHAM D, PHILLIPS AE, AURELIO HO, FERRO J, GALVANI AP, KING CH. Modelling control of *Schistosoma haematobium* infection: predictions of the long-term impact of mass drug administration in Africa. Parasite & Vectors 2015; 8: 529. <http://dx.doi.org/10.1186/s13071>.

HAMS E, AVIELLO G, FALLON PG. The *Schistosoma* granuloma: friend or foe?. Frontiers in Immunology 2013; 4 (89): 1-8.

HASSAN FAM, ABED GH, ABDEL-SAMII MAZ, OMAR HM. Antishistosomal Activity of Ginger Aqueous Extract against Experimental *Schistosoma mansoni* infection in Mice. Biomark J 2016; 2: 20. <http://doi.org/10.21767/2472-1646.100020>.

HELMY AH, ABDEL-HADY AA, EL-SHANAWANY F, HAMMAM O, ABDEL-HADY A. The pharmacological approach to reserve portal hypertension and hepatic schistosomal fibrosis in Egypt, control experimental study. J. Egypt. Soc. Parasitol. 2005; 35: 731–750.

HENRI S, CHEVILLARD C, MERGANI A, PARIS P, GAUDART J, CAMILLA C, DESSEIN H, MONTERO F, ELWALI NMA, SAEED OK, MAGZOUB M, DESSEIN AJ. Cytokine regulation of periportal fibrosis in humans infected with *Schistosoma mansoni*: IFN-gamma is associated with protection against fibrosis and TNF-alpha with aggravation of disease. J Immunology, 2002; 169: 929–36. doi: 10.4049/jimmunol.169.2.929.

HERBERT DR, HÖLSCHER C, MOHRS M, ARENDSE B, SCHWEGMANN A, RADWANSKA M, LEETO M, KIRSCH R, HALL P, MOSSMANN H, CLAUSSEN B, FÖRSTER I, BROMBACHER F. Alternative macrophage activation is essential for survival during schistosomiasis and downmodulates T helper 1 responses and immunopathology. Immunity. 2004; 20: 623-35. [http://dx.doi.org/10.1016/s1074-7613\(04\)00107-4](http://dx.doi.org/10.1016/s1074-7613(04)00107-4).

HESSE M, MODOLELL M, LAFLAMME AC, SCHITO M, FUENTES JM, CHEEVER AW, PEARCE EJ, WYNN TA. Differential regulation of nitric oxide synthase-2 and arginase-1 by Type1/type2 cytokines *in vivo*: granulomatous pathology is shaped by the pattern of L-arginine metabolism. J. Immunol. 2001; 167: 6533-6544. <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.167.11.6533>.

HEWIS LG et al. A review of botany, phytochemical, and pharmacological effects of *Dysphania ambrosioides*. Indones J Life Sci | ISSN: 2656-0682 (online) 2020; 2(2): 70–82. Available at: <https://doi.org/10.54250/ijls.v2i2.42>.

HOFFMANN KF, CHEEVER AW, WYNN TA. 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. 2000; 164 (12): 6406–6416, <https://doi.org/10.4049/jimmunol.164.12.6406>.

HUANG YH, SHI MN, ZHENG WD, ZHANG LJ, CHEN ZX, WANG XZ. Therapeutic effect of interleukin-10 on CCl4-induced hepatic fibrosis in rats. World J. Gastroenterol. 2006; 12: 1386-1391. <http://doi.org/10.3748/wjg.v12.i9.1386>.

IBRAHIM MA, MOHAMMED A, ISAH MB, ALIYU AB. Anti-trypanosomal activity of African medicinal plants: A review update. J Ethnopharmacol 2014; 154: 2014. <http://doi.org/10.1016/j.jep.2014.04.012>.

IFPMA. Merck Praziquantel Donation Program. 2017. Disponível em: <http://partnerships.ifpma.org/partnership/merck-praziquantel-donation-program-mpdp>. Acesso em: 16 de janeiro de 2018.

IWASAKI A, MEDZHITOV R. Control of adaptive immunity by the innate immune system. Nat. Immunol. 2015; 16:343–53.

JAMES SL, CHEEVER AW, CASPAR P, WYNN TA. Inducible nitric oxide synthase-deficient mice develop enhanced type 1 cytokine-associated cellular and humoral immune responses after vaccination with attenuated *Schistosoma mansoni* cercariae but display partially reduced resistance. Infect. Immun. 1998; 66: 3510-3518. <http://dx.doi.org/10.1128/IAI.66.8.3510-3518.1998>.

JARNE P, POINTIER JP, DAVID P. Biosystematics of *Biomphalaria* spp. with an Emphasis on *Biomphalaria glabrata*. p. 1-32. In: TOLEDO R, FRIED B. *Biomphalaria* Snails and Larval Trematodes. Springer 2011; 141p.

JATSA HB, FEUSSOM NG, NKONDO ET, KENFACK CM, SIMO DN, FASSI JBK, FEMOE UM, MOABOULOU C, TSAGUE CD, DONGO E, KAMTCHOUING P, TCHUEM TCHUENTE LA. Efficacy of *Ozoroa pulcherrima* Schweinf methanolic extract against *Schistosoma mansoni*-induced liver injury in mice. J Trad Complement Med 2018; 9: 304-311. <http://doi.org/10.1016/j.jtcme.2017.08.009>.

JATSA HB, KENFACK CM, SIMO DN, FEUSSOM NG, NKONDO ET, TCHUEM TCHUENTE LA, TSAGUE CD, DONGO E, KAMTCHOUING P. Schistosomicidal, hepatoprotective and antioxidant activities of the methanolic fraction from *Clerodendrum umbellatum* Poir leaves aqueous extract in *Schistosoma mansoni* infection in mice. BMC Complement. Altern Med 2015; 24: 15-248. <http://doi.org/10.1186/s12906-015-0788-z>

JATSA HB, RUSSO RC, PEREIRA CA, AGUILAR EC, GARCIA CC, ARAÚJO ES, OLIVEIRA JL, RODRIGUES VF, DE OLIVEIRA VG, ALVAREZ-LEITE JI, BRAGA FC, TCHUEM TCHUENTE LA, KAMTCHOUING P, NEGRÃO-CORRÊA DA, TEIXEIRA MM. Improvement of the liver pathology by the aqueous extract and the *n*-butanol fraction of *Sida pilosa* Retz in *Schistosoma mansoni*-infected mice. J Ethnopharmacol 2016; 180: 114-23. <http://doi.org/10.1016/j.jep.2016.01.017>.

JAURÉGUIBERRY, S., PARIS, L., CAUMES, E. Acute schistosomiasis, a diagnostic and therapeutic challenge. *Clinical Microbiology and Infection* 2010; 16 (3): 225-231.

JENKINS MK, KHORUTS A, INGULLI E, MUELLER DL, MCSORLEY SJ, REINHARDT RL, ITANO A, PAPE KA. *In vivo* activation of antigenspecific CD4 T cells. *Annu. Rev. Immunol.* 2001; 19:23–45.

