



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

**EFEITO DO TRATAMENTO COM PRODUTOS NATURAIS  
IMUNOMODULADORES EM CAMUNDONGOS INFECTADOS  
POR *Schistosoma mansoni***

VITOR AUGUSTO FERREIRA DOS SANTOS

São Luís - MA

2024

VITOR AUGUSTO FERREIRA DOS SANTOS

**EFEITO DO TRATAMENTO COM PRODUTOS NATURAIS  
IMUNOMODULADORES EM CAMUNDONGOS INFECTADOS  
POR *Schistosoma mansoni***

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

**Orientadora:** Profa. Dra. Flávia Raquel Fernandes do Nascimento.

**Coorientadora:** Profa. Dra. Rosane Nassar Meireles Guerra.

**Áreas de concentração:** Biotecnologia de produtos naturais/ Pesquisa Básica e Clínica de Doenças Infecciosas e Parasitárias.

São Luís - MA

2024

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

Ferreira dos Santos, Vitor Augusto.

EFEITO DO TRATAMENTO COM PRODUTOS NATURAIS  
IMUNOMODULADORES EM CAMUNDONGOS INFECTADOS POR *Schistosoma*  
*mansoni* / Vitor Augusto Ferreira dos Santos. - 2024.  
167 p.

Coorientador(a) 1: Rosane Nassar Meireles Guerra.

Orientador(a): Flávia Raquel Fernandes do Nascimento.

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

1. *Schistosoma Mansoni*. 2. Inflamação Granulomatosa.  
3. *Dysphania Ambrosioides*. 4. Associação Praziquantel.  
5. Própolis. I. Fernandes do Nascimento, Flávia Raquel.  
II. Nassar Meireles Guerra, Rosane. III. Título.

VITOR AUGUSTO FERREIRA DOS SANTOS

**EFEITO DO TRATAMENTO COM PRODUTOS NATURAIS  
IMUNOMODULADORES EM CAMUNDONGOS INFECTADOS  
POR *Schistosoma mansoni***

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

Aprovada em     /     /

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dra. Flávia Raquel Fernandes do Nascimento  
Universidade Federal do Maranhão

---

1º Examinador (nome) Instituição do Examinador

---

2º Examinador (nome) Instituição do Examinador

---

3º Examinador (nome) Instituição do Examinador

---

4º Examinador (nome) Instituição do Examinador

“Em seu coração o homem planeja o seu caminho,  
mas o Senhor determina os seus passos”

Provérbios 16:9

## AGRADECIMENTOS

À Deus por toda força, pois o Senhor, a cada dia me motivou a suportar todo esse processo. Aos meus pais, Marineide Ferreira, Cláudio Moraes, Cleiton de Nazaré, aos meus avós, José Ribamar e Ana Lize, as minhas amadas tias, Marilete Ferreira e Kátia Cilene, aos meus Irmãos Cláudio Junior e André, e de todo o restante da família, muito obrigado pelo incentivo, vocês são minha base.

Às Professoras Dra. Fátia Nascimento e Dra. Rosane Guerra, a qual sou extremamente grato por estar sob suas orientações durante o mestrado e doutoramento.

Prof. Dra. Fátia Nascimento sou muito grato a você por tudo, você é um dos meus lindos girassóis!

Prof. Dra. Rosane Guerra tenho muito a agradecer a você, em 2017, você que abriu as portas do LIF quando iniciei essa jornada, sendo seu aluno de iniciação científica, obrigado por toda confiança e ensinamentos. Você é fantástica!

Durante essa jornada tive o privilégio de conhecer grandes amigos de laboratório e da vida, a Danielle Franco, Regis Farias e Alex Brall. Nossa jornada iniciou-se juntos em 2017 sob orientação da prof. Rosane, eu sempre digo que, tive uma sorte tremenda de iniciar essa jornada com esse quarteto. Vocês estão em meu coração.

Às Dra. Irilla Licá, Dra. Raniely Araújo, Dra. Gabreila Lira e Msc Gleycka Cristine que estiveram comigo durante toda essa jornada, obrigado por tudo minha equipe (Mansonicos).

Ao Dr. Gustavo Rodrigues, esse jovem sonhador que iniciou toda essa jornada, contribuindo para a formação de novos doutores. Além de toda sua contribuição nos ensaios experimentais.

Às Professoras Dra. Lucile Amorim, Mayara, Thyare por toda parceria e apoio na realização dos ensaios experimentais.

À Dra Andresa Berretta, responsável pelo desenvolvimento e caracterização do extrato EPP-AF® e por toda a colaboração ao longo destes anos. A todos os estudantes e pesquisadores do LIF por tornarem o nosso laboratório um ambiente de trabalho amigável.

A todos os pesquisadores integrantes das minhas bancas de qualificação de mestrado, doutorado e defesa de doutorado por aceitarem fazer parte dessa jornada e pelas valiosas contribuições.

Ao Biotério por todo apoio e colaboração para a realização deste trabalho.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde (PPGCS) e a todos os membros da secretaria acadêmica por todo suporte.

A Universidade Federal do Maranhão, Laboratório de Imunofisiologia, FAPMA, CNPq e CAPES pelo suporte técnico e financeiro.

E mais uma vez, meu agradecimento especial a minha amada Mãe, a dona Marineide, sem ela eu não seria nada. Obrigado por tudo meu amor.

Obrigado!

## SUMÁRIO

|                                                                                                                                                                                                              |            |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| <b>1. Introdução Geral.....</b>                                                                                                                                                                              | <b>17</b>  |
| <b>2. Rerefencial teórico.....</b>                                                                                                                                                                           | <b>19</b>  |
| 2.1 Aspectos gerais da esquistossomose .....                                                                                                                                                                 | 19         |
| 2.1.1 Ecoepidemiologia da esquistossomose no Mundo .....                                                                                                                                                     | 19         |
| 2.1.2 Esquistossomose no Brasil: <i>Schistosoma mansoni</i> .....                                                                                                                                            | 22         |
| 2.1.3 Ciclo biológico de <i>Schistosoma mansoni</i> .....                                                                                                                                                    | 25         |
| 2.1.4 Imunopatogênese da Esquistossomose.....                                                                                                                                                                | 26         |
| 2.2 Praziquantel.....                                                                                                                                                                                        | 32         |
| 2.2.1 Fármaco de escolha para o tratamento da esquistossomose.....                                                                                                                                           | 32         |
| 2.2.2 Mecanismo de ação do Praziquantel.....                                                                                                                                                                 | 32         |
| 2.2.3 Efeitos adversos do fármaco praziquantel.....                                                                                                                                                          | 33         |
| 2.3 Produtos naturais.....                                                                                                                                                                                   | 34         |
| 2.4 <i>Dysphania ambrosioides</i> : Taxonomia e características botânicas-geográficas.....                                                                                                                   | 35         |
| 2.4.1 Taxonomia de <i>Dysphania ambrosioides</i> (L.) Mosyakin & Clemants.....                                                                                                                               | 35         |
| 2.4.2 Características morfológicas da espécie <i>Dysphania ambrosioides</i> (Aspectos<br>macroscópicos) .....                                                                                                | 36         |
| 2.4.3 Distribuição geográfica da espécie <i>Dysphania ambrosioides</i> .....                                                                                                                                 | 37         |
| 2.4.4 Propriedades farmacológicas de <i>Dysphania ambrosioides</i> .....                                                                                                                                     | 38         |
| 2.5 Própolis verde.....                                                                                                                                                                                      | 41         |
| 2.5.1 Propriedade anti-inflamatória e mecanismos imunomoduladores da própolis.....                                                                                                                           | 42         |
| <b>3. Objetivos.....</b>                                                                                                                                                                                     | <b>45</b>  |
| 3.1 Geral.....                                                                                                                                                                                               | 45         |
| 3.2 Específicos.....                                                                                                                                                                                         | 45         |
| <b>4. Resultados.....</b>                                                                                                                                                                                    | <b>46</b>  |
| <b>4.1 Capítulo I:</b> O uso de <i>Dysphania ambrosioides</i> associada ou não com Praziquantel reduz a<br>carga parasitária e danos inflamatórios na fase aguda e crônica na esquistossomose experimental.. | 46         |
| <b>4.1.1 Manuscrito I.....</b>                                                                                                                                                                               | <b>47</b>  |
| <b>4.2 Capítulo II:</b> O uso do EPP-AF® reduz a carga parasitária na fase inicial da infecção e o perfil<br>inflamatório na fase crônica da infecção.....                                                   | 84         |
| <b>4.2.1 Manuscrito II.....</b>                                                                                                                                                                              | <b>85</b>  |
| <b>4.3 DAados complementares.....</b>                                                                                                                                                                        | <b>120</b> |
| 4.3. Correlações entre parâmetros parasitológicos e imunológicos.....                                                                                                                                        | 120        |

|                                                        |            |
|--------------------------------------------------------|------------|
| 4.3.2 Efeito do EPP-AF® em camundongos saudáveis.....  | 128        |
| <b>5 Conclusão Geral.....</b>                          | <b>145</b> |
| <b>Rererências.....</b>                                | <b>146</b> |
| <b>Apêndice A - Produção científica 2021-2024.....</b> | <b>166</b> |
| <b>Anexo.....</b>                                      | <b>167</b> |

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

**°C:** Grau Celsius

**%:** Percentual

**ALT:** Alanina aminotransferase

**AST:** Aspartato aminotransferase

**CEUA:** Comitê de Ética para o Uso de Animais

**CN:** Controle negativo

**CP:** Controle positivo

**CAT:** Enzima catalase

**CXCL:** Quimiocina

**COX-2:** Ciclo-oxigenase-2

**CO2:** Dióxido de carbono

**DTNs:** Doenças Tropicais Negligenciadas

**DSS:** Dextrano Sulfato de sódio

**EPP-AF®:** Extrato padronizado de própolis de *Apis mellifera*

**EHDA:** Extrato hidroalcólico de *Dysphania ambrosioides*

**ERK:** Quinase reguladora por sinal extracelular

**ELISA:** Ensaio imunoabsorvente ligado à enzima

**EPO:** Peroxidase eosinofílica

**FCA:** Adjuvante completo de Freund

**FOXP3:** Fator de transcrição

**GPx:** Glutathione peroxidase eritrocitaria

**GBD:** Carga Global de Doenças, do inglês *Global Burden of Disease*

**GCLM:** Glutamato cisteína



**g:** Gramas

**HO-1:** Heme oxigenase 1

**IFN- $\gamma$ :** Interferon-gama

**IgE:** Imunoglobulina E

**IGF:** Fator de crescimento

**IL:** Interleucina

**IV:** 4 (quatro)

**iNOS:** Óxido nítrico sintase indutível

**IFN:** Infectado

**KOH:** Hidróxido de potássio

**Kg:** Kilograma

**LE:** Linhagem de *S. mansoni* isolada de humano

**LPS:** Lipopolissacarídeo

**mM:** Milimolar

**MMP:** Colágeno

**M2:** Macrófagos do tipo 2/ Alternativamente Ativado

**MAR:** Herbário do Maranhão

**MPO:** Mieloperoxidase

**mL:** Mililitro

**Mg** Miligrama

**MIP:** Quimiocina

**Mm<sup>2</sup>** Milímetro quadrado

**Nrf2:** Fator nuclear derivado de eritróide

**NaCl:** Cloreto de sódio

**NQO1:** Quinona axidorredutase-1

**NO:** Óxido nítrico

**OPG:** Ovos por Grama de Fezes

**PBS:** Tampão fosfato de Sódio

**PZQ:** Praziquantel

**pg:** Picograma

**PCR-Hs:** Proteína C Reativa

**PVHA:** Pessoas vivendo com HIV/Aids

**PGE2:** Prostaglandina 2

**PBMCs:** Célula mononuclear do sangue periférico

**RPMI:** Meio para cultura celular

**RENISUS:** Relação nacional de plantas medicinais de interesse ao sistema único de saúde

**SOD:** Superóxido dismutase

**SEA:** Antígenos solúveis presentes no ovo

**TARV:** Terapia antirretroviral

**TGF:** Fator transformador de crescimento

**TCD4+:** Linfócitos T auxiliares/helper

**TCD8+:** Linfócitos T citotóxicos

**Th:** Linfócitos T *helper*

**TNF- $\alpha$ :** Fator de necrose tumoral alfa

**$\mu$ g:** Microlitro

**OMS/WHO:** Organização Mundial de Saúde, do inglês *World Health Organization*

## LISTA DE TABELAS E QUADROS

### Referencial Teórico

|                     |                                                                                                                                                                                                    |    |
|---------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tabela 1</b>     | Potencial farmacológico de extratos de <i>Dysphania ambrosioides</i> comprovado cientificamente disponível na literatura.....                                                                      | 38 |
| <b>Tabela 2</b>     | Potencial farmacológico do óleo essencial da espécie <i>Dysphania ambrosioides</i> comprovado cientificamente disponível na literatura.....                                                        | 40 |
| <b>Manuscrito I</b> |                                                                                                                                                                                                    |    |
| <b>Tabela 1</b>     | Análise histopatológica do fígado de camundongos infectados ou não por <i>S. mansoni</i> , não tratados ou tratados com EHDA e EHDA+PZQ.....                                                       | 58 |
| <b>Tabela 2</b>     | Análise histopatológica do intestino de camundongos infectados ou não por <i>S. mansoni</i> , não tratados ou tratados com EHDA e EHDA+PZQ.....                                                    | 61 |
| <b>Tabela 3</b>     | Análise histopatológica do rim de camundongos infectados ou não por <i>S. mansoni</i> , não tratados ou tratados com EHDA e EHDA+PZQ.....                                                          | 62 |
| <b>Tabela 4</b>     | Percentual total e diferencial das populações de leucócitos sanguíneos em camundongos infectados por <i>S. mansoni</i> e tratados nos primeiros 30 dias com EHDA ou em associação (EHDA+PZQ) ..... | 63 |

|                 |                                                                                                                                                                                                 |
|-----------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Tabela 5</b> | Percentual total e diferencial das populações de leucócitos sanguíneos aos 90 dias após tratamento com EHDA ou em associação (EHDA+PZQ) em camundongos infectados por <i>S. mansoni</i> .....63 |
| <b>Tabela 6</b> | Contagem global de leucócitos da medula óssea e baço de camundongos após tratamento com EHDA ou em associação (EHDA+PZQ) .....66                                                                |
| <b>Tabela 7</b> | Contagem global e diferencial de leucócitos da cavidade peritoneal de camundongos após tratamento com EHDA ou em associação (EHDA+PZQ).66                                                       |

## **Manuscrito II**

|                 |                                                                                                                                         |
|-----------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Tabela 1</b> | Análise histopatológica do tecido hepático de camundongos infectados ou não por <i>S. mansoni</i> , tratados ou não com EPP-AF®.....95  |
| <b>Tabela 2</b> | Análise histopatológica do intestino de camundongos infectados ou não por <i>S. mansoni</i> , e tratados ou não com EPP-AF®.....98      |
| <b>Tabela 3</b> | Análise histopatológica do rim de camundongos infectados ou não por <i>S. mansoni</i> , tratados ou não com EPP-AF®.....100             |
| <b>Tabela 4</b> | Percentual total e diferencial de leucócitos do sangue de camundongos infectados após uso de EPP-AF® nos primeiros 30 dias.....102      |
| <b>Tabela 5</b> | Percentual total e diferencial de leucócitos do sangue de camundongos infectados e após a suplementação com EPP-AF® aos 90 dias.....103 |
| <b>Tabela 6</b> | Contagem global de leucócitos da medula óssea e peritônio de camundongos após uso de EPP-AF®.....105                                    |

## **Dados complementares**

|                 |                                                                                                          |
|-----------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Tabela 1</b> | Análise da contagem celular com 30 e 90 dias no sangue.....138                                           |
| <b>Tabela 2</b> | Contagem global de leucócitos da medula óssea e peritônio de camundongos após a o uso de EPP-AF®.....138 |