JOURDANE J, THERON A. Larval development: eggs to cercariae. In: ROLLINSON D, SIMPSON AJG, editors. *The Biology of Schistosomes: From Genes to Latrines*, New York, NY: Academic Press, 1987.

KAISER MJ, COLLIE JS, HALL SJ, JENNINGS S, POINER IR. Impacts of fishing gear on marine benthic habitats. In Sinclair M, Valdimarsson G (eds) *Responsible fisheries in the marine ecosystem*. FAO and CABI Publishing, Rome, Italy, 2003; pp 197-216.

KAMEL EG, EL-EMAM MA, MAHMOUD SSM, FOU DA FM, BAYAUMY FE. Attenuation of *Schistosoma mansoni* cercarial infectivity to albino mice by methanol extract of some plant species. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 2010; 98: 342–348.

KAMEL ROA, EL-SHINNAWY NA. Immunomodulatory effect of garlic oil extract on *Schistosoma mansoni* infected mice. *Asian Pac J Trop Med* 2015; 8:999–1005. <http://doi.org/10.1016/j.apjtm.2015.11.016>.

KATZ N, CHAVES A, PELLEGRINO J. A simple device for quantitative stool thicksmear technique in schistosomiasis mansoni. *Revista do Instituto de Medicina Tropical* 1972; 14: 397-400.

KOKANOVA-NEDIALKOVA, NEDIALKOV PT, Nikolov SD. O gênero *Chenopodium*: Fitoquímica, etnofarmacologia e farmacologia. *Phcog Rev.* 2009; 3(6): 280-306.

LAYLAND LE, MAGES J, LODDENKEMPER C, HOERAUF A, WAGNER H, LANG R, COSTA CU. Pronounced phenotype in activated regulatory T cells during a chronic helminth infection. *J. Immunol.* 2010; 184: 713-724. <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.0901435>.

LEE, E.F., YOUNG, N.D., LIM, N.T.Y., GASSER, R.B., FAIRLIE, W.D. Apoptosis in schistosomes: toward novel targets for the treatment of schistosomiasis. *Trends in Parasitology* 2014; 30(2): 75-84.

LENZI HL, JURBERG AD, COELHO PMZ. Migração e desenvolvimento do *Schistosoma mansoni* no hospedeiro definitivo. In: CARVALHO OS, COELHO PMZ, LENZI HL, (editores). *Schistosoma mansoni* e esquistossomose: uma visão multidisciplinar. Rio de Janeiro: Fiocruz 2008; p. 85-145.

LENZI HL, KIMMEL E, SCHECHTMAN H, PELAJO-MACHADO M, VALE BS, PANASCO MS, LENZI JÁ. Collagen arrangement in hepatic granuloma in mice infected with *Schistosoma mansoni*: dependence on fiber radiation centers. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research.* 32: 639-643; 1999.

LESCANO SZ, CHIEFFI PP, CANHASSI RR, BOULOS M, NETO VA. Antischistosomal activity of artemether in experimental Schistosomiasis mansoni. *Rev Saude Publica* 2004; 38:1–8. <http://doi.org/10.1590/S0034-89102004000100010>.

LIFONGO LL, SIMOBEN CV, NTIE-KANG F, BABIAKA SB, JUDSON PN. A Bioactivity Versus Ethnobotanical Survey of Medicinal Plants from Nigeria, West Africa. *Nat Prod Bioprospect* 2014; 4: 1–19. <http://doi.org/10.1007/s13659-014-0005-7>.

LIRA MGS, MIRANDA GS, RODRIGUES JGM, NOGUEIRA RA, GOMES GCC, SILVA-SOUZA N. Ocorrência de *Schistosoma mansoni* no município de São Bento, Baixada Ocidental Maranhense, estado do Maranhão, Brasil. *Revista Pan-Amazônica Saúde* 2017; 8 (4): 45-51.

LLANWARNE F, HELMBY H. Granuloma formation and tissue pathology in *Schistosoma japonicum* versus *Schistosoma mansoni* infections. *Parasite Immunology*. 2021; 43: e12778. <https://doi.org/10.1111/pim.12778>.

LUNDY SK, LUKACS NW. Chronic schistosome infection leads to modulation of granuloma formation and systemic immune suppression. *Front. Immunol.* 2013; 4: 39. <http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2013.00039>.

MACIEL MAM, PINTO AC, ARRUDA AC, PAMPLONA SGSR, VANDERLINDE FA, LAPA AJ, CÓLUS IMS, ECHEVARRIA A, GRYNBERG NF, FARIAS RAF, LUNA COSTA AM, RAO VSN. Ethnopharmacology, phytochemistry and pharmacology: a successful combination in the study of *Croton cajucara*. *J Ethnopharmacol* 2000; 70: 41-55. [https://doi.org/10.1016/s0378-8741\(99\)00159-2](https://doi.org/10.1016/s0378-8741(99)00159-2).

MACIEL MAM, PINTO AC, VEIGA JR VF, GRYNBERG NF, ECHEVARRIA A. Medicinal plants: the need for multidisciplinary scientific studies. *Quím Nova* 2002; 25: 429-438. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422002000300016>.

MAGALHÃES ES, PAIVA CN, SOUZA HSP, PYRRHO AS, MOURÃO-SÁ D, FIGUEIREDO RT, VIEIRA-DE-ABREU A, DUTRA HS, SILVEIRA MS, GASPAR-ELSAS MIC, ELSAS P, BOZZA PT, BOZZA MT. Macrophage migration inhibitory factor is critical to interleukin-5-driven eosinophilopoiesis and tissue eosinophilia triggered by *Schistosoma mansoni* infection. *FASEB J*. 23: 1262–1271; 2009. <https://doi.org/10.1096/fj.08-124248>.

MAGALHÃES LG, MACHADO CB, MORAIS ER, MOREIRA EBC, SOARES CS, SILVA SH, SILVA FILHO AA, RODRIGUES V. *In vitro* schistosomicidal activity of curcumin against *Schistosoma mansoni* adult worms. *Parasitol Res* 2009; 104:1197–1201. <http://doi.org/10.1007/s00436-008-1311-y>.

MANTAWY MM, ALI HF, RIZK MZ. Therapeutic effects of *Allium sativum* and *Allium cepa* in *Schistosoma mansoni* experimental infection. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 2011; 53: 155-163. <http://doi.org/10.1590/S0036-46652011000300007>.

MANTOVANI A, BISWAS SK, GALDIERO MR, SICA A, LOCATI M. Macrophage plasticity and polarization in tissue repair and remodelling. *J. Pathol.* 2013; 229: 176-185. <http://dx.doi.org/10.1002/path.4133>.

MCKENZIE, R.A., BURREN, B.G., NOBLE, J.W. & THOMAS, M.B. Cyanide poisoning in cattle from *Dysphania glomulifera* (redcrumbweed): Using the internet for rapid plant identification and diagnostic advice: Case Report. *Austral. Vet. J.* 2007; 85(12): 505–509. <https://doi.org/10.1111/j.1751-0813.2007.00216.x>.

MCMANUS DP, DUNNE DW, SACKO M, UTZINGER J, VENNERVALD BJ, ZHOU XN. Schistosomiasis. nature reviews disease primers 2018; 4: 1–19. doi: 10.1038/ s41572-018-0013-8.

MELMAN SD, STEINAUER ML, CUNNINGHAM C, KUBATKO LS, MWANGI IN, WYNN NB, MUTUKU MW, KARANJA DM, COLLEY DG, BLACK CL, SECOR WE, MKOJI GM, LOKER ES. Reduced susceptibility to praziquantel among naturally occurring Kenyan isolates of *Schistosoma mansoni*. PLOS Neglected Tropical Diseases 2009; 3: e504.

METWALLY NS. Potency of *Allium sativum* and *Allium cepa* oils against *Schistosoma mansoni* infection in mice. Egypt J Hosp Med 2006; 23: 319-32. <http://doi.org/10.12816/EJHM.2006.17943>.

MIRANDA MA, KUEHN CC, CARDOSO JF, OLIVEIRA LG, MAGALHÃES LG, TIOSSI RF, RODRIGUES V, ZUCOLLOTO S, PRADO JCJR, MCCHESENEY JD, BASTOS JK (2013) Immunomodulatory effect of the alkaloidic extract of *Solanum lycocarpum* fruits in mice infected with *Schistosoma mansoni*. Exp Parasitol 133:396-402. <http://doi.org/10.1016/j.exppara.2012.12.012>.

MITCHELL KM, MUTAPI F, MDULUZA T, MIDZI N, SAVILL NJ, WOOLHOUSE ME. Predicted impact of mass drug administration on the development of protective immunity against *Schistosoma haematobium*. PLoS Neglected Tropical Diseases 2014; 8(7): e3059. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0003059>.

MOLEHIN AJ. Current Understanding of Immunity Against Schistosomiasis: Impact on Vaccine and Drug Development. Research and Reports in Tropical Medicine 2020;11 119–128. <https://doi.org/10.2147/RRTM.S274518>.

MOLGAARD P, NIELSEN SB, RASMUSSEN DE, DRUMOND RB, MAKAZA N, ANDREASSEN J. Anthelmintic screening of Zimbabwean plants traditionally used against schistosomiasis. J. Ethnopharmacol 2001; 74: 257-264.

MONZOTE L, STAMBERG W, STANIEK K, GILLE L. Toxic effects of carvacrol, caryophyllene oxide, and ascaridole from essential oil of *Chenopodium ambrosioides* on mitochondria. Toxicology and Applied Pharmacology 2009; 240: 337–347.

MORAES JD, NASCIMENTO C, LOPES PO, NAKANO E, YAMAGUCHI LF, KATO MJ, KAWANO T. *Schistosoma mansoni*: In vitro schistosomicidal activity of pipartine. Exp Parasitol 2011; 127:357-64 <http://doi.org/10.1016/j.exppara.2010.08.021>

MORAES JD, NASCIMENTO C, YAMAGUCHI LF, KATO MF, NAKANO E. *Schistosoma mansoni*: in vitro schistosomicidal activity and tegumental alterations induced by pipartine on schistosomula. Exp Parasitol 2012; 132: 222–227. <http://doi.org/10.1016/j.exppara.2012.07.004>.

MORTEZA-SEMNANI K. A review on *Chenopodium botrys* L.: Traditional uses, chemical composition and biological activities. Pharm. Biomed. Res. 2015; 1: 1–9. <https://doi.org/10.18869/acadpub.pbr.1.2.1>

MOSTAFA OMS, EID RA, ADLY MA. Antischistosomal activity of ginger (*Zingiber officinale*) against *Schistosoma mansoni* harbored in C57 mice. Parasitol Res 2011; 109:395–403. <http://doi.org/10.1007/s00436-011-2267-x>.

MOUAHID G, ROGNON A, DE CARVALHO AUGUSTO R, DRIGUEZ P, GEYER K, KARINSHAK S, et al. Transplantation of schistosome sporocysts between host snails: a video guide. Wellcome Open Research 2018; 3: 3. doi: 10.12688/wellcomeopenres.13488.1.

MUTAPI F, MAIZELS R, FENWICK A, WOOLHOUSE M. Human schistosomiasis in the post mass drug administration era. The Lancet Infectious Diseases 2017; 17 (2): e42-e47.

NASCIMENTO GL, OLIVEIRA MR. Severe forms of schistosomiasis mansoni: epidemiologic and economic impact in Brazil, 2010. Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 2014; 108 (1): 29-36.

NASCIMENTO KAF. *Chenopodium ambrosioides* L.: do uso popular ao bioproduto com atividade cicatrizante. Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Maranhão, Programa de Pós-Graduação Renorbio – Doutorado em Biotecnologia 2014; 119 f.

NAZISH M et al. Taxonomic implications of leaf epidermis in halophytes of Amaranthaceae from Salt Range of Punjab, Pakistan, Plant Biosyst 2022; 156(1): 79–90. Available at: <https://doi.org/10.1080/11263504.2020.1837277>.

NELWAN ML. Schistosomiasis: life cycle, diagnosis, and control. Curr Ther Res 2019; 91: 5–9. doi: 10.1016/j.curtheres.2019.06.001.

NEWMAN DJ, CRAGG GM. Natural product as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. J Nat Prod 2012; 75: 311-335. <http://doi.org/10.1021 / np200906s>.

NODARI RO, GUERRA MP. Assessment environmental risks genetically of modified plants. Cad Ciên Tec 2001; 18: 81-116. <http://doi.org/10.35977/0104-1096.cct2001.v18.8833>.

NOGUEIRA RA, LIRA MGS, LICÁ ICL, FRAZÃO GCCG, DOS SANTOS VAF, FILHO ACCM, RODRIGUES JGMR, MIRANDA GS, CARVALHO RC, NASCIMENTO FRF. Praziquantel: an update on the mechanism of its action against schistosomiasis and new therapeutic perspectives. Mol Biochem Parasitol 2022; 252: 111531. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2022.111531>.

NOYA O, DE NOYA BA, LOSADA S, COLMENARES C, GUZMAN C, LORENZO MA, BERMÚDEZ H. Laboratory diagnosis of schistosomiasis in areas of low transmission. A review of a line of research. Mem Inst Oswaldo Cruz 2002; 97: 167–9. <http://doi.org/10.1590/S0074-02762002000900032>.

NOYA O, KATZ N, POINTIER JP, THERON A, DE NOYA BA. Schistosomiasis in America. In Neglected Tropical Diseases-Latin America and the Caribbean, Springer; 2015, p. 11-43.