## **LSTA DE FIGURAS**

### **Referencial Teórico**

|                 |                                                                                                             |
|-----------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Figura 1</b> | Distribuição mundial de algumas espécies de <i>Schistosoma</i> capazes de infectar humanos.....20           |
| <b>Figura 2</b> | Distribuição geográfica da esquistossomose, de acordo com a faixa de positividade mundialmente, 2018.....21 |
| <b>Figura 3</b> | Distribuição geográfica da esquistossomose, de acordo com a faixa de positividade na América do Sul.....22  |

|                  |                                                                                                                                                                                                 |    |
|------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 4</b>  | Mapa densidade de casos de esquistossomose por município no estado do Maranhão, 2007 a 2016.....                                                                                                | 24 |
| <b>Figura 5</b>  | Ciclo biológico de <i>S. mansoni</i> .....                                                                                                                                                      | 25 |
| <b>Figura 6</b>  | Resposta imune durante infecção por <i>S. mansoni</i> .....                                                                                                                                     | 28 |
| <b>Figura 7</b>  | Representação esquemática mostrando o desenvolvimento e a composição celular (painel direito) do granuloma ao redor dos ovos do <i>Schistosoma</i> .....                                        | 30 |
| <b>Figura 8</b>  | Representação gráfica das populações celulares envolvidas na formação do granuloma hepático ao redor do ovo de <i>S. mansoni</i> em um camundongo com ausência e presença de células TCD4+..... | 31 |
| <b>Figura 9</b>  | Espécie vegetal <i>Dysphania ambrosioides</i> .....                                                                                                                                             | 36 |
| <b>Figura 10</b> | <i>Dysphania ambrosioides</i> . A. Hábito; B. Face adaxial da folha; C. Folhas e inflorescência; D. Sementes.....                                                                               | 37 |
| <b>Figura 11</b> | Distribuição de <i>Dysphania ambrosioides</i> pelo Brasil.....                                                                                                                                  | 38 |

## **Manuscrito I**

|                 |                                                                                                                                                                                      |    |
|-----------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 1</b> | Delineamento experimental dos grupos tratados ou não.....                                                                                                                            | 51 |
| <b>Figura 2</b> | Efeito do EHDA e da sua associação ao Praziquantel (EHDA + PZQ) sobre o número de ovos liberados por camundongos infectados por <i>S. mansoni</i> .....                              | 55 |
| <b>Figura 3</b> | Efeito do EHDA e da sua associação ao Praziquantel (EHDA + PZQ) sobre o número de ovos retidos no fígado e intestino de camundongos infectados por <i>S. mansoni</i> .....           | 56 |
| <b>Figura 4</b> | Efeito do EHDA e da sua associação ao Praziquantel (EHDA+PZQ) sobre o fígado. Número de granulomas hepáticos e fotomicrografias do tecido hepático.....                              | 59 |
| <b>Figura 5</b> | Efeito do EHDA e da sua associação ao Praziquantel sobre o diâmetro dos granulomas hepáticos e fotomicrografias do fígado.....                                                       | 60 |
| <b>Figura 6</b> | Variação do número de eosinófilos 30 e 90 dias.....                                                                                                                                  | 64 |
| <b>Figura 7</b> | Concentrações séricas de IgE total de camundongos limpos e infectados por <i>S. mansoni</i> , ausente de tratamento ou tratados com EHDA ou em associação (EHDA+PZQ) .....           | 65 |
| <b>Figura 8</b> | Celularidade e caracterização fenotípica do baço de camundongos infectados ou não por <i>S. mansoni</i> não tratados ou tratados com EHDA ou EHDA+PZQ.....                           | 68 |
| <b>Figura 9</b> | Efeito do uso de EHDA e da associação com Praziquantel (EHDA + PZQ) sobre as concentrações séricas de citocinas pró-inflamatórias em sobrenadante de cultura de células do baço..... | 69 |

|                      |                                                                                                                                                                       |
|----------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Figura 10</b>     | Efeito do EHDA e da associação com PZQ (EHDA + PZQ) sobre as concentrações séricas de citocinas regulatórias no baço.....70                                           |
| <b>Manuscrito II</b> |                                                                                                                                                                       |
| <b>Figura 1</b>      | Delineamento experimental dos grupos não tratados ou tratados com EPP-AF.....90                                                                                       |
| <b>Figura 2</b>      | Efeito do extrato padronizado de própolis de <i>Apis mellifera</i> (EPP-AF®) na viabilidade de vermes fêmeas adultas de <i>S. mansoni</i> .....93                     |
| <b>Figura 3</b>      | Efeito EPP-AF® sobre o número de ovos nas fezes, área sob a curva, número de ovos no fígado e intestino.....94                                                        |
| <b>Figura 4</b>      | Efeito do EPP-AF® sobre o número de granulomas (A) e diâmetro médio de granulomas (E) no tecido hepático de camundongos infectados com <i>S. mansoni</i> .....97      |
| <b>Figura 5</b>      | Efeito do EPP-AF® sobre o número de granulomas (A) e diâmetro médio de granulomas (E) em tecidos do intestino de camundongos infectados com <i>S. mansoni</i> .....99 |
| <b>Figura 6</b>      | . Efeito do EPP-AF® sobre o número de granulomas (A) e diâmetro médio de granulomas (E) em tecidos do rim de camundongos infectados com <i>S. mansoni</i> .....101    |
| <b>Figura 7</b>      | Eosinofilia sanguínea. Percentual de eosinófilo aos 30 e 90 dias.....104                                                                                              |
| <b>Figura 8</b>      | Imunofenotipagem do baço de camundongos infectados ou não por <i>S. mansoni</i> , e tratados ou não.....106                                                           |
| <b>Figura 9</b>      | Efeito do EPP-AF® sobre os níveis de citocinas pró-inflamatória no baço.107                                                                                           |
| <b>Figura 10</b>     | Efeito do EPP-AF® sobre os níveis de citocinas anti-inflamatórias.....108                                                                                             |

#### **Dados complementares – Correlações**

|                 |                                                                                                                                                                                                        |
|-----------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Figura 1</b> | Correlações eosinófilo e ovos fezes INF (A) e EPP-AF® (B), Correlações eosinófilo e ovos fígado INF (C) e EPP-AF® (D), Correlações eosinófilo e ovos intestino INF (E) e EPP-AF® (F) .....120          |
| <b>Figura 2</b> | Correlações eosinófilo e número de granulomas hepáticos INF (A) EPP-AF® (B) e área de granuloma hepático INF (A) EPP-AF® (B) .....121                                                                  |
| <b>Figura 3</b> | Correlações entre o número de granulomas hepáticos e IgE total. INF (A) EPP-AF® (B) .....121                                                                                                           |
| <b>Figura 4</b> | Correlações entre IgE total e eosinófilo. INF (A) EPP-AF® (B) .....122                                                                                                                                 |
| <b>Figura 5</b> | Correlações IL-17 e ovos fezes INF (A) e EPP-AF® (B), correlações IL-17 e ovos fígado INF (C) e EPP-AF® (D), correlações IL-17 e ovos intestino INF (E) e EPP-AF® (F) .....123                         |
| <b>Figura 6</b> | Correlações TNF- $\alpha$ e ovos fezes INF (A) e EPP-AF® (B), correlações TNF- $\alpha$ e ovos fígado INF (C) e EPP-AF® (D), correlações TNF- $\alpha$ e ovos intestino INF (E) e EPP-AF® (F) .....124 |
| <b>Figura 7</b> | Correlações IFN- $\gamma$ e ovos fezes INF (A) e EPP-AF® (B), correlações IFN- $\gamma$ e ovos fígado INF (C) e EPP-AF® (D), correlações IFN- $\gamma$ e ovos intestino INF (E) e EPP-AF® (F) .....124 |
| <b>Figura 8</b> | Correlações IL-2 e ovos fezes INF (A) e EPP-AF® (B), correlações IL-2 e ovos fígado INF (C) e EPP-AF® (D), correlações IL-2 e ovos intestino INF (E) e EPP-AF® (F) .....125                            |

|                                           |                                                                                                                                                 |
|-------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Figura 9</b>                           | Correlações eosinófilo e ovos fígado CN (A), PZQ (B), EHDA (C) e EHDA+PZQ (D) .....126                                                          |
| <b>Figura 10</b>                          | Correlações citocina IL-17 e ovos intestino CN (A), PZQ (B), EHDA (C) e EHDA+PZQ (D) .....127                                                   |
| <br><b>Dados complementares – EPP-AF®</b> |                                                                                                                                                 |
| <b>Figura 1</b>                           | Delineamento experimental da suplementação com EPP-AF® por 30 dias.....132                                                                      |
| <b>Figura 2</b>                           | Peso e Análise macroscópica dos órgãos.....135                                                                                                  |
| <b>Figura 3</b>                           | Fotomicrografias de cortes histológicos do grupo controle e EPP-AF®...137                                                                       |
| <b>Figura 4</b>                           | Celularidade e caracterização fenotípica do baço de camundongos que reeberam ou não EPP-AF®.....139                                             |
| <b>Figura 5</b>                           | Efeito do EPP-AF® sobre o nível de citocina anti-inflamatória e quimiocina em sobrenadante de cultura de células do baço de camundongos.....140 |

## RESUMO

A esquistossomose mansoni é uma doença que tem como agente etiológico o parasito *Schistosoma mansoni*. Esta infecção provoca milhões de mortes anualmente, apesar do avanço da ciência, a terapia ainda se encontra limitada, baseada apenas no uso do fármaco Praziquantel. Nosso estudo objetivou avaliar os efeitos do uso de produtos naturais imunomoduladores em camundongos infectados por *Schistosoma mansoni*. Avaliamos o extrato hidroalcoólico das folhas de *D. ambrosioides* (EHDA) e de sua combinação com Praziquantel, assim como o extrato padronizado de própolis verde (EPP-AF®). Este trabalho foi dividido em 2 capítulos, o capítulo I aborda o efeito anti-Schistosoma do extrato de *D. ambrosioides* e da sua combinação com PZQ *in vivo*. Os resultados demonstram que o EHDA e a combinação EHDA+PZQ reduziu o número de ovos de nas fezes, fígado, intestino, danos teciduais no fígado, intestino, rim e reduziu o número e área de granulomas no fígado. Aos 30 e 90 dias ambos os grupos reduziram a eosinofilia sanguínea assim como reduziu a celularidade da medula óssea, lavado peritoneal e do baço. No baço, o grupo EHDA reduziu CD3 +, aumentou F480 + e LY6G + e reduziu IL-6 e IL-4. O grupo EHDA+PZQ reduziu o número de CD3 +, aumentou o número de CD19 + e F480 + e reduziu IL-2, IL-4 e a quimiocina MIP-1. O capítulo 2 aborda o tratamento com EPP-AF® *in vitro* e *in vivo*. *in vitro*, nossos resultados mostram que a concentração de 250 µg/mL reduziu a viabilidade dos vermes e apresentou efeito letal as 36 horas. *In vivo*, os resultados mostram que o EPP-AF® reduziu o número de ovos nas fezes, fígado e intestino, assim como os danos histopatológicos no fígado, intestino e rim, o número e diâmetro médio dos granulomas. Aos 30 e 90 dias, reduziu a eosinofilia sanguínea e imunorregulou a celularidade da medula óssea, peritônio e baço. No baço, o EPP-AF® reduziu F480 + e estimulou CD170 +, reduziu as citocinas IFN-γ, IL-2, IL-6, aumentou IL-10 e reduziu a quimiocina MIP-1. Este estudo demonstra que o EHDA e a combinação EHDA+PZQ, assim como o EPP-AF®, possui atividade anti-helmíntica e imunomoduladora eficaz contra as diferentes fases da infecção por *S. mansoni*. Retardando a oviposição e reduzindo a carga parasitária. Além disso, o extrato modula o perfil inflamatório, reduzindo os danos histopatológicos e melhorando o quadro clínico da esquistossomose.

**Palavras-chave:** *Schistosoma mansoni*; Inflamação granulomatosa; *Dysphania ambrosioides*; Associação praziquantel, Própolis

## ABSTRACT

*Schistosomiasis mansoni* is a disease caused by the parasite *Schistosoma mansoni*. This infection causes millions of deaths annually. Despite advances in science, therapy is still limited, based solely on the use of the drug Praziquantel. Our study aimed to evaluate the effects of the use of natural immunomodulatory products in mice infected with *Schistosoma mansoni*. We evaluated the hydroalcoholic extract of *D. ambrosioides* leaves (EHDA) and its combination with Praziquantel, as well as the standardized green propolis extract (EPP-AF®). This work was divided into 2 chapters, Chapter I addresses the anti-Schistosoma effect of *D. ambrosioides* extract and its combination with PZQ *in vivo*. The results demonstrate that EHDA and the combination EHDA+PZQ reduced the number of eggs in the feces, liver, intestine, tissue damage in the liver, intestine, and kidney, and reduced the number and area of granulomas in the liver. At 30 and 90 days, both groups reduced blood eosinophilia as well as reduced cellularity of bone marrow, peritoneal lavage, and spleen. In the spleen, the EHDA group reduced CD3+, increased F480+ and LY6G+, and reduced IL-6 and IL-4. The EHDA+PZQ group reduced the number of CD3+, increased the number of CD19+ and F480+, and reduced IL-2, IL-4, and the chemokine MIP-1. Chapter 2 addresses the treatment with EPP-AF® *in vitro* and *in vivo*. *In vitro*, our results show that the concentration of 250 µg/mL reduced the viability of the worms and had a lethal effect at 36 hours. *In vivo*, the results show that EPP-AF® delayed oviposition and reduced the number of eggs in the feces, liver and intestine. It reduced histopathological damage in the liver, intestine and kidney, in addition to reducing the number and mean diameter of granulomas. At 30 and 90 days, it reduced blood eosinophilia and immunoregulated the cellularity of the bone marrow, peritoneum and spleen. In the spleen, EPP-AF® reduced F480+ and stimulated CD170+, reduced the cytokines IFN-γ, IL-2, IL-6, increased IL-10 and reduced the chemokine MIP-1. This study demonstrates that EHDA and the combination EHDA+PZQ, as well as EPP-AF®, have effective anthelmintic and immunomodulatory activity against the different phases of *S. mansoni* infection. Delaying oviposition and reducing the parasite load. In addition, the extract modulates the inflammatory profile, reducing histopathological damage and improving the clinical picture of schistosomiasis.

**Keywords:** *Schistosoma mansoni*; Granulomatous inflammation; *Dysphania ambrosioides*; Praziquantel association, Propolis



## 1. INTRODUÇÃO GERAL

A esquistossomose humana é uma doença causada por vermes parasitos trematódeos, pertencentes ao gênero *Schistosoma*. Este grupo de parasitos representam um grande problema de saúde em diversos países. É estimado que, aproximadamente, 230 a 250 milhões de casos anualmente em 78 países da África, Ásia e América do Sul (STEINMANN et al., 2006; McMANUS et al., 2018; WEI et al., 2018; WHO, 2018).

Os fatores que contribuem para a alta prevalência da esquistossomose estão associados a extrema pobreza (CALASANS et al., 2018; VERJEE, 2019). Fatores estes, que aumentam a taxa de mortalidade associada a infecção e suas complicações patológicas (LoVERDE, 2019).

A infecção pelo parasito *S. mansoni* em hospedeiros vertebrados ocasiona a indução de mecanismos complexos de respostas imunológicas (SOUZA et al., 2011). A imunopatogênese da esquistossomose é mediada durante a fase aguda pré-postural por uma resposta imunológica T helper-1 (Th1). Essa resposta é acompanhada pela produção de mediadores pró-inflamatórios, que ativam células da resposta imune inata (TURNER et al., 2011).

Com o início da fase postural dos vermes, os antígenos solúveis presentes no ovo (SEA) do parasito estimulam a resposta imunológica para um perfil T-helper-2 (Th2), com a polarização deste perfil, ocorre aumento de interleucinas (IL-2, IL-5 IL,13), polarização de macrófagos para M2 e aumento da eosinofilia sanguínea (PEARCE; MACDONALD, 2002; BURKE et al., 2009; FAIRFAX et al., 2012; LICÁ et al., 2023). A resposta imunológica Th2 mantém o equilíbrio da resposta inflamatória granulomatosa que é ocasionada pela retenção dos ovos nos órgãos e por reparar os danos teciduais ocasionados por substâncias secretadas pelos ovos do parasita. Caso a resposta imunológica do hospedeiro não module a inflamação granulomatosa, o hospedeiro pode ser acometido para a cronicidade da doença, com aumento expressivo de fibrose (HAMS et al., 2013; SCHWARTZ; FALLON, 2018).

Para tratamento da esquistossomose é utilizado o fármaco Praziquantel (PZQ). É um fármaco derivado de pirazino-isoquinoleína pertencente ao grupo tioxantônico com amplo espectro anti-helmíntico. O PZQ é constituído de dois isômeros, o isômero R(-) levo-PZQ e do isômero S(+) dextro-PZQ (GONNERT et al., 1977; ANDREES et al., 1983). Este medicamento só é eficaz sobre vermes adultos (UTZINGER et al., 2003; COLLY et al., 2014). Além disso, estudos descrevem que o uso prolongado, excesso e inapropriado tem selecionado resistência do parasito (DOENHOFF et al., 2008; CUPIT et al., 2015; WANG et al., 2019). E a não reversão das sequelas patológicas, como a fibrose portal (COLLEY et al., 2014).