ORIENTE A, FEDARKO NS, PACOCHA SE, HUANG SK, LICHTENSTEIN LM, ESSAYAN DM. Interleukin-13 modulates collagen homeostasis in human skin and keloid fibroblasts. J. Pharmacol. Exp. Ther. 2000; 292: 988–94.

PAGÁN AJ, RAMAKRISHNAN L. The Formation and Function of Granulomas. Annual Review of Immunology. 2018; 36:23.1–23.27.

PARAENSE WL. Fauna planorbídica do Brasil. In: LACAZ CS, BARUZZI, RG, SIQUEIRA W, editors. Introdução à geografia médica do Brasil. São Paulo: Edgar Blucher e Universidade de São Paulo 1972; p. 213-239.

PARAENSE WL. Planorbidae, Lymnaeidae and Physidae of Ecuador (Mollusca: Basommatophora). Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 99 (4): 357-362; 2004.

PARAENSE WL. The schistosome vectores in the Americas. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz; 2001, p. 7-16.

PATRÍCIO FJ, COSTA GC, PEREIRA PV, ARAGÃO-FILHO WC, SOUSA SM, FRAZÃO JB, PEREIRA WS, MACIEL MC, SILVA LA, AMARAL FM, REBÊLO JM, GUERRA RN, RIBEIRO MN, NASCIMENTO FR. Efficacy of the intralesional treatment with *Chenopodium ambrosioides* in the murine infection by *Leishmania amazonensis*. Journal of Ethnopharmacology 2008; 115 (2): 313-319.

PEARCE EJ, KANE CM, SUN J, TAYLOR JJ, MCKEE AS, CERVI L. Th2 response polarization during infection with the helminth parasite *Schistosoma mansoni*. Immunological Reviews 2004; 201: 117-126.

PEARCE EJ, MACDONALD AS. The immunobiology of schistosomiasis. Nat. Rev. Immunol. 2002; 2, 499–511. <http://dx.doi.org/10.1038/nri843>.

PENHA ES, LACERDA-SANTOS R, CARVALHO MGF, OLIVEIRA PT. Effect of *Chenopodium ambrosioides* on the healing process of the *in vivo* bone tissue. Microsc Res Tech. 1–7; 2017. <https://doi.org/10.1002/jemt.22913>.

PEREIRA, W.S., RIBEIRO, B.P., SOUSA, A.I., SERRA, I.C., MATTAR, N.S., FORTES, T.S., REIS, A.S., SILVA, L.A., BARROQUEIRO, E.S., GUERRA, R.N., NASCIMENTO, F.R. Evaluation of the subchronic toxicity of oral treatment with *Chenopodium ambrosioides* in mice. J. Ethnopharmacol 2010; 127 (3), 602–605. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2009.12.018>.

PODOLAK I, OLECH M, GALANTY A, ZAŁUSKI D, GRABOWSKA K, SOBOLEWSKA D, MICHALIK M, NOWAK R. Flavonoid and phenolic acid profile by LC-MS/MS and biological activity of crude extracts from *Chenopodium hybridum* aerial parts. Natural Product Research 2016; 30: 1766–1770.

REEVES HL, FRIEDMAN SL. Activation of hepatic stellate cells--a key issue in liver fibrosis Front Biosci 2002; 1:7:d808-26. doi: 10.2741/reeves.

REIS EAG, ATHANAZIOA DA, CAVADA BS, TEIXEIRA EH, PINTO VPT, CARMO TMA, REIS A, TROCOLLI G, CRODAA J, HARND D, BARRAL-NETTO M, REIS MG. Potential immunomodulatory effects of plant lectins in *Schistosoma mansoni* infection. Acta Trop 2008; 108:160–165. <http://doi.org/10.1016/j.actatropica.2008.05.025>.

REYES-BECERRIL M et al. Antioxidant, intestinal immune status and anti-inflammatory potential of *Chenopodium ambrosioides* L. in fsh: In vitro and *in vivo* studies, Fish Shellf Immunol 2019; 86: pp. 420–428. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.11.059>

RIOS CE, ABREU AG, BRAGA FILHO JA, NASCIMENTO JR, GUERRA RN, AMARAL FM, MACIEL MC, NASCIMENTO FR. *Chenopodium ambrosioides* L. improves phagocytic activity and decreases bacterial growth and the systemic inflammatory response in sepsis induced by cecal ligation and puncture. Frontiers in Microbiology 2017; 8: 148.

RIZK M, IBRAHIM N, EL-RIGAL N. Níveis comparativos de antioxidantes *in vivo* em camundongos infectados com *Schistosoma mansoni* tratados com Praziquantel ou óleo

essencial de folhas de *Melaleuca armillaris*. Paq J Biol Sci 2012; 15: 971-978. <http://doi.org/10.3923/pjbs.2012.971.978>.

RODRIGUES JGM, ALBUQUERQUE PSV, NASCIMENTO JR, CAMPOS JAV, GODINHO ASS, ARAÚJO SJ, BRITO JM, JESUS CM, MIRANDA GS, REZENDE MC, NEGRÃO-CORRÊA DA, ROCHA CQ, SILVA LA, GUERRA RNM, NASCIMENTO FRF. The immunomodulatory activity of *Chenopodium ambrosioides* reduces the parasite burden and hepatic granulomatous inflammation in *Schistosoma mansoni*-infection. J Ethnopharmacol 2020; 264: 113287.

ROLLEMBERG CVV, SANTOS CMB, SILVA MMBL, SOUZA AMB, SILVA AM, ALMEIDA JAP, ALMEIDA RP, RIBEIRO-JESUS A. Aspectos epidemiológicos e distribuição geográfica da esquistossomose e geo-helminthos, no Estado de Sergipe, de acordo com os dados do Programa de Controle da Esquistossomose. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 2011; 44 (1): 91-96.

ROLLINSON D, KNOPP S, LEVITZ S, STOTHARD JR, TCHUEM TCHUENTÉ LA, GARBA A, MOHAMMED KA, SCHUR N, PERSON B, COLLEY DG, UTZINGER J. Time to set the agenda for schistosomiasis elimination. Acta Tropica 2012; 128: 423-440.

ROSS AG, VICKERS D, OLDS GR, SHAH SM, MCMANUS DP. Katayama syndrome. Lancet Infect Dis 2007; 7: 218–24. doi: 10.1016/S1473-3099(07) 70053-1.

RUGEL A, TARPLEY R, LOPEZ A, MENARD T, GUZMAN MA, TAYLOR AB, CAO X, KOVALSKYY D, CHEVALIER FD, ANDERSON TJC, HART PJ, LOVERDE PT, MCHARDY SF. Design, synthesis, and characterization of novel small molecules as broad range anti-schistosomal agents. ACS Medicinal Chemistry Letters, 2018; 9: 967–973.