Devido às limitações do PZQ, é necessária a investigações de novos agentes terapêuticos, ao longo dos anos os produtos naturais têm sido importantes fontes de compostos para o desenvolvimento de novos medicamentos, além de se mostrarem promissores sobre diversas doenças quando utilizados em forma de extratos, óleos etc. (MOHAMED et al., 2005; LIRA et al., 2023; SIMOBEN et al., 2018).

O grupo de pesquisa do Laboratório de Imunofisiologia da Universidade Federal do Maranhão vem investigando, há alguns anos, o potencial terapêutico de produtos naturais frente a diferentes agentes infecciosos. Dentre estes produtos, tem-se o extrato de *Dysphania ambrosioides* e a própolis verde.

Dados experimentais obtidos por nosso grupo e por outros autores detectaram vários efeitos da *Dysphania ambrosioides*, tais como: antitumoral (NASCIMENTO et al., 2006), imunoestimulante (CRUZ et al., 2007), giardicida (NEIVA et al., 2011), anti-esquistossomótico e imunomodulador (SILVA, 2012; RODRIGUES, 2021), antiplasmódio (CYSNE et al., 2016), leishmanicida (PATRICIO et al, 2006), anti-inflamatório (PEREIRA et al., 2010), antiartrítico (PEREIRA et al, 2018; CALADO et al., 2015), cicatrizante (NASCIMENTO, 2014) e regenerador ósseo (PINHEIRO et al., 2017).

É descrito na literatura que o extrato padronizado de Própolis de *apis melífera* (EPP-AF®) apresentou atividade antifúngica, antimicrobiana, cicatrizante, anti-inflamatória (DE CASTRO et al., 2011; BARUD et al., 2013; BERRETTA et al., 2013; HORI et al., 2013) a própolis também tem apresentado um satisfatório efeito antiparasitário (MOHAMED et al., 2016; DA SILVA et al., 2015; ALGABBANI et al., 2017; FOUAD et al., 2021; BARAKAT et al., 2022).

Tendo em vista que o uso de produtos naturais apresenta efeitos promissores sobre diferentes doenças, nosso estudo objetivou avaliar o efeito do extrato das folhas de *Dysphania ambrosioides* associado ou não ao Praziquantel e do extrato padronizado de própolis de *Apis melífera* (EPP-AF®) em animais infectados por *Schistosoma mansoni*. Os dados obtidos auxiliarão a entender os mecanismos de ação durante e após o uso de ambos os produtos naturais no controle de infecções parasitárias.

## 2. REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Aspectos gerais da esquistossomose

#### 2.1.1 Ecoepidemiologia da esquistossomose no mundo

A esquistossomose é caracterizada como uma doença crônica e debilitante. As estimativas da Organização Mundial de Saúde (OMS) mostraram que a doença afeta mais de 240 milhões de pessoas ao redor do mundo e mais de 700 milhões de pessoas vivem em áreas endêmicas. (WHO, 2018). Uma análise realizada pelo *Global Burden of Disease* (GBD), em uma lista de 18 DTNs apresentadas pela OMS, destacou a esquistossomose como umas das principais parasitoses no mundo (HOTEZ et al. 2014).

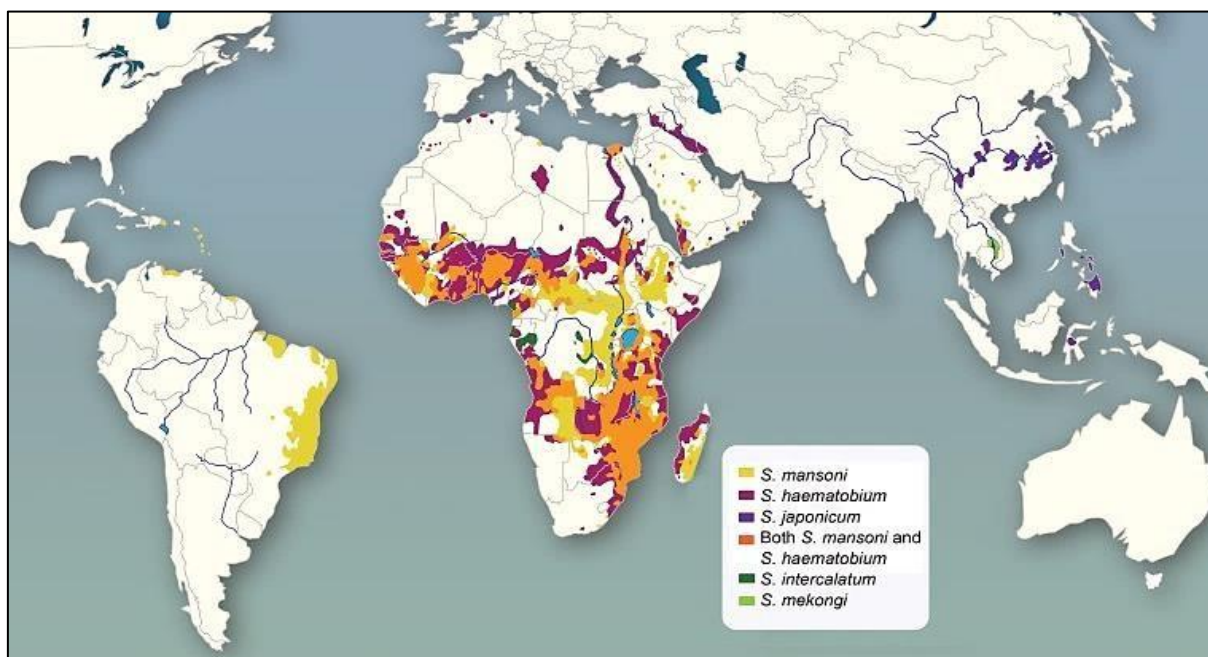
Este grupo de parasito está descrito taxonomicamente da seguinte forma:

|            |                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
|------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Filo:      | Platelmintes, Gegenbauer 1859                                                                                                                                                                                                                                                                     |
| Classe:    | Trematoda, Rudolphi 1808                                                                                                                                                                                                                                                                          |
| subclasse: | Digenea, Carus 1863                                                                                                                                                                                                                                                                               |
| Ordem:     | Schistosomatoidea, Stiles & Hassal 1898                                                                                                                                                                                                                                                           |
| Família:   | Schistosomatidae, Stiles & Hassal 1898                                                                                                                                                                                                                                                            |
| Gênero:    | <i>Schistosoma</i> Weiland 1858                                                                                                                                                                                                                                                                   |
| Espécies:  | <i>Schistosoma mansoni</i> , Sambon, 1907,<br><i>Schistosoma japonicum</i> , Katsurada, 1904,<br><i>Schistosoma haematobium</i> , Bilhartz 1852,<br><i>Schistosoma mekongi</i> Voge, Brickner & Bruce 1978,<br><i>Schistosoma intercalatum</i> , Fischer 1934,<br><i>Schistosoma guineenses</i> . |

As seis espécies de *Schistosoma* de maior importância e interesse médico, pois podem infectar os seres humanos, apresentam diferentes distribuições geográficas no mundo. *S. haematobium*, relatado em 54 países, é a espécie mais comum, ocorrendo na África Subsaariana e no Oriente Médio (OMS, 2018). *Schistosoma japonicum* é endêmico na República Popular da China e nas Filipinas, com ocorrência em pequenos focos na Indonésia. No Japão onde está parasitose costumava ser endêmica, sua eliminação ocorreu no final da década de 1970, devido aos esforços de controle deste parasito (ROLLINSON et al., 2013; COLLEY et al., 2014).

*Schistosoma mansoni* é endêmico na África Subsaariana, Brasil, ilhas do Caribe, Porto Rico, Suriname e Venezuela (KURUP et al., 2010). As espécies *S. guineensis* e *S. intercalatum* são endêmicas na África Ocidental e África Central. Já a espécie *S. mekongi*

encontra-se restrita à região sul do Camboja e ao longo do rio Mekong na República Democrática Popular do Laos. Estas três últimas espécies apresentam menor prevalência global (TCHUEM et al., 2003; MUTH et al., 2010; EKPO et al., 2013; WEERAKOON et al., 2015) (Figura 1).



**Figura 1. Distribuição mundial de algumas espécies de *Schistosoma* capazes de infectar humanos.** (WEERAKOON et al. 2015).

A espécie *Schistosoma haematobium* é o agente etiológico da esquistossomose urogenital e as espécies *S. guineensis*, *S. intercalatum*, *S. mansoni*, *S. japonicum* e *S. mekongi* são agentes etiológicos da esquistossomose intestinal (WHO, 2018).

As infecções ocasionadas pelos trematódeos pertencentes a este gênero afetam aproximadamente 240 milhões de pessoas em todo o mundo e mais de 700 milhões de pessoas vivem em áreas endêmicas. A esquistossomose já foi notificada em 78 países, sendo que em 19 países não tem ocorrido notificações de casos nos últimos cinco anos, o que pode ser um indicativo da interrupção da doença. Em 52 países ainda tem ocorrido transmissão moderada a alta segundo os dados mais recentes da OMS (WEERAKOON et al. 2015; GBD, 2017; WHO, 2018). (Figura 2)

A esquistossomose é um problema de saúde pública em várias partes do mundo, particularmente na África, onde vivem 92% de todas as pessoas infectadas e que necessitam de quimioterapia preventiva para a esquistossomose. O número total de pessoas que precisam de quimioterapia preventiva em todo o mundo, em 2018, foi de 229,2 milhões, das quais 124,4 milhões eram crianças em idade escolar (WHO, 2018).

Na América do Sul, a estimativa de casos de esquistossomose correspondia em 2019, a 1.620.230 milhões. Sendo que no Brasil e Venezuela é exigido quimioterapia preventiva, pois são países endêmicos da doença. No Brasil, o número estimado de indivíduos que necessitam de quimioterapia preventiva para esquistossomose correspondia a 1.556.890 milhões de pessoas em 2019 (WHO, 2018). (Figura 3).



**Figura 3: Distribuição geográfica da esquistossomose, de acordo com a faixa de positividade na América do Sul (Modificado de WHO, 2018).**

### 2.1.2 Esquistossomose no Brasil: *Schistosoma mansoni*

*S. mansoni* é o agente etiológico da doença infecciosa e parasitária esquistossomose mansoni, a única das infecções causadas pelo gênero *Schistosoma* que é endêmica no Brasil. (WHO, 2018).

O primeiro relato da ocorrência de infecção por *S. mansoni* no Brasil, foi feito no ano de 1908, por Pirajá da Silva, no Estado da Bahia. O helminto foi introduzido no Brasil, durante o período colonial, por meio do tráfico de escravos africanos que se encontravam parasitados. Logo este parasito conseguiu se instalar e disseminar-se pelo país, pois encontrou vetores intermediários necessários a manutenção de seu ciclo de vida. (COURA et al., 2004; BRASIL, 2010).

Durante as últimas décadas, houve uma expansão da ocorrência da esquistossomose para as periferias dos grandes centros urbanos. Esse aumento na distribuição geográfica de *S. mansoni* deve-se às condições sanitárias precárias, decorrentes de movimentos migratórios humanos (CARVALHO et al., 2010).

Outro aspecto importante para a manutenção da esquistossomose no Brasil, está relacionado à presença de vertebrados não humanos capazes de atuarem como reservatórios do parasito. Espécies como *Holochilus sciureus* e *Nectomys squamipes aquaticus* são descritas como sendo capazes de serem infectados por *S. mansoni* e de potencializarem a disseminação

dessa doença, principalmente em áreas endêmicas (GENTILE et al., 2010; MIRANDA et al., 2017; CATALANO et al., 2018), Bovinos e primatas (MODEMA et al., 2008; STANDLEY et al., 2011). Em áreas endêmicas os fatores associados a precárias condições sanitárias e aos hábitos dos moradores contribuem para disseminação da infecção (CALASANS et al., 2018).

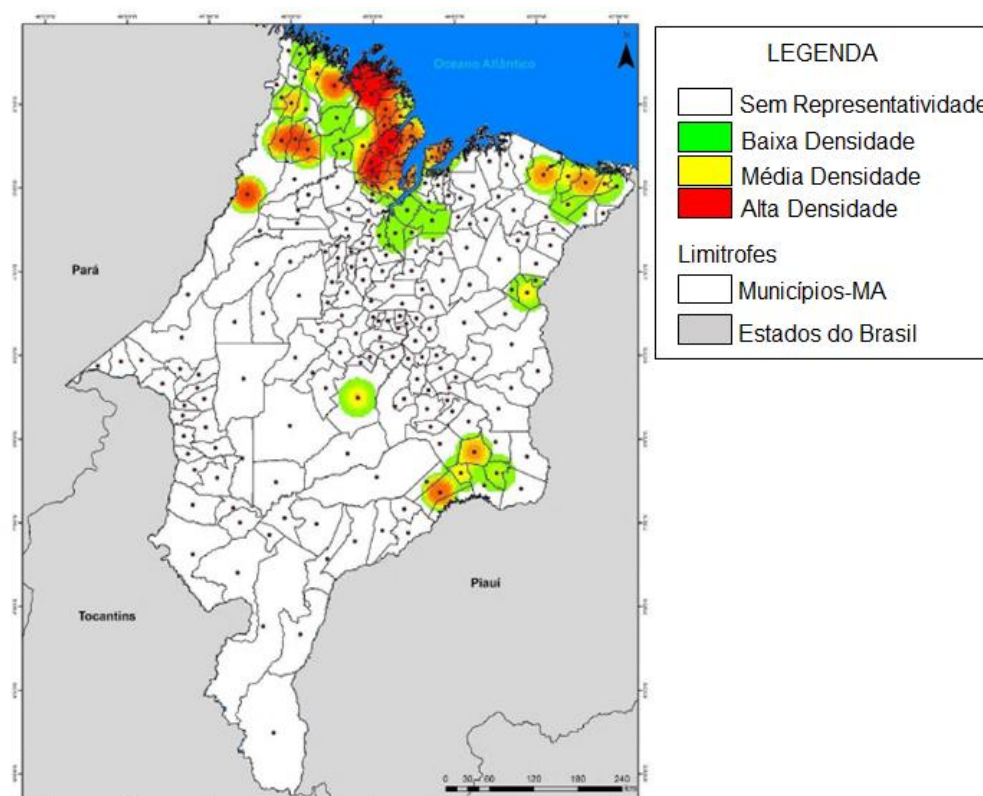
A esquistossomose é detectada em todas as regiões do país sendo que a grande maioria dos casos ocorre nos estados das regiões Nordeste e Sudeste, como consequência da presença dos moluscos vetores nestas regiões (BRASIL, 2014).

Os casos de esquistossomose no país ocorrem, principalmente, na faixa litorânea dos estados do nordeste localizados entre o Maranhão e o Espírito Santo. Há também muitos casos em Minas Gerais, onde ainda se encontram regiões com prevalência igual ou superior a 15%. Além disso, Minas Gerais e Bahia concentram cerca de 70% do total dos casos que ocorrem no país (NOYA et al., 2015). Existem também focos isolados de transmissão no Distrito Federal e nos estados do Pará, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná, Santa Catarina, Goiás e Rio Grande do Sul (BRASIL, 2017). Há também casos de pacientes positivos que vieram de áreas endêmicas registradas em todo território nacional, principalmente em áreas consideradas de elevada migração, como o estado de Rondônia, indicando uma larga expansão da esquistossomose no Brasil (COURA; AMARAL, 2004).

Na região nordeste, número elevado de casos de esquistossomose parece ter relação com o aumento de extensas plantações mantidas por irrigação natural ou artificial, e pela formação de valas que se transformam em criadouros ideais para os moluscos vetores (PARAENSE, 2001; SANTOS; MELO, 2011). Outro fator associado ao aumento de casos de esquistossomose está a sazonalidade, períodos chuvosos contribuem para a distribuição, manutenção e reprodução do hospedeiro intermediário (MAZIGO et al., 2012; LEAL NETO et al., 2013).

No estado do Maranhão, a presença desta parasitose é conhecida desde 1920 (ALVIM, 1980; RAMOS, 2007). Estudos sugerem que a doença foi introduzida no estado por pessoas vindas da Angola e da Guiné, os quais foram trabalhar nas fazendas do Litoral e da região da Baixada, localidades com elevada prevalência de pessoas infectadas (CUTRIM, 1995).

No Maranhão, essa parasitose é endêmica em 48 dos 217 municípios, sendo que 22 destes municípios estão localizados na Baixada Ocidental Maranhense (CANTANHEDE et al., 2014; MONTEIRO et al., 2018), (Figura 4).



**Figura 4: Mapa densidade de casos de esquistossomose por município no estado do Maranhão, 2007 a 2016.** (MENDES, 2019). Modificado por (Santos, 2021).

A alta prevalência de casos na microrregião da Baixada Maranhense é resultado da vasta exposição da população a fatores de risco, tanto por lazer como por sobrevivência, por meio da pesca ou da caça, já que os moradores vivem constantemente em contato com os criadouros naturais de caramujos infectados, nos campos inundáveis dessa região (CANTANHEDE et al., 2014; LIRA et al. 2017).

Oliveira et al., (2023), ao avaliarem o perfil epidemiológico entre os anos de 2018 e 2022 no estado do maranhão, identificaram alta ocorrência no ano de 2018, correspondendo a 54% dos casos. Entre os municípios do estado do Maranhão, o município de Pinheiro, apresentou o maior índice de notificação desta parasitose, sendo 39% dos casos. Em São Luís (MA), capital do Estado, os bairros de periferia são os mais atingidos, fato possivelmente associado às precárias condições de vida, destacando-se a falta de saneamento básico adequado e a presença de coleções hídricas com caramujos transmissores, localizadas em áreas peri e intradomiciliares, o que coloca a população em risco diário (NUNES et al., 2013).



### 2.1.3 Ciclo biológico de *Schistosoma mansoni*

*S. mansoni* apresenta ciclo de vida heteróximo, com uma fase sexuada, no hospedeiro vertebrado, que inclui alguns mamíferos e os seres humanos. A fase assexuada, ocorre no hospedeiro intermediário em moluscos do gênero *Biomphalaria*, que também podem ser caracterizados como vetores do parasito, (KATZ et al., 2003; GRYSEELS et al., 2006), (Figura 5).

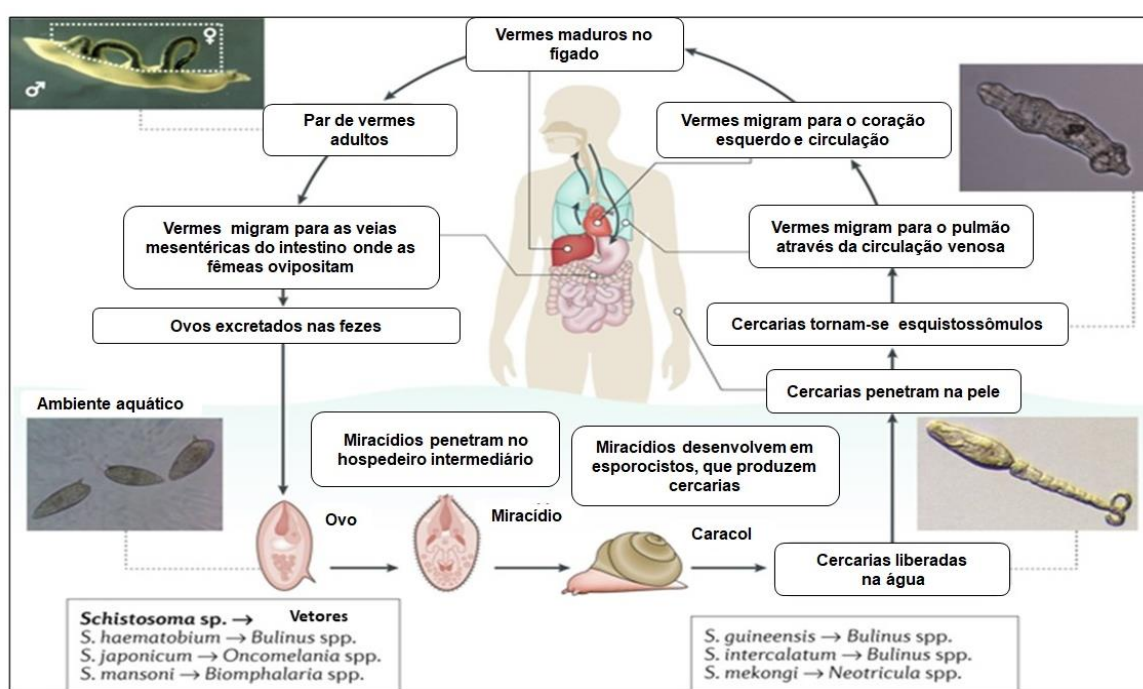


Figura 5. Ciclo biológico de *S. mansoni*. (Modificado de McMANUS et al., 2018).

Os ovos excretados nas fezes do hospedeiro humano eclodem em larvas ao entrarem em contato com a água, liberando os miracídeos, que são larvas ciliadas de natação livre, capazes de penetrar no tegumento dos caramujos. Os miracídeos apresentam formato oval e são revestidos por placas ciliadas (McMANUS et al., 2018; BRASIL, 2014).

No caramujo, os miracídeos se transformam em esporocistos, que, por sua vez, produzem novos esporocistos por reprodução assexuada originando numerosas cercárias, que constituem o estágio larval, de natação livre e são capazes de infectar o hospedeiro vertebrado (McMANUS et al., 2018).

Após cerca de 30 dias, as cercárias começam a emergir dos moluscos em resposta à luz solar. As cercárias apresentam cauda bifurcada e tem elevada motilidade e apresentam glândulas com ação lítica, capazes de viabilizar a sua penetração da pele de vertebrados, o que

deve ocorrer entre 48 a 72 horas, para que não morram. Ao migrarem através da derme, as cercárias passam por transformações morfológicas, fisiológicas e bioquímicas, perdem a cauda bifurcada e tornam-se esquistossômulos (GRYSEELS, 2012; NEVES et al., 2016; McMANUS et al., 2018). Os esquistossômulos entram nos vasos sanguíneos venosos, diretamente, ou após invadir o sistema linfático, e são transportados para os pulmões, pelo coração direito, antes de atingir o coração esquerdo. Em seguida, entram na circulação arterial e migram para o sistema porta hepático e veias mesentéricas, onde amadurecem tornando-se vermes adultos e com sexos distintos em vermes machos e fêmeas. Após atingirem a maturidade sexual, a fêmea se instala no canal ginecóforo do macho para o acasalamento (McMANUS et al., 2018).

Após iniciarem a cópula estes parasitos permanecem em estado de cópula contínua no interior dos vasos e a oviposição inicia-se, aproximadamente, na 5ª semana após a infecção. Os vermes podem sobreviver, em média, de 5 a 10 anos no hospedeiro (BRASIL, 2014; McMANUS et al., 2018).

As fêmeas de *S. mansoni* produzem em torno de 100 a 300 ovos por dia. Estes ovos migram através da parede vascular, na submucosa intestinal, ou chegam ao fígado pela circulação portal. Nesse momento, a resposta imunológica é mediada por linfócitos TCD4+, este perfil de resposta facilita a passagem dos ovos para o lúmen intestinal, para que sejam eliminados com as fezes, completando o ciclo do parasito (GRYSEELS, 2012; BRASIL, 2014).

O verme macho de *S. mansoni* mede cerca de 1cm e apresenta o tegumento recoberto de tubérculos, que são minúsculas projeções. Possui o corpo dividido em três porções: anterior, onde está localizada a ventosa oral e a ventral (acetábulo); a mediana e a posterior, que se inicia logo após a ventosa ventral, onde encontra-se o canal ginecóforo, que possui a função de albergar a fêmea e fecundá-la. Já a fêmea apresenta comprimento médio de 1,5 cm, corpo filiforme, tegumento liso e mais escuro que o macho. A morfologia de sua porção anterior é semelhante ao macho, diferindo pela presença da vulva, do útero (com um ou dois ovos) e do ovário. Em sua porção posterior localizam-se as glândulas vitelogênicas e o ceco (McMANUS et al., 2018; NEVES et al., 2016; BRASIL, 2014).

#### **2.1.4 Imunopatogênese da Esquistossomose**

Os sinais clínicos da esquistossomose dependem do estágio de maturação dos parasitos, oviposição e da resposta imunológica do hospedeiro. As consequências da infecção no organismo humano podem apresentar sinais diferenciados durante as fases aguda, crônica e

tardia, causadas, entre outros fatores, pelo acúmulo de ovos do parasito nos tecidos, resultando em fibrose, o que aumenta a severidade da doença (PAUL et al., 2010; McMANUS et al., 2018).

A fase aguda da doença inicia-se nas primeiras 12 horas após a infecção, ocasionada pelas cercárias. Essa fase pode ser assintomática, mas alguns pacientes apresentam reações inflamatórias dérmicas e sub-dérmicas, conhecidas por dermatite cercariana. Essa resposta inflamatória de fase aguda pode resultar também em estado febril debilitante (febre de Katayama), dor abdominal e cefaleia. Em geral, esses sintomas ocorrem antes do aparecimento dos ovos nas fezes (SOUZA et al., 2011; HAMS et al., 2013; WHO, 2018).

Na fase crônica da doença, os ovos que deveriam ser eliminados nas fezes acabam permanecendo no organismo, ficando retidos em vários tecidos, o que resulta na formação de inflamação granulomatosa, e posteriormente em fibrose. Nesta fase, o quadro clínico tende a evoluir com comprometimento das funções hepática, hepatointestinal, hepatoesplênica, e as funções desses órgãos ficam descompensadas (HAMS et al., 2013; WHO, 2018).

A ativação inicial das células imunes inatas é um fator determinante na ativação e magnitude das respostas imunes adaptativas, em especial, na ativação de linfócitos T CD4<sup>+</sup> (SOUZA et al., 2011).

A resposta imunológica Th1 é um estágio curto e imunologicamente mediado por mediadores pró-inflamatórios, tais como interleucinas IL-1, IL-12, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ . A resposta imunológica Th2 é um estágio mais longo, apresenta mediadores anti-inflamatórios tais como, IL-4, IL-13, IL-6, IL-10, IL-5, IL-21 além desses mediadores inflamatórios os isotipos de anticorpos IgG1, IgG4 e IgE e populações expandidas de eosinófilos, basófilos, mastócitos e macrófagos alternativamente ativados tem papel crucial para o controle da infecção.

A ativação da resposta Th2, suprime a ativação de linfócitos T com perfil Th1. Ao mesmo tempo inicia-se a ativação de linfócitos, Th17. A resposta Th2, favorece o desenvolvimento e a maturação dos granulomas, ao redor dos ovos. No pulmão, o principal processo de remodelação das artérias pulmonares pode ocorrer durante a resposta Th2, embora as respostas Th1 e Th17 possam também desempenhar papel importante (JENKINS et al., 2010; BUTROUS et al., 2019). (Figura 6)

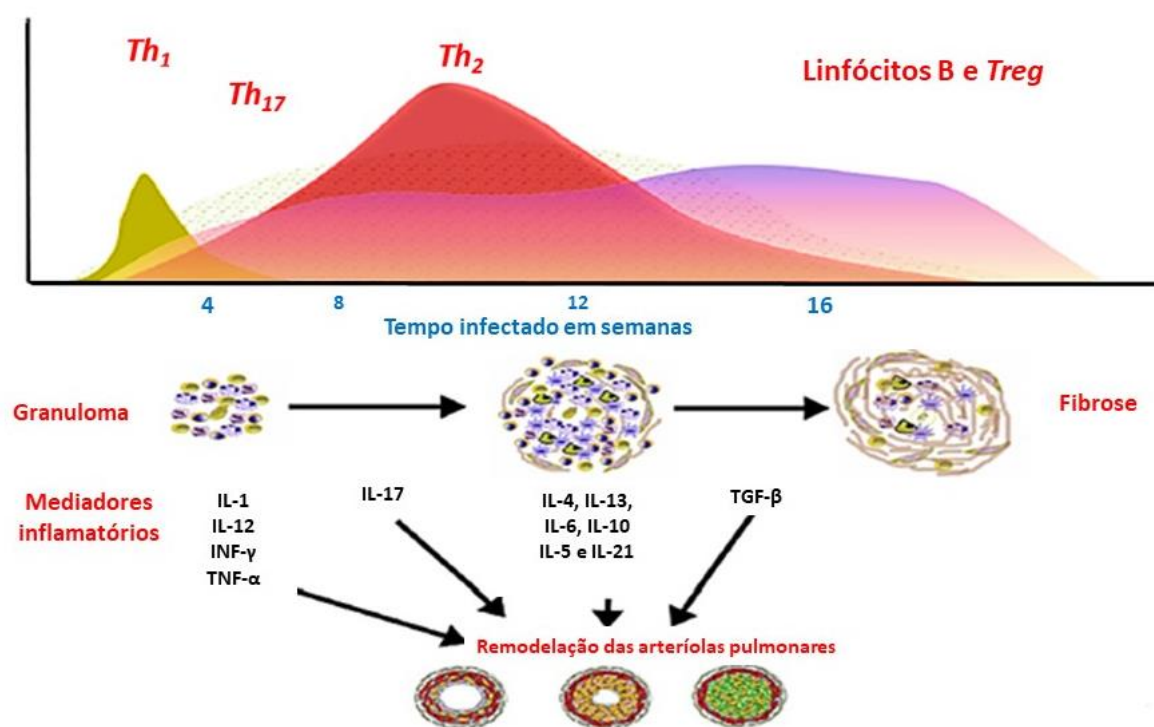


Figura 6. Resposta imune durante infecção por *S. mansoni*. (Butrous et al., 2019).

A resposta Th2 alcança o pico entre a 6ª a 8ª semanas após a infecção e então é modulada com a progressão da doença. Enquanto a infecção progride para fase crônica, por volta da 12ª semana, ocorre uma alteração desse perfil Th2 juntamente com uma redução no tamanho do granuloma hepático. Essa imunomodulação regula o equilíbrio das respostas Th1/Th2, sendo acionada por IL-10 e TGF-β, que induzem células Treg (CHUAH et al., 2014).

A resposta Th2 é crucial para o controle da doença crônica, entretanto, a associação dinâmica entre as populações celulares Th1 e Th17 são cruciais para reduzir a gravidade da doença durante a infecção por *S. Mansoni*. Os linfócitos T reguladores ( $CD4^+ CD25^+ FoxP3^+ = T_{reg}$ ) se expandem durante a inflamação colítica crônica induzida pela infecção por *S. Mansoni* e são capazes de modular a resposta Th2 com supressão da IL-4, desempenhando um papel central na contenção da patologia durante a esquistossomose intestinal (TURNER et al., 2011).

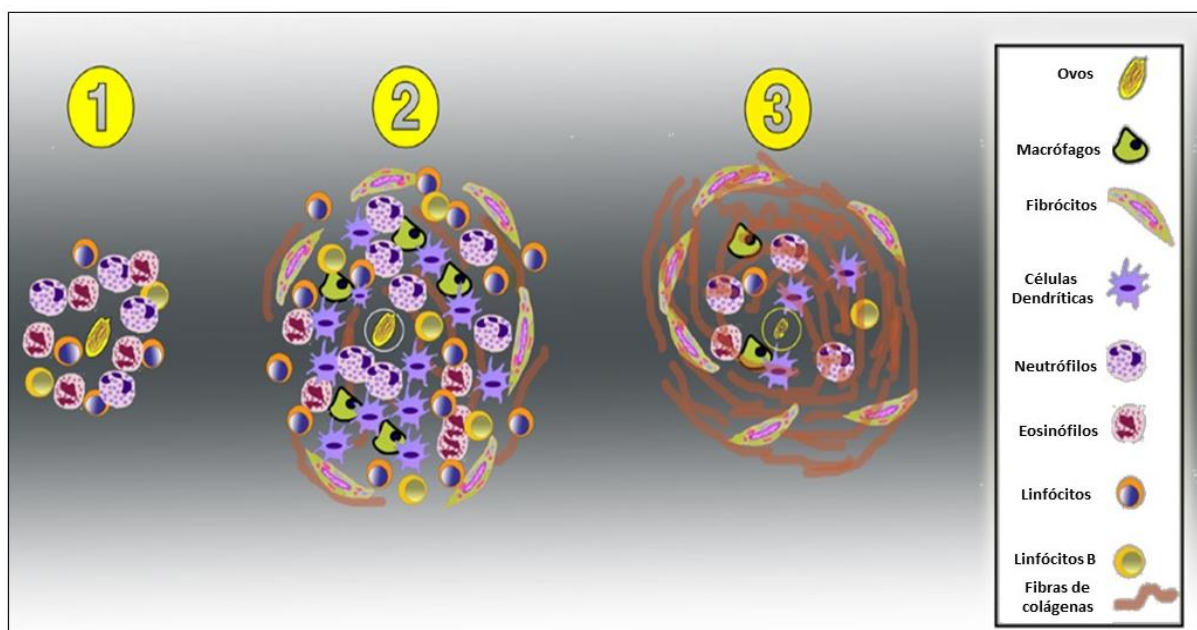
Um fator importante para manutenção do parasito *S. mansoni* no hospedeiro vertebrado está relacionado com o tegumento do verme. Os vermes na corrente sanguínea são cercados por componentes do sistema imunológico e do sistema hemostático, mas ainda conseguem sobreviver sem causar formação de trombos ao seu redor. Esse mecanismo de escape está relacionado com a atividade extracelular funcional, constitutiva e funcional da calpaína, uma proteína presente no tegumento deste parasito, além de serem capazes de clivar a proteína

fibronectina da coagulação do sangue do hospedeiro (MEBIUS et al., 2013; WANG et al., 2017).