RUTITZKY LI, OZKAYNAK E, ROTTMAN JB, STADECKER MJ. Disruption of the ICOS-B7RP-1 costimulatory pathway leads to enhanced hepatic immunopathology and increased gamma interferon production by CD4 T cells in murine schistosomiasis. Infect Immun. 2005; 71: 4040–4. <http://dx.doi.org/10.1128/IAI.71.7.4040-4044.2003>

RUTITZKY LI, STADECKER MJ. Exacerbated egg-induced immunopathology in murine *Schistosoma mansoni* infection is primarily mediated by IL-17 and restrained by IFN-gamma. Eur J Immunol. 2011; 41: 2677–87. <http://dx.doi.org/10.1002/eji.201041327>.

SÁ RD, SANTANA ASCO, SILVA FCL, SOARES LAL, RANDAU KP. Anatomical and histochemical analysis of *Dysphania ambrosioides* supported by light and electron microscopy, Rev Bras Farmacognosia, 2016; 26(5): pp. 533–543. <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2016.05.010>.

SADY H, AL-MEKHLAFI H, NGUI R, ATROOSH W, AL-DELAIFY A, NASR N, DAWAKI S, ABDULSALAM A, ITHOI I, LIM Y, CHUA K, SURIN J. Detection of *Schistosoma mansoni* and *Schistosoma haematobium* by real-time PCR with high resolution melting analysis. International Journal of Molecular Sciences 2015; 16: 16085–16103.

SAH VK, WANG L, MIN X, RIZAL R, FENG Z, KE Z, DENG M, LI L, LI H. Human schistosomiasis: A diagnostic imaging focused review of a neglected disease. Radiology of Infectious Diseases 2015; 2(1): 150-157.

SANTOS AM, MELO ACFL. Schistosomiasis prevalence in Tutóia village, Maranhão, Brazil. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 2011; 44 (1): 97-99.

SANTOS FK. Desenvolvimento e Caracterização de Carreadores Lipídicos Nanoestruturados contendo Praziquantel. Dissertação - Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2011. 83f.

SCHWARTZ C, FALLON PG. Schistosoma "Eggs-Itting" the Host: Granuloma Formation and Egg Excretion. *Frontiers in Immunology* 2018; 29 (9): 2492.

SCHWARTZ C, TURQUETI-NEVES A, HARTMANN S, YU P, NIMMERJAHN F, VOEHRINGER D. Basophil-mediated protection against gastrointestinal helminths requires IgE-induced cytokine secretion. *Proc. Nat. Acad. Scien.* 2014; 111: E5169-77. <https://doi.org/10.1073/pnas.1412663111>.

SEITZER U, HAAS H, GERDES J. Um modelo de granuloma humano in vitro para a investigação de células gigantes multinucleadas e formação de granuloma. *Histol Histopathol* 2001; 16: 645–653.

SERVIO EML, ARAUJO KS, NASCIMENTO LRS, COSTA CLS, MENDES LMS, FILHO ALMM. Wound healing using *Chenopodium ambrosioides* (mastruz) extract and sterile secondary coverage in rats. *ConScientiae S*, 10: 441–448; 2011.

SENNA L. *Chenopodium* in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 2010.

SETO EYW, WONG BK, LU D, ZHONG B. Human schistosomiasis resistance to praziquantel in China: Should we be worried?. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 2011; 85 (1): 74-82.

SHANE HL, VERANI JR, ABUDHO B, MONTGOMERY SP, BLACKSTOCK AJ, MWINZI PN, BUTLER SE, KARANJA DM, SECOR WE. Evaluation of urine CCA assays for detection of *Schistosoma mansoni* infection in Western Kenya. *PLOS Neglected Tropical Diseases* 2011; 5: e951.

SILVA MP, SILVA TM, MENGARDA AC, SALVADORI MC, TEIXEIRA FS, ALENCAR SM, LUZ FILHO GC, BUENO-SILVA B, MORAES J. Brazilian red propolis exhibits antiparasitic properties *in vitro* and reduces worm burden and egg production in an mouse model harboring either early or chronic *Schistosoma mansoni* infection. *J Ethnopharmacol* 2021; 264: 113387. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.113387>.

SIMOBEN CV, NTIE-KANG F, LIFONGO LL, BABIAKA SB, SIPPL W, MBAZE LM. The uniqueness and therapeutic value of natural products from West African medicinal plants, part III: least abundant compound classes. *RSC Adv* 2014; 4: 40095-40110. <http://doi.org/10.1039/c4ra05376a>.

SIMOBEN CV, NTIE-KANG F, AKONE SH, SIPPL W. Compounds from African Medicinal Plants with Activities against Protozoal Diseases: Schistosomiasis, Trypanosomiasis and Leishmaniasis. *Nat Prod Bioprospect* 2018; 8: 151–169. <http://doi.org/10.1007/s13659-018-0165-y>.

SINGH KP, GERARD HC, HUDSON AP, REDDY TR, BOROS DL. Retroviral Foxp3 gene transfer ameliorates liver granuloma pathology in *Schistosoma mansoni* infected mice. *Immunology*, 2005;114(3): 410-417.

SINGH P, PANDEY AK. *Dysphania ambrosioides* essential oils: from pharmacological agents to uses in modern crop protection—a review. *Phytochem Rev* 2022; 21:141–159. <https://doi.org/10.1007/s11101-021-09752-6>.

SMITH ORIENTAL BD. América do Norte como um centro independente de domesticação de plantas. *Prossiga Nat Acad Sci USA* 2006; 103: 12223-12228.

SOLOVIOVA K, FOX EC, DALTON JP, CAFFREY CR, DAVIES SJ. A secreted schistosome cathepsin B1 cysteine protease and acute schistosome infection induce a transient T helper 17 response. *PLoS Negl Trop Dis.* 2019; 13: e7070. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0007070>.

SOUSA JNL. Effect of topical administration of mastic (*Schinus terebinthifolius* Raddi) and of the mastruço (*Chenopodium ambrosioides* L.) in the repair process of reimplanted rat teeth. [dissertation]. Natal: Universidade Potiguar. 2010.

SOUSA LH, RIOS CE, ASSUNÇÃO AK, FIALHO EM, COSTA GC, NASCIMENTO FR. Avaliação da ação analgésica do extrato hidroalcoólico de *Chenopodium ambrosioides* L. em ensaios pré-clínicos. *Revista de Ciências da Saúde* 2012; 14 (1): 73-82.

SOUZA COS, GARDINASSI LG, RODRIGUES V, FACCIOLI LH. Monocyte and Macrophage-Mediated Pathology and Protective Immunity During Schistosomiasis. *Front. Microbiol.* 11:1973; 2020. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2020.01973>.

SOUZA FPC, VITORINO RR, COSTA AP, JÚNIOR FCF, SANTANA LA, GOMES AP. Esquistossomose mansônica: aspectos gerais, imunologia, patogênese e história natural. *Revista da Sociedade Brasileira de Clínica Médica* 2011; 9 (4): 300-7.

SPARG SG, VAN STADEN J, JAGER AK. Efficiency of traditionally used South African plants against schistosomiasis. *J Ethnopharmacol* 2000; 73: 209–214. [http://doi.org/10.1016/S0378-8741\(00\)00310-X](http://doi.org/10.1016/S0378-8741(00)00310-X).