Um dos principais eventos que deve ser destacado na resposta imunológica frente a esquistossomose é a formação inflamatória granulomatosa no tecido hepático e o consequente desenvolvimento de fibrose periportal (CARVALHO et al., 2008). Aproximadamente 60% dos ovos produzidos por *S. mansoni* alcançam a luz intestinal e vão para as fezes, enquanto 40% tendem a se manterem aderidos nos capilares da mucosa intestinal e nos sinusóides hepáticos (HERBERT et al., 2004).

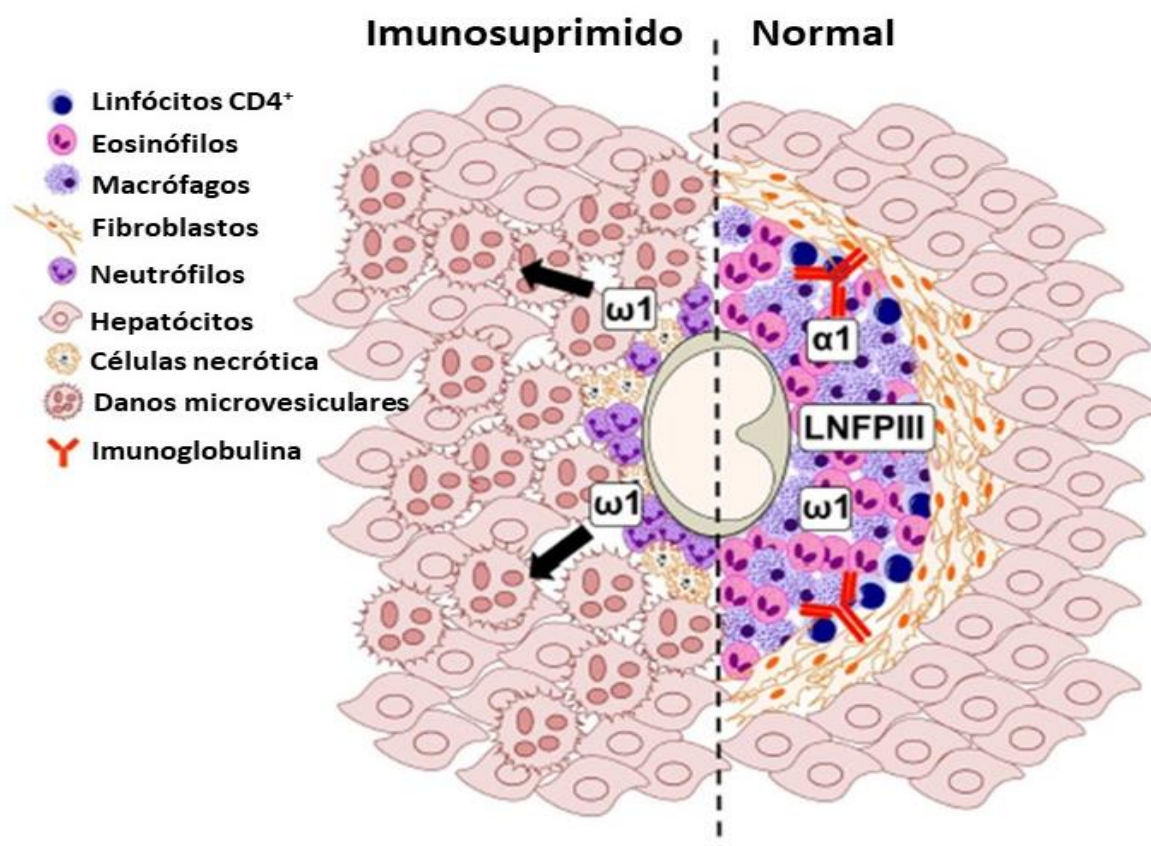
Os ovos secretam ativamente glicoproteínas antigênicas, que têm a função de facilitar a passagem dos ovos do vaso sanguíneo (onde são depositados) para o lúmen do intestino induzindo resposta inflamatória. No entanto, esses antígenos solúveis também induzem a formação de granulomas ao redor de ovos presos no tecido circundante. Os granulomas são uma coleção de células inflamatórias como eosinófilos, neutrófilos, linfócitos e macrófagos alternativamente ativados que se acumulam em resposta à presença dos ovos, no decorrer da inflamação ocorre infiltração de fibroblastos e início do desenvolvimento da fibrose nos granulomas. (McMANUS et al., 2018; HAMS et al., 2013).

A proporção e os tipos de células, que compreendem granulomas, variam de acordo com as espécies infectantes de *Schistosoma*. O processo de desenvolvimento do granuloma é impulsionado pelos antígenos secretados do ovo e pelos linfócitos T na secreção de citocinas e quimiocinas liberadas. A formação de granuloma começa com o recrutamento inicial de macrófagos, eosinófilos e neutrófilos ao redor do ovo aprisionado (Painel 1). Essas células causam reação inflamatória, provocando o recrutamento de mais células e o desenvolvimento do tamanho do granuloma (Painel 2). O painel (3) mostra o estágio final da resolução do granuloma após a destruição do estímulo antigênico (principalmente os ovos), resultando na deposição de fibrilas de cromatina e colágenos e subsequente degradação e remodelação do colágeno que contribuem para a fibrose tecidual final (BUTROUS et al., 2019), (Figura 7).



**Figura 7. Representação esquemática do desenvolvimento e a composição celular do granuloma ao redor dos ovos de *Schistosoma* (Butrous et al., 2019).**

Hams et al. (2013) demonstraram a diferença da resposta inflamatória ocasionada pelo ovo de *S. mansoni* (Figura 7). Na ausência de células TCD4+ foi constatado uma limitação na formação do granuloma, embora um infiltrado celular tenha se formado em torno do ovo. Nesse caso o infiltrado foi formado somente por neutrófilos, mas uma extensa lesão microvesicular nos hepatócitos também foi observada, resultando em consequente elevação dos níveis séricos de hepatócitos. Por outro lado, o organismo que apresenta um percentual normal de células TCD4+, apresenta granuloma funcional com tipos celulares tais como, macrófagos, eosinófilos e linfócitos, sendo encontrado também imunoglobulinas e tecido fibrótico.



**Figura 8.** Representação gráfica das populações celulares envolvidas na formação do granuloma hepático ao redor do ovo de *S. mansoni* em um camundongo com ausência e presença de células TCD4<sup>+</sup>. (Hams et al. 2013).

As lesões granulomatosas tendem a diminuir de tamanho e se tornarem fibróticas, sendo a IL-13, produzida por macrófagos e fibroblastos, a principal citocina responsável pela fibrose (HAMS et al., 2013). O papel fibrogênico da IL-13, somado a ação da IL-4, induz aumento na expressão de arginase em macrófagos e a polarização para o perfil M2. A arginase usa L-arginina como substrato para produzir L-ornitina, que é convertida pela ornitina aminotransferase em prolina, um aminoácido crucial para a produção de colágeno e o desenvolvimento de fibrose (HESSE et al., 2001).

A fibrose hepática resultante da infecção por *S. mansoni*, contribui, eventualmente, para a oclusão do fluxo sanguíneo no fígado, levando a hipertensão portal, esplenomegalia, ascite, varizes gastrointestinais, sangramento gastrointestinal e morte (BURKE et al., 2009). Embora o granuloma formado pela retenção do ovo seja prejudicial devido à inflamação e o desenvolvimento de fibrose, a formação do granuloma torna-se essencial para proteger o hospedeiro das toxinas secretas pelo ovo (SCHWARTZ et al., 2018).



## 2.2 Praziquantel

### 2.2.1 Fármaco de escolha para o tratamento da esquistossomose

O Praziquantel foi descoberto em meados da década de 1970, os testes em seres humanos iniciaram-se em 1978, tendo como forte candidato este medicamento com ação anti-esquistossomótico. Começou a ser disponibilizado em 1988 como Biltricida pela fabricante Bayer (FENWICK, 2015). O tratamento para a esquistossomose está baseado na utilização deste fármaco como alvo terapêutico principal. O praziquantel apresenta eficácia para o tratamento das cinco espécies mais importantes de *Schistosoma*, sendo utilizado há mais de 30 anos como estratégia de controle deste parasito em áreas endêmicas (WANG et al., 2012).

A eficácia, em termos de taxa de cura e taxa de redução de ovos, e a segurança do praziquantel garantiram seu uso generalizado. Uma meta-análise da OMS mostrou que a dose recomendada de praziquantel (40 mg / kg) alcançou taxa de cura de 94,7% para infecções por *S. japonicum*, 77,1% para infecções por *S. haematobium*, 76,7% para infecções por *S. mansoni* e 63,5% para infecções mistas. Infecções por *S. haematobium* e *S. mansoni*; a redução de ovos apresentou uma média foi de 95% para *S. japonicum*, 94,1% para *S. haematobium* e 86,3% para *S. mansoni* (ZWANG et al., 2014).

O Praziquantel é o principal medicamento utilizado nos programas globais de controle da esquistossomose, para reduzir a morbidade ocasionada pelos parasitos pertencentes ao gênero *Schistosoma* (KNOPP et al., 2013). Este medicamento apresenta como características comprimidos grandes e sabor amargo (STOTHARD et al., 2013).

### 2.2.2 Mecanismo de ação do Praziquantel

O Praziquantel induz contrações tetânicas dos parasitos e o aparecimento de vacúolos tegumentares, o que resulta em danos na superfície, levando assim, o desprendimento dos vermes adultos das paredes venosas e consequentemente a morte (ROSS et al., 2002). Em modelos animais demonstrou-se que, a presença de anticorpos do hospedeiro, reconhecendo os antígenos dos vermes expostos como resultado dos danos ocasionados pelo praziquantel, foi essencial para a eficácia do medicamento (DOENHOFF et al., 2008).

No entanto, o mecanismo preciso de ação do praziquantel não se encontra bem conhecido. Evidências indiretas sugerem que o praziquantel aumenta a captação de cálcio do esquistossomo por meio de canais de íons de cálcio no tegumento de verme adulto. No entanto,



algumas dúvidas foram levantadas se o influxo de cálcio é central para o efeito anti-helmíntico do praziquantel, e mecanismos de ação alternativos também foram propostos, incluindo interferência na função das cadeias leves reguladoras da miosina ou antagonismo da captação de adenosina (GNANASEKAR et al., 2008; ANGELUCCI et al., 2007). Recentemente, Nogueira et al., (2022), demonstraram a partir de uma revisão de literatura, que os efeitos do Praziquantel estão associados na alteração dos canais de  $\text{Ca}^{2+}$  operados por voltagem, além de interagir com outras moléculas do parasito, tais como, a cadeia leve reguladora da miosina, a glutatona S-transferase e os canais de potencial receptor transitório.

### **2.2.3 Efeitos adversos do fármaco Praziquantel**

Os efeitos adversos associados à terapia com Praziquantel inclui tontura, dor de cabeça, dor abdominal, náusea transitória, prurido (coceira) e erupção cutânea. Sendo que essas reações podem ser consequências da liberação antigênica de vermes mortos e não da própria droga (GRYSEELS et al., 2006; GRAY et al., 2011). Entretanto, estudos têm demonstrado que o praziquantel ocasiona efeitos colaterais, apresenta uma baixa eficácia em vermes jovens do que nos adultos e não pode impedir a reinfecção ou alterar o ciclo de vida do parasito (DOENHOFF et al., 2008; VALE et al., 2017; SETO et al., 2011; WANG et al., 2012; NOBREGA et al., 2013; GRAY et al., 2011).

Além disso, algumas evidências experimentais utilizando camundongos indicam que os parasitos residentes em camundongos que receberam repetidos tratamentos *in vivo* com praziquantel, amadureceram em vermes adultos e estes reduziram a sensibilidade ao medicamento; este fenómeno parece ser amplificado por cima de cada geração de vermes (ANGELUCCI et al., 2007).

A utilização maciça deste fármaco como via principal de tratamento da esquistossomose aumenta a preocupação com a resistência dos vermes ao medicamento (BOTROS et al., 2005; ALONSO et al., 2006). E devido as preocupações crescentes com a resistência ao praziquantel, tem-se a necessidade de desenvolvimento de medicamentos anti-esquistossomáticos (BERGQUIST et al., 2017).

### 2.3 Produtos naturais

É um fato inquestionável que a biodiversidade, vista principalmente na alta diversidade de espécies vegetais, e o conhecimento tradicional sobre as plantas representam importantes fontes para o desenvolvimento de produtos terapêuticos (BRANDÃO et al., 2012; NEWMANN; CRAGG, 2016).

O uso de plantas com atividade medicinal, é uma prática difundida em todo o mundo, em rápida expansão e que tem gerado, segundo Ethur et al (2011), a abertura de mercados nacionais e internacionais. Em termos globais, do total de US\$ 320 bilhões em vendas anuais de produtos farmacêuticos, o mercado de fitoterápicos movimenta cerca de US\$ 20 bilhões todos os anos, e está em ascensão (VALÉCIO, 2016). Estima-se que, dos medicamentos aprovados entre 1981 e 2014 para uso clínico, cerca de 26% era oriundo de produtos naturais ou derivados e 13% apresentavam grupamento farmacológico de origem natural (NEWMAN et al., 2016).

Considerando a biodiversidade vegetal encontrada no Brasil, o país possui altas perspectivas para exploração econômica de medicamentos. É um dos países de maior número de espécies do mundo, representando em torno de 19% da flora mundial, com expressiva potencialidade genética e do número de espécies nativas, excelentes condições climática e grande potencial hídrico, como as plantas medicinais provêm dessa diversidade podem ser aplicadas a qualquer classe socioeconômica (BENINI et al., 2011; GUILHERMINO, 2015).

Vale ressaltar que, o uso tradicional de plantas nem sempre fornece informações corretas quanto ao modo de preparo e aplicabilidade, em contraste aos produtos industrializados que passaram por estudos clínicos. Dependendo da região onde são utilizadas, as plantas possuem diferentes denominações populares, favorecendo equívocos quanto à sua correta identificação e com reflexos sobre a possível ação, indicação de uso e dose recomendada (ARAÚJO, 2010).

O uso de plantas como medicamento requer orientação adequada, para que seu uso não ocasione problemas à fisiologia do organismo. Consequentemente, é importante que seja realizado o controle sanitário destes produtos e a conscientização da população sobre seus riscos, visto que, a ideia de que produto de origem natural não faz mal à saúde ainda se encontra amplamente disseminada (CARVALHO, 2007; VASCONCELOS et al., 2010).

Produtos de origem natural oriundos de plantas, são uma fonte importante para o desenvolvimento de novos medicamentos, pois apresentam uma vasta fonte de compostos biologicamente ativos contra diversas doenças, incluindo infecções parasitárias. Além da

utilização como fitoterápicos, também estão presentes em alimentos nutracêuticos, edulcorante e aditivos alimentares (SIMOBEN et al., 2018; KUPPUSAMY et al., 2015).

Devido a necessidade para o desenvolvimento de novos fármacos contra a esquistossomose, principalmente oriundos de fontes naturais, tem-se intensificado nos últimos anos a busca por potenciais agentes esquistossomicidas (DE MORAES et al., 2012). O tratamento para esquistossomose tem como finalidade sua cura, redução da carga parasitária do hospedeiro, impedimento da evolução para as manifestações graves da doença, minimização de produção e eliminação dos ovos do helminto como uma forma de prevenção primária da transmissão (SOUZA et al., 2011).

Essa nova perspectiva terapêutica pode estar associada a base dos produtos naturais. Estudos tem demonstrado a ação do uso de produtos naturais no controle de doenças (CHE et al., 2019). O aumento do uso de produtos naturais teve um impulso durante a pandemia de COVID-19. (BRUSH et al., 2020; BRUSH et al., 2021).

LI et al., (2017), ao revisarem o uso de produtos naturais como dietéticos na prevenção do câncer de mama, identificaram que produtos naturais e seus componentes bioativos, soja (genisteína e daidzeína), romã (ellagitannins), mangostão (mangostina), frutas cítricas (naringina), maçã (2 $\alpha$ -hidroxiuróllica), uva, manga, vegetais crucíferos (isotiocianatos), gengibre (gingeróis e shogaóis), alho (compostos organosulfurados), cominho preto (timoquinona), macrofungos comestíveis (polissacarídeos) e cereais apresentam efeitos anticâncer de mama associados a diversos mecanismos na redução da doença.

Momtazi-Borojeni et al., (2019), também demonstraram o uso de produtos naturais dietéticos com ação sobre a redução de níveis elevados de lipoproteína(a) plasmática (Lp(a)) na qual está associada ao risco de doença cardiovascular (DCV). Rondanelli et al., (2021), demonstram a partir de uma pirâmide alimentar que o uso de produtos naturais previne a perda óssea, demonstrando resultados promissores a partir destes produtos naturais.

Dentre os produtos naturais, podemos destacar a própolis verde e *Dysphania ambrosioides*, ambos tem apresentado resultados promissores frente a diversas doenças.

## **2.4 *Dysphania ambrosioides*: Taxonomia e características botânicas-geográficas**

### **2.4.1 Taxonomia de *Dysphania ambrosioides* (L.) Mosyakin & Clemants**

A espécie botânica *Chenopodium ambrosioides*, conhecida atualmente como *Dysphania ambrosioides*, era pertencente ao gênero *Chenopodium*, correspondente a um táxon grande e

morfologicamente variável de ervas anuais e perenes (FUENTES-BAZAN et al., 2012) (Figura 9). O gênero *Dysphania* expandiu-se por razões morfológicas, passando a compreender todos os táxons de *Chenopodium*. E através de estudos moleculares a circunscrição do gênero *Dysphania* tornou-se amplamente aceita (VERLOOVE, 2013).

|            |                                                        |
|------------|--------------------------------------------------------|
| Reino:     | Plantae                                                |
| Subreino:  | Tracheobionta                                          |
| Divisão:   | Magnoliophyta                                          |
| Classe:    | Magnoliopsida                                          |
| Subclasse: | Caryophyllidae                                         |
| Ordem:     | Carvophyllalles                                        |
| Família:   | Chenopodiaceae                                         |
| Gênero:    | <i>Dysphania</i> R. BR.                                |
| Espécie:   | <i>Dysphania ambrosioides</i> (L.) Mosyakin & Clemants |

Segundo Plants Database (2019), atualmente, a distribuição da espécie é a seguinte:

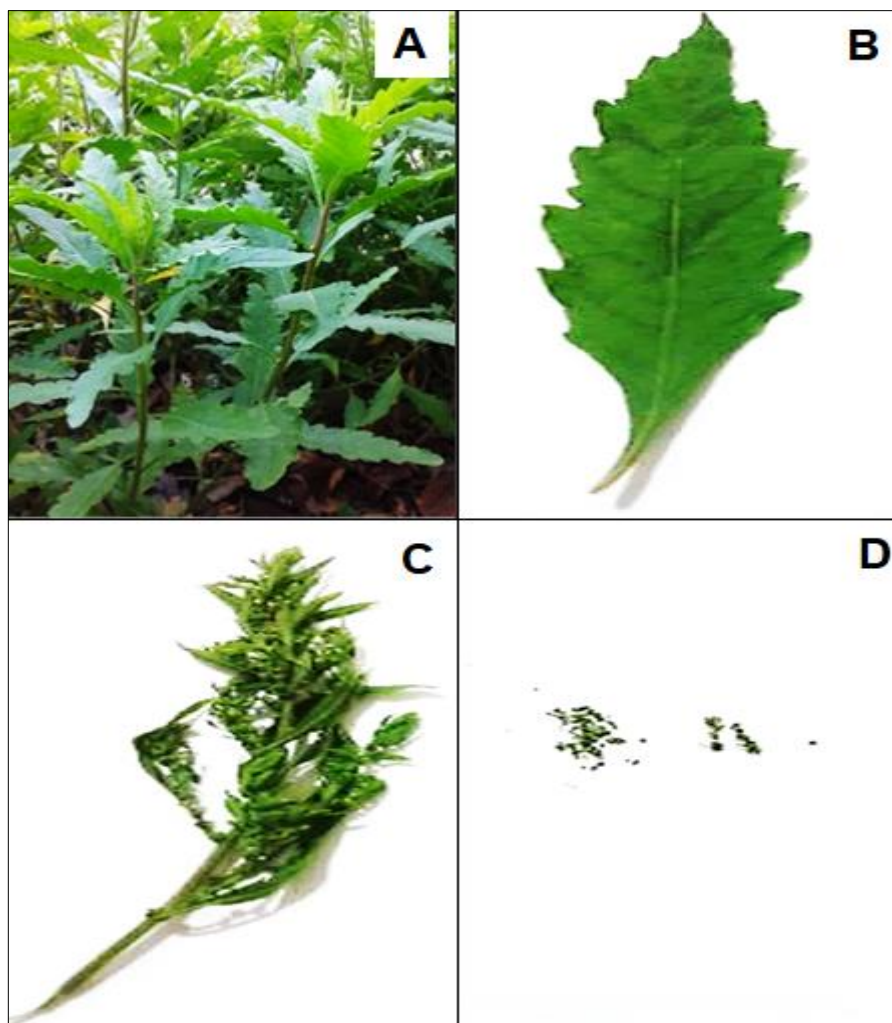


**Figura 9.** Espécie vegetal *Dysphania ambrosioides*. (Godinho, 2019)

#### **2.4.2 Características morfológicas da espécie *Dysphania ambrosioides* (Aspectos macroscópicos)**

*Dysphania ambrosioides* (L.) é conhecida popularmente como mastruz, erva-de-santa-maria ou mastruço (MESSIAS et al., 2015). É uma erva que atinge até 1 m de altura, apresentando bastante ramificações (Fig. 10A). As folhas são alternas, alongadas, com bordas

denteadas, ápice agudo, pilosas de tamanhos diversos, as maiores ficam na parte inferior e apresentam pecíolo curto, as menores ficam localizadas na parte superior da planta (Fig. 10B, 10C). Possuem cheiro forte e característico. A inflorescência é do tipo racemosa, apresentando flores pequenas, de cor verde (10C). As sementes são numerosas, esféricas, de cor preta e ricas em óleo (10D) (SOUSA et al., 2004; LIMA et al., 2006).



**Figura 10.** *Dysphania ambrosioides*. A. Hábito; B. Face adaxial da folha; C. Folhas e inflorescência; D. Sementes. Fonte: Modificado de NASCIMENTO (2014).

#### 2.4.3 Distribuição geográfica da espécie *Dysphania ambrosioides*

Esse vegetal apresenta ocorrência em regiões de clima tropical, subtropical e temperado, dessa forma, com ampla distribuição no mundo. No Brasil, a espécie é considerada endêmica, sendo um vegetal que apresenta domínios fitogeográficos por todo território brasileiro (Figura 11) (CHEVALLIER, 1996; SENNA, 2015).

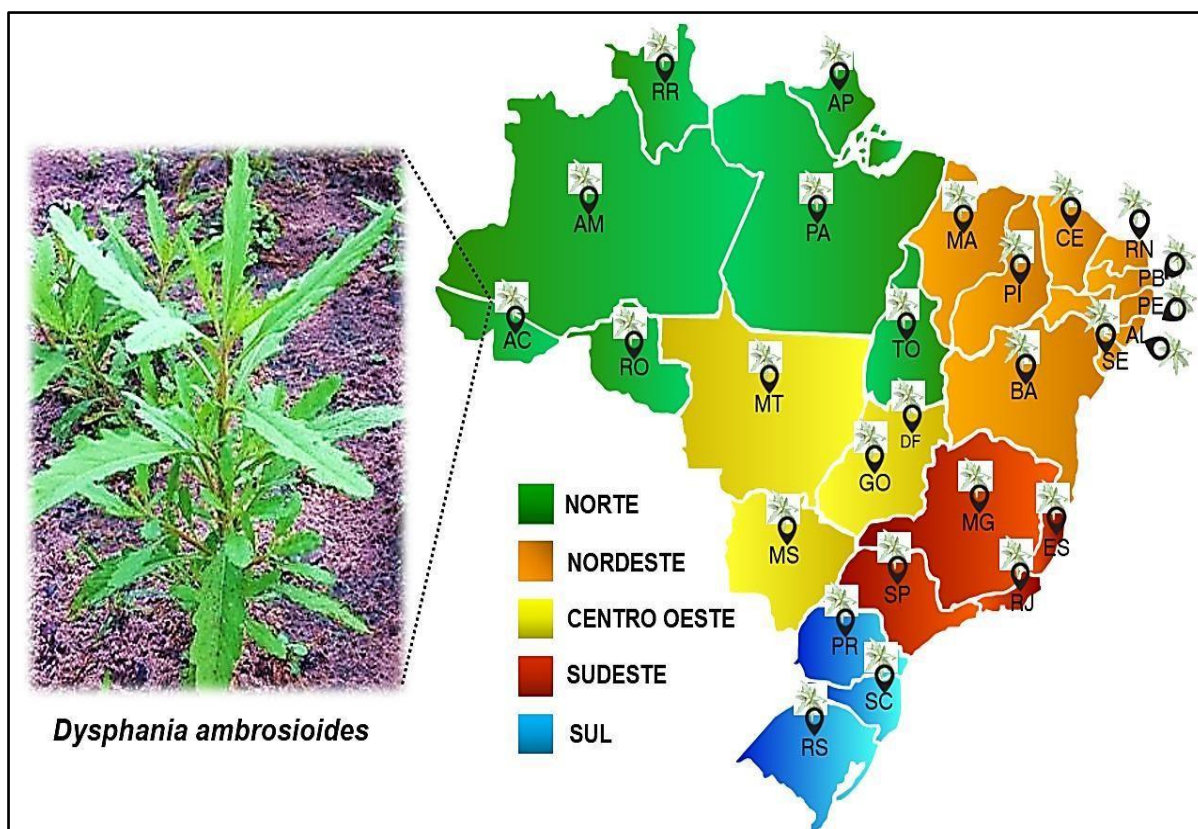


Figura 11. Distribuição de *Dysphania ambrosioides* pelo Brasil. (Rodrigues, 2020).

#### 2.4.4 Propriedades farmacológicas de *Dysphania ambrosioides*

Diversas propriedades farmacológicas da espécie vegetal *D. ambrosioides* já foram comprovadas cientificamente, conforme sumarizado na Tabela 1.

**Tabela 1. Potencial farmacológico das folhas de *Dysphania ambrosioides* comprovado cientificamente.**

| Potencial farmacológico | Produto utilizado      | Tipo de Ensaio                    | Efeito farmacológico                                                                     | Autor,ano                                              |
|-------------------------|------------------------|-----------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------|
| Anti-esquistossomose    | Extrato hidroalcoólico | <i>In vitro</i><br><i>In vivo</i> | Efeito sobre cercarias, vermes adultos, na fase imatura do verme e ação imunomoduladora. | Rodrigues, 2021;<br>Silva, 2012;<br>Kamel et al., 2011 |
| Anti-tumoral            | Extrato hidroalcoólico | <i>In vivo</i>                    | Efeito anti-tumoral nas formas sólida e ascítica de Ehrlich.                             | Nascimento et al., 2006                                |
| Anti-plasmodio          | Extrato hidroalcoólico | <i>In vitro</i><br><i>In vivo</i> | Inibição do crescimento de <i>Plasmodium falciparum</i> em células infectadas;           | Cysne et al., 2016                                     |

|                                            |                                                 |                                   |                                                                                                                                                                                                                                    |                                                                                            |
|--------------------------------------------|-------------------------------------------------|-----------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------|
|                                            |                                                 |                                   | Aumento na sobrevivência e diminuição da parasitemia em animais infectados com <i>Plasmodium berghei</i> .                                                                                                                         |                                                                                            |
| Anti-fúngico                               | Extrato hidroalcoólico                          | <i>In vitro</i>                   | Redução dos biofilmes de <i>C. albicans</i> , sem evidência de efeitos citotóxicos.                                                                                                                                                | Zago et al., 2019                                                                          |
| Imunoestimulante                           | Extrato hidroalcoólico                          | <i>In vitro</i><br><i>In vivo</i> | Aumento do recrutamento e da atividade de macrófagos e recrutamento celular para órgãos linfóides secundários.                                                                                                                     | Cruz et al., 2007                                                                          |
| Tratamento da Cistite Hemorrágica          | Extrato hidroalcoólico                          | <i>In vivo</i>                    | Efeito anti-inflamatório e imunoestimulante, com diminuição do peso e da hemorragia da bexiga, aumento da proliferação de células linfóides.                                                                                       | Da Silva et al., 2015                                                                      |
| anti-artrite                               | Extrato hidroalcoólico                          | <i>In vivo</i>                    | Ação anti-artrite com redução das citocinas IL-6 e TNF- $\alpha$ , da dor e da inflamação sinovial.                                                                                                                                | Pereira et al., 2018; Calado et al., 2015.                                                 |
| Baixa Toxicidade                           | Extrato hidroalcoólico                          | <i>In vivo</i>                    | Efeito no tratamento sub-crônico não sendo letal e não induzindo alterações tóxicas.                                                                                                                                               | Pereira et al., 2010                                                                       |
| Ação no endotélio da aorta isolada de rato | Extrato e frações de acetato de etila e metanol | <i>In vivo</i>                    | Efeito no relaxamento do endotélio da aorta isolada de rato, possivelmente associado aos receptores muscarínicos e canais de potássio ativados por Ca <sup>2+</sup> .                                                              | Assaidi et al., 2019                                                                       |
| Regenerador ósseo                          | Extrato aquoso e Extrato hidroalcoólico         | <i>In vivo</i>                    | Indução de neoformação e remodelação óssea. Efeitos sobre as populações celulares do tecido ósseo e sobre o metabolismo ósseo, com alteração de proteínas e enzimas sanguíneas. Ação na prevenção de perda e na regeneração óssea. | Pinheiro et al., 2017; Penha et al., 2017; Soares et al., 2015; Pinheiro Neto et al., 2017 |
| Giardicida                                 | Extrato hidroalcoólico e aquoso                 | <i>In vitro</i>                   | Atividade giardicida dos extratos                                                                                                                                                                                                  | Neiva et al., 2011                                                                         |



|                                                    |                                                                 |                                   |                                                                                                                                                                                                                       |                                                                       |
|----------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------|
| Hipotensora                                        | Extrato aquoso, metanólico, acetato de etila e frações aquosas  | <i>In vivo</i>                    | Os extratos avaliados induzem efeito hipotensivo que pode estar parcialmente associado aos seus efeitos cardíacos.                                                                                                    | Assaidi et al., 2014                                                  |
| Leishmanicida                                      | Extrato hidroalcoólico, frações acetato de etila e clorofórmica | <i>In Vitro</i><br><i>In vivo</i> | Eficácia moderada sobre as formas promastigotas de <i>Leishmania</i> amazonenses; Extrato hidroalcoólico e fração etila possuem efeito terapêutico anti- <i>Leishmania</i> na infecção <i>in vitro</i> de macrófagos. | Patricio et al., 2006;<br>Reis et al., 2014                           |
| Nematicida/<br>Anti-helmintico                     | Extrato hexano;<br>Extrato metanólico                           | <i>In vitro</i><br><i>In vivo</i> | Efeito parasitário contra <i>H. contortus</i> ; Efeito parasitário contra <i>Xiphinema index</i> ; Atividade sobre nematóides gastrointestinais ( <i>H. contortus</i> ).                                              | Zamilpa et al., 2018;<br>Insuna et al., 2001;<br>Jabbar et al., 2007. |
| Anti-inflamatório, anti-nociceptivo e cicatrizante | Extrato etanólico;<br>Extrato hidroalcoólico e extrato aquoso   | <i>In vivo</i>                    | Efeito anti-inflamatório no edema de orelha induzido por formalina, cicatrizante; Redução do número de contorções abdominais induzido por ácido acético; Atividade no reparo tecidual eficiente.                      | Grassi et al., 2013;<br>Mendes, 2011.                                 |
| Efeito antifertilidade                             | Extrato metanólico                                              | <i>In vivo</i>                    | Eficácia na supressão reversível da fertilidade masculina                                                                                                                                                             | Ain et al., 2018                                                      |

Há também propriedades já descritas para o óleo extraído das partes aéreas, como mostrado na tabela 2