STEINAUER ML. The sex lives of parasites: investigating the mating system and mechanisms of sexual selection of the human pathogen *Schistosoma mansoni* International journal for parasitology. NIH Public Access 2009; 39: 1157–63. doi: 10.1016/j.ijpara.2009.02.019.

SUKHORUKOV AP, KUSHUNINA M, EL MOKNI R, SÁEZ GOÑALONS L, EL AOUNI MH, DANIEL TF. Chorological and taxonomic notes on African plants, 3. *Bot. Lett.* 2018; 165(2): 228–240. <https://doi.org/10.1080/23818107.2018.1465467>.

SUKHORUKOV AP. The carpology of the Chenopodiaceae with reference to the phylogeny, systematics and diagnostics of its representatives 2014; Tula: Grif & K.

SYLLA A. Contribution à l'inventaire des Antibilharziens et Molluscicides Traditionnels dans le cercle de Kayes. Section de Pharmacie, Ecole Nationale de Médecine et de Pharmacie du Mali, Bamako, 1991; pp 87.

TCHUEM-TCHUENTÉ L-A, KUETÉ-FOUODO CJ, KAMWA-NGASSAM RI, SUMO L, DONGMO NOUMEDEM C, KENFACK CM, GIPWE NF, NANA ED, STOTHARD JR, ROLLINSON D. Evaluation of circulating cathodic antigen (CCA) urine-tests for diagnosis of *Schistosoma mansoni* infection in Cameroon. *PLOS Neglected Tropical Diseases* 2012; 6: e1758.

TEKWU EM, BOSOMPEM KM., ANYAN WK, APPIAH-OPONG R, BAFFOUR-AWUAH KO, TETTEY MD, KISSI FA, APPIAH AA, BENG VP, NYARKO AK. *In Vitro* Assessment of Anthelmintic Activities of *Rauwolfia vomitoria* (Apocynaceae) Stem Bark and Roots against Parasitic Stages of *Schistosoma mansoni* and Cytotoxic Study. J Parasitol Res 2017; 2017:1-11. <http://doi.org/10.1155/2017/2583969>.

TRIVELLATOGRASSI L et al. From popular use to pharmacological validation: a study of the anti-inflammatory, anti-nociceptive and healing effects of *Chenopodium ambrosioides* extract, J Ethnopharmacol 2013; 145(1): 127–138. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2012.10.040>.

TURNER JD, JENKINS GR, HOGG KG, AYNSLEY SA, PAVELEY RA, COOK PC, COLES MC, MOUNTFORD AP. CD4⁺CD25⁺ regulatory cells contribute to the regulation of colonic Th2 granulomatous pathology caused by schistosome infection. PLoS Neglected Tropical Diseases 2011; 5(8): e1269.

TURNER JD, NARANG P, COLES MC, MOUNTFORD AP. Blood flukes exploit Peyer's Patch lymphoid tissue to facilitate transmission from the mammalian host. PLoS Pathog. 2013; 8: e1003063.

UOTILA P, SUKHORUKOV AP, BOBON N, MCDONALD J, KRINITSINA AA, KADEREIT G. Phylogeny, biogeography and systematics of Dysphanieae (Amaranthaceae). Taxon, Systematics of Dysphanieae 2021; 00 (00): 1–26.

VALE N, GOUVEIA MJ, RINALDI G, BRINDLEY PJ, GÄRTNER F, CORREIA DA COSTA JM. Praziquantel for Schistosomiasis: Single-Drug Metabolism Revisited, Mode of Action, and Resistance. Antimicrob Agents Chemother 2017; 61 (5): e02582-16.

VAN DER VLUGT LEPM, LABUDA LA, OZIR-FAZALALIKHAN A, LIEVERS E, GLOUDEMANS AK, LIU KY, BARR TA, SPARWASSER T, BOON L, NGOA UA, FEUGAP EM, ADEGNIKA AA, KREMSNER PG, GRAY D, YAZDANBAKHS M, SMITS HH. Schistosomes induce regulatory features in human and mouse CD1dhi B Cells: inhibition of allergic inflammation by IL-10 and regulatory T cells. Plos One, 7: e30883; 2012. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0030883>.

VITORINO RR, SOUZA FPC, COSTA AP, FARIA-JÚNIOR FC, SANTANA LA, GOMES AP. Esquistossomose mansônica: diagnóstico, tratamento, epidemiologia, profilaxia e controle. Revista Brasileira de Clínica Médica 2012; 10 (1): 39-45.

WANG W, WANG L, LIANG YS. Susceptibility or resistance of praziquantel in human schistosomiasis: a review. Parasitology Research 2012; 111 (5): 1871-1877.

WEINSTOCK JV, BOROS DL. Organ-dependent differences in composition and function observed in hepatic and intestinal granulomas isolated from mice with Schistosomiasis mansoni. J Immunol. 1983; 130: 418–22.

WHITFIELD PJ, BARTLETT A, KHAMMO N, BRAIN AP, BROWN MB, MARRIOTT C, CLOTHIER R. Delayed tail loss during the invasion of human skin by schistosome cercariae. Parasitology 2003; 126: 135-140.

WILSON MS, MENTIK-KANE MM, PESCE JT, RAMALINGAN TR, THOMPSON R, WYNN TA. Immunopathology of schistosomiasis. Immunology & Cell Biology 2007; 85: 148-154.

WILSON RA. The saga of schistosome migration and attrition. *Parasitology* [Internet]. 2009; 136: 1581-1592. Available from: <https://www.cambridge.org/core/journals/parasitology/article/saga-of-schistosomemigration-and-attrition/70AC43F6399DC161E22443E0C2D9C545> [cited 2018 Sep 3].

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Preventive chemotherapy in human helminthiasis. Coordinated use of anthelmintic drugs in control interventions, a manual for health professionals and programme managers. 2006. Disponível em: http://whqlibdoc.who.int/publications/20/06/9241547103_eng.pdf. Accessed 7 Mar 2001. Acesso em: 02 de junho de 2018.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Schistosomiasis Fact Sheet (2018). Disponível em: <http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/schistosomiasis>>. Acesso em: 02 de maio de 2018.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Schistosomiasis [Internet]. Geneva: WHO; 2020 [cited 2020 Sep 18]. Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/schistosomiasis>.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Schistosomiasis. Geneva. 8 january, 2022.

WYNN TA, THOMPSON RW, CHEEVER AW, MENTINK-KANE MM. Immunopathogenesis of schistosomiasis. *Immunol Rev*. 2004; 201: 156-167.

WYNN TA. IL-13 effector functions. *Annu. Rev. Immunol.* 2003; 21: 425–56. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.immunol.21.120601.141142>.