**Tabela 2. Potencial farmacológico do óleo essencial das folhas de *Dysphania ambrosioides* comprovado cientificamente disponível na literatura.**

| Potencial farmacológico                        | Ensaio experimental | Efeito farmacológico                                                                                                                                                                                                                                                                | Autor                                     |
|------------------------------------------------|---------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------|
| Antibacteriana, esquistossomicida e citotóxica | <i>In vitro</i>     | Inibição da bomba de efluxo em <i>Staphylococcus aureus</i> IS-58s; Atividade sobre <i>Streptococcus sobrinus</i> e <i>Enterococcus faecalis</i> ; eficácia significativa na ação esquistossomicida em vermes adultos, sendo que na toxicidade avaliada o óleo foi mais tóxico para | Lima et al., 2017;<br>Soares et al., 2017 |



| os vermes adultos de <i>S. mansoni</i> do que as células GM 07492 - A. |                                   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |                                              |
|------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------|
| Amebicida                                                              | <i>In vitro</i><br><i>In vivo</i> | Ação anti-amoeba e contra <i>Entamoeba histolytica</i>                                                                                                                                                                                                                                                                   | Avila-Blanco et al., 2014                    |
| Leishmanicida                                                          | <i>In vitro</i><br><i>in vivo</i> | Ação sobre <i>Leishmania amazonenses</i> ; Efeito da nanoencocleação de princípios ativos oleosos contra <i>Leishmania amazonenses</i> .                                                                                                                                                                                 | Monzote et al., 2014.<br>Machín et al., 2019 |
| Vermífugo                                                              | <i>In vitro</i>                   | Efeitos fungitóxicos sobre <i>Aspergillus flavus</i> , <i>Aspergillus glaucus</i> , <i>Aspergillus niger</i> , <i>Aspergillus ochraceous</i> , <i>Colletotrichum gloesporioides</i> , <i>Colletotrichum musae</i> , <i>Fusarium oxysporum</i> e <i>Fusarium semitectum</i> sugerindo-se o ascaridol como esse potencial. | Jardim et al, 2008                           |
| Inseticida                                                             | <i>In vivo</i>                    | Toxicidade contra as espécies <i>C. maculatus</i> e <i>S. zeamais</i> ; Efeito toxico sobre <i>M. doméstica</i> .                                                                                                                                                                                                        | Denlove et al., 2010;<br>Pavela et al., 2018 |

Visto o potencial farmacológico já relatado para *D. ambrosioides* como imunomodulador, anti-protozoario, antimicrobiano, anti-inflamatório e anti-esquistossomose, essa espécie vegetal se torna importante alvo na descoberta e desenvolvimento de novos fármacos, principalmente fármacos que possam ser utilizados no tratamento da esquistossomose, seja de forma isolada, seja em associação ao Praziquantel, visando aumentar sua eficácia reduzindo seus efeitos adversos e a resistência do parasito. A associação pode também contribuir para o controle da reprodução do verme e da oviposição, como forma de melhor controlar os efeitos deletérios da esquistossomose nos seres humanos e animais vertebrados. Dessa forma, a busca e identificação de espécies vegetais e de compostos biológicos ativos como alvo profilático ou terapêutico, torna-se de extrema importância para o controle da infecção por *Schistosoma mansoni*.

## 2.5 Própolis verde

A própolis é uma substância elaborada pelas abelhas, é constituída a partir de diferentes partes das plantas, tais como, folhas, brotos, gomas, flores, cascas e exsudatos resinosos, enzimas salivares, cera, pólen, além de conferir revestimento da colmeia (PARK et al., 2002;

TORETI et al., 2013; GREENAWAY et al., 1990). A palavra própolis tem origem grega e significa “pro” defesa e “polis = cidade (WAGH, 2013).

A Própolis verde é um material elaborado por abelhas da espécie *Apis mellifera*, que fragmentam ápices vegetativos de *Baccharis dracunculifolia*, este material é utilizado popularmente no tratamento da tuberculose, úlcera duodenal, distúrbios gástricos, redução da febre, doenças inflamatórias, analgésico, anticancerígeno, bem como por sua atividade antimicrobiana (SFORCIN et al., 2001; SALATINO et al., 2005).

A própolis é um material resinoso de composição química complexa sendo na maioria das vezes composta de 50% de resina, 30% de cera, 10% de óleos essenciais, 5% de pólen e outras 5 % de substâncias que incluindo minerais e ácidos fenólicos (cinâmico e o cafeíco), ou seus estéres, flavonoides, terpenóides, esteroides, açúcares e aminoácidos (BANKOVA, 2005).

### **2.5.1 Propriedade anti-inflamatória e mecanismos imunomoduladores da própolis**

Existem diversos estudos descrevendo a própolis como um produto com efeito anti-inflamatório e imunomodulador nas respostas imunes. A ação anti-inflamatória da própolis foi relatada em modelos experimentais *in vivo* tanto em seres humanos quanto em modelos murinos. Em seres humanos, Silveira et al., (2022) demonstraram que pacientes que receberam 200 mg/dia de EPP-AF® por 4 semanas, apresentaram uma redução significativa de citocinas pró-inflamatórias, IFN- $\gamma$ , IL-13, IL-17, IL-1ra, IL-8 e TNF- $\alpha$  e mudanças significativas foram encontradas nos níveis de PCR-Hs. Conte et al., (2021), avaliando o efeito da própolis sobre a resposta inflamatória em indivíduos PVHA, identificaram que o tratamento não alterou a produção de citocinas plasmática e a produção de citocinas pelas células mononuclear de sangue periférico, entretanto, foi detectado aumento da expressão de Foxp3 e aumento na proliferação de linfócitos.

Hori et al., (2013) identificaram que o Extrato Padronizado de Própolis (EPP-AF®) reduziu a secreção da citocina IL-1 $\beta$  em macrófagos o que segundo os autores, pode estar associada com uma redução na ativação da *protease caspase-1*, além disso, relataram *que* uso de EPP-AF® na concentração de 30  $\mu$ g/mL não apresentou toxicidade após 18 horas de tratamento. O extrato etanólico de própolis mostrou efeito anti-inflamatório com mecanismos associados sobre o rolamento e adesão de leucócitos na microcirculação mesentérica, assim como na inibição de mediadores como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , CXCL1/KC e CXCL2/MIP-2, reduzindo a quimiotaxia de neutrófilos induzida por CXCL2/MIP-2 sem dados a viabilidade celular, assim

como redução do influxo de cálcio induzido pelo mediador CXCL2/MIP-2. No estudo, as concentrações de própolis avaliadas não alteraram a expressão de CXCR2 por neutrófilos (BUENO-SILVA et al, 2016).

Hsieh et al., (2018), identificaram *in vitro* que o extrato alcoólico de própolis ocasionou a inibição de IL-1 $\beta$  e redução do fator nuclear kappa B e a produção de espécies reativas de oxigênio, assim como a inibição do inflamassoma NLRP3. Na análise *in vivo*, os autores identificaram que a própolis atenuou o aumento de neutrófilos no peritônio e os níveis de IL-1 $\beta$ , caspase-1 ativa, IL-6. Kashiwakura et al., (2020), evidenciaram *in vitro* que o tratamento da própolis induziu a supressão em basófilos de IgE/antígeno de IL-4, IL-6 e IL-13 e inibiu a fosforilação das moléculas sinalizadoras Fc $\epsilon$ RI Lyn, Akt e ERK. *In vivo*, a própolis não afetou a população de basófilos, mas inibiu a IgE-CAI. A indução por ovalbumina na anafilaxia intestinal que envolve a reação de basófilos e produção de IL-4 os autores identificaram que após tratamento com própolis foi atenuada.

Shimizu et al., (2019), investigando o extrato de própolis no modelo *in vivo* de colite induzido por DSS, demonstraram que o extrato suprimiu a colite induzida por DSS. Sendo identificado o efeito da própolis na atenuação da perda de peso, encolhimento do cólon, níveis plasmáticos aumentados e aumento dos níveis de citocinas pró-inflamatórias TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-17a. Camundongos machos Wistar tratados com própolis apresentaram redução do edema de pata por carragenina e redução dos níveis de PGE2, TNF- $\alpha$ , MPO e malondialdeído e aumento das atividades enzimáticas de SOD, CAT e GPx (BOUFADI et al., 2021). Boufadi et al., (2014), demonstraram a inibição da MPO, o que pode estar associado ao efeito anti-inflamatório da própolis.

Hu et al., (2005), demonstraram o efeito anti-inflamatório da própolis sobre o vazamento de vasos capilares torácicos em camundongos, redução do edema de pata e pleurisia induzidos por carragenina, além da redução do edema pulmonar agudo. Estes mecanismos anti-inflamatórios podem estar associados a diminuição de PGE2 e NO. Na indução de artrite induzida por adjuvante completo de Freund (FCA), o tratamento com própolis aumentou IL-6, mas não apresentou efeito sobre os níveis de IL-2 e IFN- $\gamma$ .

A administração de própolis resultou na redução nos níveis séricos de E-selectina, SGPT e creatinina, assim como na redução da expressão de E-selectina identificada a partir de exames histopatológico e imuno-histoquímico, efeitos anti-inflamatórios associados ao efeito protetor da própolis (REDHNO et al., 2022).

Bachiega et al., (2012), demonstraram que a própolis não afetou a viabilidade celular sobre macrófagos, estimulou o aumento de IL-1 $\beta$  e inibiu a produção de IL-6 e IL-10 por macrófagos peritoneais, mesmo na presença de LPS. Conti et al., (2015), avaliando amostras de própolis do Brasil, Cuba e México, os autores identificaram que as amostras de própolis não afetaram a viabilidade celular de monócitos humanos. No estudo foi visto também que, a própolis brasileira estimulou a produção de TNF- $\alpha$  e IL-10, a própolis cubana induziu a produção de TNF- $\alpha$  e inibiu a produção de IL-10 enquanto a própolis mexicana inibiu a produção de TNF- $\alpha$  e estimulou a produção de IL-10, efeitos estes associados as viabilidades químicas das amostras, ocasionando mecanismos de ação diferentes, com efeitos pró ou anti-inflamatórios.

*In vitro*, Tao et al., (2014), demonstraram que a própolis aumentou a função fagocítica de macrófagos e a liberação de IL-1 $\beta$ , IL-6 e IFN- $\gamma$ . Dados *in vivo* do mesmo estudo demonstraram a indução de concentrações mais altas de IgG, IL-4 e IFN- $\gamma$  no soro e as taxas de proliferação de linfócitos esplênicos o que pode estar associado sobre o efeito da imunidade humoral. Foi visto o efeito da própolis também sobre a supressão do crescimento tumoral, e uma imunoestimulação de células T CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> e no número total de células T auxiliares em camundongos (KIMOTO et al., 1998).

A própolis estimulou IL-1 $\beta$  e os receptores TLR-2 e TLR-4 em macrófagos peritoneais de camundongos. No baço, também ocorreu regulação na expressão de TLR-2, TLR-4 e na produção de citocinas IL-1 $\beta$  e IL-6, efeitos estes associados a modulação dos mecanismos da resposta imunológica inata (ORSATTI et al., 2010). Fischer et al., (2007), demonstraram também que a própolis aumento dos títulos de anticorpos neutralizantes.

Orsatti et al., (2010), estudaram os efeitos imunomoduladores da própolis e identificaram que macrófagos peritoneais tratados com própolis aumentaram a secreção de IL-1 $\beta$  e a expressão de TLR-2 e TLR-4. Em células do baço, os autores identificaram que a expressão dos receptores TLR-2 e TLR-4 assim como a produção das citocinas IL-1 $\beta$  e IL-6 foram reguladas positivamente. Song et al., (2020), avaliando a indução de *H. pylori* sobre células gástricas de adenocarcinoma humano *in vitro*, observaram que após tratamento com própolis, a produção de IL-8, IL-12, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , COX-2 e óxido nítrico diminuiu significativamente. A própolis também apresentou atividade sobre a eliminação de radicais livres, aumentou a expressão de proteínas e mRNA de enzimas antioxidantes, como HO-1, NQO1, GCLM e SOD1.

Estudos demonstraram que a própolis em modelo experimental *in vivo* sobre helmintos, foi capaz de reduzir os níveis de IL-10, IgE, IgG e os níveis séricos de ALT, AST e hidroxiprolina hepática, dados imuno-histoquímicos demonstram também o efeito da própolis sobre a expressão de colágeno tipo IV (El-SISI et al. 2011). Em conjunto esses resultados demonstram o efeito promissor da própolis sobre a resposta imunológica e bioquímica.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Geral

Avaliar os efeitos do uso de produtos naturais imunomoduladores em camundongos infectados por *Schistosoma mansoni*

#### 3.2 Específicos

- ❖ Avaliar se o uso do EHDA, EHDA+PZQ e do EPP-AF® impediu o desenvolvimento da infecção na fase aguda;
- ❖ Avaliar o número de ovos retidos no fígado e intestino de camundongos infectados por *S. mansoni* ausente de tratamento e tratados;
- ❖ Avaliar se o EHDA a associação (EHDA+PZQ) e EPP-AF® apresentaram efeito em melhorar o quadro histopatológico;
- ❖ Investigar as alterações histomorfométricas no fígado, intestino e rim dos grupos infectados ausente de tratamento e tratados;
- ❖ Investigar o perfil leucocitário ao 30 e 90 dias pós tratamento em animais infectados;
- ❖ Investigar a ocorrência de eosinofilia sanguínea;
- ❖ Avaliar a expressão de IgE Total;
- ❖ Avaliar a expressão de citocinas dos padrões Th1, Th2, Th17 e Treg no soro e baço de camundongos infectados por *S. mansoni* ausente de tratamento e tratados;
- ❖ Imunofenotipagem de células no baço de camundongos infectados por *S. mansoni* ausente de tratamento e tratados;

## 4. RESULTADOS

### 4,1 CAPÍTULO I

**O uso de *Dysphania ambrosioides* associada ou não com Praziquantel reduz a carga parasitária e danos inflamatórios na esquistossomose experimental**

**O trabalho avalia pela primeira vez a eficácia do uso prolongado do extrato de *D. ambrosioides* e de sua associação a um fármaco antiparasitário *in vivo* sobre a infecção por *S. mansoni*.**

**Trabalho será submetido no periódico *Frontiers in Immunology*, em 2024.**

## 4.2 MANUSCRITO I

### **O uso de *Dysphania ambrosioides* associada ou não com Praziquantel reduz a carga parasitária e danos inflamatórios na esquistossomose experimental**

Vitor Augusto Ferreira dos Santos <sup>1</sup>, Irla Correia Lima Licá <sup>2</sup>, Gleycka Cristine Carvalho Gomes Frazão <sup>3</sup>, Ranielly Araujo Nogueira <sup>4</sup>, Maria Gabriela Sampaio Lira<sup>5</sup>, João Gustavo Mendes Rodrigues <sup>6</sup>, Guilherme Silva Miranda <sup>7</sup>, Sulayne Janayna Araujo Guimarães <sup>8</sup>, Lucilene Amorim Silva <sup>9</sup>, Rosane Nassar Meireles Guerra <sup>10</sup>, Flávia Raquel Fernandes Nascimento<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Imunofisiologia, Universidade Federal do Maranhão, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Brasil. <sup>2</sup>Laboratório de Imunofisiologia, Universidade Federal do Maranhão, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Brasil. <sup>3</sup>Laboratório de Imunofisiologia, Universidade Federal do Maranhão, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Brasil. <sup>4</sup>Laboratório de Imunofisiologia, Universidade Federal do Maranhão, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Brasil. <sup>5</sup>Laboratório de Imunofisiologia, Universidade Federal do Maranhão, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Brasil. <sup>6</sup>Laboratório de parasitologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biológicas, Brasil. <sup>7</sup>Laboratório de parasitologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biológicas, Brasil. <sup>8</sup>Laboratório de Imunologia Aplicada ao Câncer, Universidade Federal do Maranhão, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Brasil. <sup>9</sup>Laboratório de Patologia e Imunoparasitologia, Universidade Federal do Maranhão, Departamento de Patologia, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Brasil. <sup>10</sup>Laboratório de Imunofisiologia, Universidade Federal do Maranhão, Departamento de Patologia, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Brasil. <sup>1</sup>Laboratório de Imunofisiologia, Universidade Federal do Maranhão, Departamento de Patologia, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Brasil.