YOUSIF F, WASSEL G, BOULOS L, LABIB T, MAHMOUD K, EL-HALLOUTY S, EL BARDICY S, MAHMOUD S, RAMZY F, GOHAR L, EL-MANAWATY M, EL GENDY MAM, FAYAD W, EL-MENSHAWI B. Contribution to *in vitro* screening of Egyptian plants for schistosomicidal activity. *Pharmaceutical Biology* 2012; 50: 732–739. <http://doi.org/10.3109/13880209.2011.625952>.

ZHANG YM, WANG YJ, JIANG YY, PAN W, LIU H, YIN J, SHEN Y, CAO J. T follicular helper cells in patients with acute schistosomiasis. *Parasites Vectors*. 2016; 9: 321. <http://dx.doi.org/10.1186/s13071-016-1602-6>

ZHENG B, ZANG J, CHEN H, NIE H, MILLER H, GONG Q, LIU C. Imunopatologia Hepática da Esquistossomose Mediada por Linfócitos T. *Front Immunol*. 2020; 11: 61. <http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2020.00061>. eCollection 2020.

ZHU D, SONG K, CHEN J, WANG J, SUN X, QIAN H, GU X, ZHANG L, QIN Y, DUAN Y. Expression of Septin 4 in *Schistosoma japonicum*-infected mouse livers after praziquantel treatment. *Parasit Vectors* 2015; 8: 196. <http://dx.doi.org/10.1186/s13071-015-0806>.

APÊNDICES

APÊNDICE A - Produções durante o doutorado

1. LIRA, MARIA GABRIELA SAMPAIO; NOGUEIRA, RANIELLY ARAUJO; LICÁ, IRLLA CORREIA LIMA; FRAZÃO, GLEYCKA CRISTINE CARVALHO GOMES; DOS SANTOS, VITOR AUGUSTO FERREIRA; MENDES, ANTONIO CAMILO CORREIA; RODRIGUES, JOÃO GUSTAVO MENDES; MIRANDA, GUILHERME SILVA; SILVA, LUCILENE AMORIM; GUERRA, ROSANE NASSAR MEIRELES; CARVALHO, RAFAEL CARDOSO; NASCIMENTO, FLÁVIA RAQUEL FERNANDES.

Immunomodulating and anti-parasitary mechanisms of plant products in the treatment of schistosomiasis. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, v. 33, p. 1-16, 2023.

2. LICÁ, IRLLA CORREIA LIMA; FRAZÃO, GLEYCKA CRISTINE CARVALHO GOMES ; NOGUEIRA, RANIELLY ARAUJO ; LIRA, MARIA GABRIELA SAMPAIO; DOS SANTOS, VITOR AUGUSTO FERREIRA ; RODRIGUES, JOÃO GUSTAVO MENDES; MIRANDA, GUILHERME SILVA; CARVALHO, RAFAEL CARDOSO; SILVA, LUCILENE AMORIM; GUERRA, ROSANE NASSAR MEIRELES ; NASCIMENTO, FLÁVIA RAQUEL FERNANDES . Immunological mechanisms involved in macrophage activation and polarization in schistosomiasis. *Parasitology*, v. 2023, p. 1-66, 2023.

3. RODRIGUES, JOÃO GUSTAVO MENDES; LIRA, MARIA GABRIELA SAMPAIO; NOGUEIRA, RANIELLY ARAÚJO; GOMES, GLEYCKA CRISTINE CARVALHO; LICÁ, IRLLA CORREIA LIMA; SILVA, JEFERSON KELVIN ALVES DE OLIVEIRA; MIRANDA, GUILHERME SILVA; SILVA-SOUZA, NÊUTON. Alterations in blood glucose concentration in wild rodents, *Holochilus sciureus*, naturally infected with *Schistosoma mansoni*. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinaria*, v. 31, p. e021921, 2022.

4. NOGUEIRA, RANIELLY ARAUJO; LIRA, MARIA GABRIELA SAMPAIO; LICÁ, IRLLA CORREIA LIMA; FRAZÃO, GLEYCKA CRISTINE CARVALHO GOMES; DOS SANTOS, VITOR AUGUSTO FERREIRA; FILHO, ANTONIO CAMILO CORREIA MENDES; RODRIGUES, JOÃO GUSTAVO MENDES; MIRANDA, GUILHERME SILVA; CARVALHO, RAFAEL CARDOSO; NASCIMENTO, FLÁVIA RAQUEL FERNANDES. Praziquantel: An update on the mechanism of its action against schistosomiasis and new therapeutic perspectives. *Molecular and Biochemical Parasitology*, v. 252, p. 111531, 2022.

5. NOGUEIRA, RANIELLY ARAUJO; **LIRA, MARIA GABRIELA SAMPAIO**; SANTOS, SARAH INGRID PINTO; MONDÊGO-OLIVEIRA, RENATA; ANDRADE, FÁBIO HENRIQUE EVANGELISTA DE; SOUSA, EDUARDO MARTINS DE; BARBOSA, DAVID SOEIRO; ABREU-SILVA, ANA LUCIA; CARVALHO, RAFAEL CARDOSO. Intense transmission of visceral leishmaniasis in a region of northeastern Brazil: a situation analysis after the discontinuance of a zoonosis control program. *REVISTA Brasileira de Parasitologia Veterinaria*, v. 30, p. 1-9, 2021.

6. RODRIGUES, JOÃO GUSTAVO MENDES; **LIRA, MARIA GABRIELA SAMPAIO**; NOGUEIRA, RANIELLY ARAÚJO; GOMES, GLEYCKA CRISTINE CARVALHO; LICÁ, IRLLA CORREIA LIMA; VIEGAS-MELO, DAVI; TELES-REIS, ANDREA; MIRANDA, GUILHERME SILVA; SILVA-SOUZA, NÊUTON. Effectiveness of a handmade shell-based substrate for the breeding of *Biomphalaria glabrata* under laboratory conditions. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v. 62, p. 1-6, 2020.

7. MORAIS, HEVILEM LETÍCIA MOURA DO NASCIMENTO; FEITOSA, TALITA CARNEIRO; RODRIGUES, JOÃO GUSTAVO MENDES; **LIRA, MARIA GABRIELA SAMPAIO**; NOGUEIRA, RANIELLY ARAÚJO; LUZ, TÁSSIO RÔMULO SILVA ARAÚJO; SILVA-SOUZA, NÊUTON; LIMA, NERILSON MARQUES; ANDRADE, TERESINHA DE JESUS AGUIAR DOS SANTOS; MIRANDA, GUILHERME SILVA. Hydroalcoholic extract of *Caryocar brasiliense* Cambess. leaves affect the development of *Aedes aegypti* mosquitoes. *Revista da Sociedade brasileira de medicina tropical*, v. 53, p. 1-7, 2020.

8. ALVES, RAYAN RUBENS DA SILVA; RODRIGUES, JOÃO GUSTAVO MENDES; TELES-REIS, ANDREA; NOGUEIRA, RANIELLY ARAÚJO; LICÁ, IRLLA CORREIA LIMA; **LIRA, MARIA GABRIELA SAMPAIO**; ALVES, RAYNARA DA SILVA; SILVA-SOUZA, NÊUTON; ANDRADE, TERESINHA DE JESUS AGUIAR DOS SANTOS; MIRANDA, GUILHERME SILVA. Antiparasitic effects of ethanolic extracts of and leaves on cercariae and adult worms of. *Parasitology (Cambridge. Online)*, v. 1, p. 1-41, 2020.

9. MIRANDA, GUILHERME SILVA; RODRIGUES, JOÃO GUSTAVO MENDES; **LIRA, MARIA GABRIELA SAMPAIO**; NOGUEIRA, RANIELLY ARAÚJO; GOMES, GLEYCKA CRISTINE CARVALHO; SILVA-SOUZA, NÊUTON. *Schistosoma mansoni*

Infection in *Holochilus sciureus* Shows Sex-Related Differences in Parasitological Patterns. Open Journal of Animal Sciences, v. 09, p. 173-182, 2019.

10. DO CARMO-SILVA, CARLA FERNANDA; TELES-REIS, ANDREA; SILVA-SOARES, RAYNARA FERNANDA; RODRIGUES, JOÃO GUSTAVO MENDES; **LIRA, MARIA GABRIELA SAMPAIO**; NOGUEIRA, RANIELLY ARAÚJO; VIEGAS-MELO, DAVI; CARDOSO, DIOGO TAVARES; MIRANDA, GUILHERME SILVA; SILVA-SOUZA, NÊUTON. Spatial and Seasonal Distribution of *Holochilus sciureus* with *Schistosoma mansoni* Infection in an Endemic Area for Schistosomiasis in Brazil. Acta Parasitologica, v. 2, p. 1, 2019.

11. SILVA-SOUZA, N.; SILVA, A. P. C.; OLIVEIRA, R. M.; **LIRA, M. G. S.**; NOGUEIRA, R. A.; PENHA-SILVA, T. A.; MELO, S. A.; ANDRADE, F. H. E.; CARVALHO NETA, A. V.; ABREU-SILVA, A. Parasitological and histological aspects of *Holochilus sciureus* naturally infected by *Schistosoma mansoni*. Revista Brasileira de Parasitologia Veterinaria, p. 769-772, 2019.

ANEXOS

ANEXO A – Certificado de Aprovação do Comitê de Ética da UFMA



UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA
CIAEP: 02.0341.2019



Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO***09/2020***

Certificamos que a proposta intitulada: "INVESTIGAÇÃO PARASITOLÓGICA E IMUNOLÓGICA EM CAMUNDONGOS INFECTADOS POR *Schistosoma mansoni* SAMBON, 1907", Processo n. 23115.002254/2020-18, sob a responsabilidade do Profa. Dra. Flávia Raquel Fernandes do Nascimento, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - 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 considerado APROVADO pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA - UFMA) da Universidade Federal do Maranhão, na reunião realizada em 21/02/2020.

We certify that the proposal: "PARASITOLOGICAL AND IMMUNOLOGICAL INVESTIGATION IN INFECTED MICE BY *Schistosoma mansoni* SAMBON, 1907", Process n. 23115.002254/2020-18, under the responsibility of Prof. Dr. Flávia Raquel Fernandes do Nascimento, which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, sub phylum Vertebrata (except humans beings) for scientific research purposes (or teaching) - is in accordance with Law No. 11,794, of October 8, 2008, Decree No. 6.899, of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was APPROVED by the Ethics Committee on Animals Use of the Federal University of Maranhão (CEUA - UFMA), in meeting of 02/21/2020.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**Área: **Ciências da Saúde**Vigência da Proposta: **01/08/2020 à 01/08/2024.**Origem: **Biotério Central da Universidade Federal do Maranhão**

		Amostra	
Espécie	Camundongos	Sexo	Macho
	<i>Mus musculus</i>	Idade	60 a 90 dias
		Peso	20-25g
			316

Linhagem/Raça: **Swiss**

Local do experimento: Biotério Setorial da Pós-Graduação do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde - CCBS/UFMA.

São Luís, 28 de abril de 2020.

Prof. Dr. Rafael Cardoso Carvalho
Presidente da Comissão de Ética no uso de Animais - CEUA/UFMA

ANEXO B – Comprovação de financiamento de pesquisa

	ESTADO DO MARANHÃO FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA E AO DESENVOLVIMENTO CIENTÍFICO E TECNOLÓGICO DO MARANHÃO TERMO DE OUTORGA - ACEITAÇÃO DE AUXÍLIO		Processo UNIVERSAL-01001/19
	IDENTIFICAÇÃO DO OUTORGANTE		
NOME: FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA E AO DESENVOLVIMENTO CIENTÍFICO E TECNOLÓGICO DO MARANHÃO (www.fapema.br)			
LEGISLAÇÃO: LEI COMPLEMENTAR Nº 060 DE 31 DE JANEIRO DE 2003.			
ENDEREÇO: Rua Perdizes, nº 05, Qd 37,		BAIRRO / CEP: Jardim Renascença / 65075-340	
RESPONSÁVEL: André Luis Silva dos Santos		CARGO: DIRETOR-PRESIDENTE	
IDENTIFICAÇÃO DO OUTORGADO			
NOME: Flávia Raquel Fernandes do Nascimento			
CPF: 488.271.693-34		IDENTIDADE: 1010087748	
BANCO: Brasil		Nº AGÊNCIA: 4445-8	Nº CONTA: 26494-6
INSTITUIÇÃO: UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO			
DEPARTAMENTO: Departamento de Patologia			
ENDEREÇO: AV MONÇÃO, N01, CONDOMÍNIO DUBAI, BL SAFIRA, APT0 406		BAIRRO: JARDIM RENASCENÇA	CIDADE: SÃO LUÍS
CEP: 65.075-692		U.F.: MARANHÃO	FONE FIXO
ENDEREÇO ELETRÔNICO: FLAVIA.NASCIMENTO@UFMA.BR			
IDENTIFICAÇÃO DO AUXÍLIO			
UNIVERSAL-01001/19		VIGÊNCIA: 06/11/2020 a 06/11/2022	
MODALIDADE: UNIVERSAL - APOIO A PROJETO DE PESQUISA - UNIVERSAL		EDITAL FAPEMA Nº 002/2019 - UNIVERSAL	
TÍTULO DO PROJETO: INVESTIGAÇÃO DO POTENCIAL IMUNOMODULADOR DE DYSPHANIA AMBROSIOIDES (L.) MOSYAKIN & CLEMANTS (MASTRUZ) NA ESQUISTOSSOMOSE EXPERIMENTAL			
ÁREA / SUBÁREA : Ciências Biológicas / IMUNOLOGIA			
VALOR DO AUXÍLIO A SER PAGO			
DATA LIMITE - RELATÓRIO TÉCNICO / PRESTAÇÃO DE CONTAS	NÚMERO DE PARCELA(S)	VALOR TOTAL	
06/12/2022	01	R\$ 35.000,00	