**\*Correspondence:**

Vitor Augusto Ferreira dos Santos

[Vitor.augusto@discente.ufma.br](mailto:Vitor.augusto@discente.ufma.br)

## RESUMO

**Introdução:** As doenças parasitárias representam um dos maiores problemas de saúde pública em vários países, tornando necessária a busca por novas estratégias terapêuticas e estas alternativas podem estar baseadas na utilização de produtos naturais. A espécie vegetal *D. ambrosioides* tem se mostrado promissora no tratamento de infecções, como as helmínticas, entretanto, vários mecanismos de ação sobre seus efeitos sobre helmintos ainda permanecem desconhecidos.

**Objetivo:** Avaliar os efeitos do uso do extrato hidroalcoólico das folhas de *D. ambrosioides* e sua associação com Praziquantel no desenvolvimento da infecção por *Schistosoma mansoni* em camundongos.

**Materiais e métodos:** Para o ensaio *in vivo* camundongos Swiss foram infectados com 70 cercárias de *S. mansoni* e separados em grupos de acordo com os tratamentos: Controle negativo (CN - sem tratamento), controle positivo (PZQ - tratado com Praziquantel®), EHDA (tratado com EHDA durante a fase aguda da infecção), EHDA+PZQ (tratado com EHDA associado a Praziquantel durante a fase aguda da infecção). Os animais tratados com o extrato isolado ou associado ao Praziquantel receberam 5 mg/kg por via oral durante 30 dias por gavagem, ambos tratamentos tiveram início após a infecção. O estudo incluiu um grupo SHAM (não infectados e não tratados). Antes da eutanásia, os animais, tiveram exames de sangue realizado no intervalo de 30 e 90 dias e contagem de ovos nas fezes realizada em intervalos de 5 dias. No 90º após a infecção, foi avaliado o número de ovos no fígado e intestino; histopatologia do fígado, intestino e rim; níveis de celularidade sanguínea, esplênica, medula óssea e peritoneal e de citocinas e IgE no soro. Além disso, também foi determinada a expressão de marcadores celulares no baço, e os níveis de citocinas no sobrenadante de culturas de células esplênicas.

**Resultados:** EHDA e EHDA+PZQ reduziu o número de ovos nas fezes, fígado e intestino, assim como os danos teciduais no fígado, intestino e rim, essa redução foi acompanhada da diminuição da inflamação granulomatosa nos respectivos órgãos. O EHDA e EHDA+PZQ reduziram leucócitos e eosinofilia sanguínea após 30 e 90 dias de infecção. O tratamento com EHDA reduziu o número de linfócitos e aumentou os macrófagos e neutrófilos no baço. O grupo EHDA+PZQ reduziu o número de linfócitos e aumentou o número de linfócitos B e macrófagos. Em relação às citocinas no baço, o grupo EHDA reduziu a IL-6 e a IL-4. O grupo EHDA+PZQ reduziu a IL-2, a IL-4 e a quimiocina MIP-1.

**Conclusão:** Nossos resultados demonstram o efeito antiparasitário do EHDA e de sua associação ao praziquantel (EHDA+PZQ). Efeito associado aos mecanismos imunomoduladores e anti-inflamatórios durante a fase aguda da infecção, o que promoveu um prognóstico benéfico no decorrer da infecção.

**Palavras-chave:** Esquistossomose; *Schistosoma mansoni*; Inflamação granulomatosa; *Dysphania ambrosioides*; Associação praziquantel



## 1 Introdução

A esquistossomose é uma infecção causada por parasitas trematódeos do gênero *Schistosoma* (1, 2). Esta doença infecto-parasitária é considerada um grande problema de saúde pública em 78 países. Afeta aproximadamente 240 milhões de pessoas em regiões tropicais e subtropicais, com aproximadamente 700 milhões de indivíduos vivendo em áreas endêmicas, com alto risco de infecção (3, 2). Este elevado risco de infecções está associado a factores sociais, como a pobreza extrema e o saneamento inadequado, que contribuem para o aumento das taxas de infecção (4, 5).

A doença ocorre nas fases aguda e crônica. A fase aguda é caracterizada pela invasão de cercárias e migração de esquistossômulos e vermes adultos para os tecidos do hospedeiro humano, fase em que se inicia a oviposição. Após a infecção, a fase inicial da resposta imune está relacionada ao mecanismo inato, mas alguns dias depois, a resposta imune adaptativa, predominantemente Th1, é estabelecida. A resposta imune Th1 é um estágio curto e mediada imunologicamente por mediadores pró-inflamatórios, como as interleucinas IL-1, IL-12, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  (6, 7).

Em contraste, a fase crônica é caracterizada por uma mudança para um perfil modulador Th2 intensificado após várias semanas. A resposta imune Th2 apresenta como principais mediadores as citocinas IL-4, IL-13, IL-6, IL-10, IL-5 e IL-21. Durante a fase crônica da esquistossomose também é possível detectar níveis aumentados de anticorpos IgG1, IgG4 e IgE e de eosinófilos, basófilos, mastócitos e macrófagos activados que desempenham um papel crucial no controlo da infecção. Nesse período, as células inflamatórias são gradativamente eliminadas, consequentemente substituídas por fibroblastos, o que pode causar calcificação dos granulomas (6, 8, 7).

Para quimioterapia esquistossomótica, o Praziquantel (PZQ) tem sido o medicamento de escolha há mais de 30 anos (9, 10). No entanto, alguns estudos mostraram efeitos colaterais deste medicamento, associados à baixa eficácia em vermes jovens, há também evidências de que o PZQ não previne a reinfecção e é ineficaz no ciclo de vida do parasita (11, 10, 12, 13, 14). O uso massivo deste medicamento como tratamento primário para esquistossomose aumenta a preocupação sobre a resistência dos vermes ao medicamento (15, 16).

Com base nessas descobertas e considerando a necessidade de encontrar novas alternativas terapêuticas, os quais podem ter como alvos principais os produtos de origem

vegetal. De fato, os produtos naturais são frequentemente estudados como fontes para a descoberta do desenvolvimento de novos e inovadores fármacos para o tratamento de doenças, incluindo infecções parasitárias, pois apresentam variados metabólitos com efeitos biológicos (17, 18).

O grupo de pesquisa do Laboratório de Imunofisiologia vem investigando, há alguns anos, o potencial terapêutico de espécies vegetais contra diferentes agentes infecciosos. Dentre as espécies vegetais é possível descrever *Dysphania ambrosioides* L. (Chenopodiaceae), um arbusto herbáceo conhecido no Brasil como ‘mastruz’ ou ‘erva-de-Santa-Maria’ (19). Dados experimentais obtidos pelo nosso grupo e por outros autores detectaram diversos efeitos como antitumoral (20), imunoestimulante (21), antiesquistossomótico e imunomodulador (22), antiplasmodial (23), leishmanicida (24), anti-inflamatório (25), antiartrítico (26, 27) e regenerador ósseo (28).

Com base nisso, o presente estudo avaliou o efeito do extrato hidroalcoólico das folhas de *D. ambrosioides* associado ao Praziquantel na evolução da esquistossomose em modelo experimental.

## 2 Materiais e métodos

### 2.1 Material vegetal

O extrato hidroalcoólico das folhas de *Dysphania ambrosioides* utilizado neste estudo apresenta análise da composição química já publicada. Os compostos majoritários encontrados no extrato foram kaempferol e quercetina (Rodrigues et al., 2021).

### 2.2 Ensaio *in vivo*

#### 2.2.1 Animais

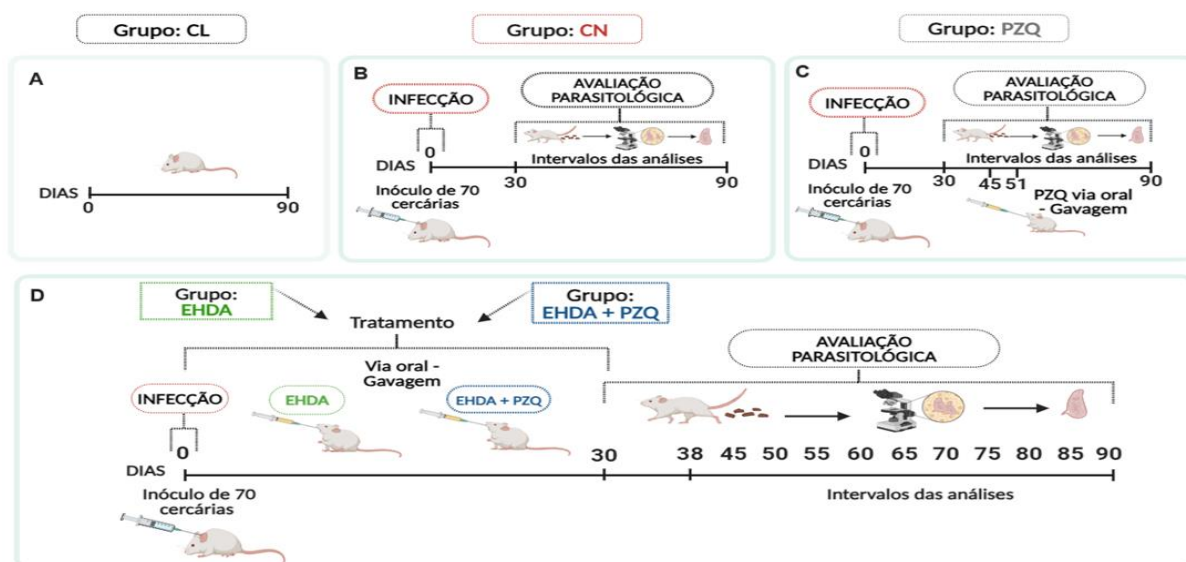
No estudo, foram utilizados camundongos Swiss machos, com 2-3 meses de idade (35g), oriundos do Biotério Central da Universidade Federal do Maranhão. Todos os procedimentos foram previamente aprovados pela Comissão de Ética para o Uso de Animais (CEUA) da UFMA, sob o número 23115.002254/2020-18. Ressalta-se que, os experimentos foram realizados por pesquisadores treinados.

### 2.2.2 Infecção e tratamento dos camundongos

Camundongos Swiss (n=30) foram divididos em cinco grupos de seis animais cada, sendo um grupo não infectado e quatro grupos infectados. A infecção dos animais foi realizada com 70 cercárias viáveis de *S. mansoni* (estirpe LE) inoculadas por via subcutânea (29).

Os grupos experimentais estão descritos da seguinte forma: Controle Limpo (CL) Camundongos não infectados, utilizados como parâmetro fisiológico saudável (Figura 1A). Controle Negativo (CN) Camundongos infectados, sem tratamento (Figura 1B). Controle Positivo (PZQ) Camundongos tratados com Praziquantel na dose de 50mg/Kg, por via oral, gavagem, o tratamento ocorreu no intervalo do 45º a 51º dias após a infecção (Figura 1C) (30). O tratamento com EHDA e EHDA+PZQ ocorreu durante 30 dias consecutivos, sendo iniciada logo após a infecção, a dose administrada foi de 5mg/Kg, por via oral por gavagem (Figura 1D).

Após a infecção foi realizada a coleta de fezes dos animais nos intervalos de 0, 15, 30, 38, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85 e 90 dias, para avaliar a cinética de ovos liberados. No dia 90 os animais foram eutanasiados e foi realizada a coleta de sangue, lavado peritoneal, medula óssea, baço, fígado, intestino e rim.



**FIGURA 1**

Delineamento experimental dos grupos tratados ou não. Controle limpo - CL (A), controle negativo - CN (B), controle positivo – PZQ (C), EHDA e EHDA+PZQ (D). Fonte: Criado com BioRender.com.

### 2.2.3 Quantificação de ovos de *S. mansoni* nas fezes e retidos no fígado e intestino

A quantificação de ovos eliminados nas fezes ocorreu inicialmente com a obtenção das amostras, que foram pesadas e homogeneizadas com 10mL de solução tamponada de formaldeído a 10%. Posteriormente foram submetidas ao microscópio óptico para contagem de ovos, sendo o resultado obtido da contagem convertido para ovos/grama de fezes (31). Para a avaliação da estimativa do número de ovos retidos no fígado e intestino utilizou-se a metodologia descrita por (32), obtendo-se o lobo hepático direito e fragmento do intestino delgado de cada camundongo após a necropsia, com o auxílio da solução de hidróxido de potássio (KOH 5%) o processo de digestão individual de cada animal foi realizado.

### 2.2.4 Avaliação histopatológica e histomorfométrica dos granulomas do tecido hepático, intestinal e renal

Amostras do tecido hepático, intestinal e renal de cada animal foram armazenados em formaldeído a 10% por 48 h. Após fixação, todas as amostras foram lavadas e colocadas em álcool 70%. Posteriormente as amostras foram desidratadas em séries crescentes de álcool, diafanizadas em xilol, e embebido em parafina, para posterior preparação das lâminas histológicas, que foram coradas com hematoxilina e eosina (HE) (33). Os parâmetros histopatológicos foram avaliados por microscopia de luz óptica. Os parâmetros histopatológicos analisados nas amostras foram: Quantidade de ovos, presença de granulomas, extensão de granulomas, fibrose, lesão tecidual, necrose, infiltrado inflamatório e congestão vascular. A avaliação destes parâmetros se deu através da classificação de pontuações como, ausente (0), leve (1), moderado (2) ou intenso (3) (34), com adaptações. A análise histomorfométrica (Contagem do número e área dos granulomas) foi realizada com imagens de seis campos aleatórios por amostra histológica obtida em fotomicroscópio, modelo Zeiss Axio Scope.A1, acoplado a um computador, utilizando o software ImageJ 6.0 (Bethesda, Maryland, EUA).

### 2.2.5 Análise de leucócitos no sangue aos 30° e 90 ° dia

Ao 30° dia, foi realizada uma incisão na ponta da cauda dos camundongos e coletado alíquotas de 10µL de sangue. Ao final do 90° os animais foram eutanasiados e foi realizada uma nova coleta de sangue (Alíquotas de 10µL de sangue). Em ambas as amostras de cada animal,

foi realizado o preparado de esfregaços sanguíneos para contagem diferencial dos leucócitos. Os esfregaços foram corados com um kit panóptico rápido (Laborclin, Brasil) (35).

#### 2.2.6 Ensaio imunoenzimático (ELISA) no soro e no sobrenadante da cultura de baço

A quantificação de IL-10, IL-17, TNF- $\alpha$ , IgE Total no soro e MIP-1 no sobrenadante da cultura de baço foi quantificado pelo ensaio ELISA, usando kits disponíveis comercialmente e seguindo as instruções fornecidas pelo fabricante (Bender MedSystems GmbH, Campus Vienna Biocenter 2, 1030 Viena Áustria). As informações disponíveis pelo fabricante das concentrações de proteínas de combinação foram utilizadas para gerar a curva padrão, esta curva foi usada para converter as leituras de absorção das amostras em concentrações de proteína (em pg/mL).

#### 2.2.7 Análise da celularidade da medula óssea, baço e peritônio

Para análise das células do lavado peritoneal, as amostras foram obtidas e em seguida centrifugadas com auxílio da centrífuga CitoSpin, após centrifugação as lâminas foram coradas com kit panóptico rápido (Laborclin, Brasil), a contagem foi realizada com auxílio de microscópio óptico de luz (36). Para análise da celularidade da medula óssea, inicialmente o fêmur foi obtido, em seguida foi perfundido com 1mL de solução salina tamponada com fosfato (PBS). Para obtenção dos esplênocitos, o baço foi moído, as amostras foram filtradas e ressuspensas em 3mL de PBS. Após isto, as suspensões celulares foram fixadas e coradas com cristal violeta de cristal na proporção de 9:1, com auxílio da câmara de Neubauer e microscópio óptico de luz as amostras foram avaliadas (21).

#### 2.2.8 Avaliação da celularidade do baço por citometria de fluxo

Células do baço ( $1 \times 10^6$ ) foram incubadas com anticorpos monoclonais conjugados a fluorocromos anti-CD3 conjugado a FITC, anti-CD19 conjugado a FITC, anti-F4/80 conjugado a FITC, anti-CD170 conjugado a FITC e anti-LY6G conjugado a PERCP, seguindo as recomendações do fabricante (BD Biosciences Pharmingen)

, os resultados foram analisados pelo software Flow Jow®.

#### 2.2.9 Cultura e quantificação de citocinas pela técnica CBA

As células do baço (após hemólise) foram cultivadas em placas de 96 poços ( $2 \times 10^5$  por poço) em meio RPMI 1640 completo (Sigma, EUA) suplementado com 2 mM de L-glutamina, 23 mM de L-asparagina, 0,1 mM de pirúvico ácido, ácido fólico 1 mM, estreptomicina a 1% (100 µg/mL), penicilina G (100 U/mL) e 2% de soro fetal bovino. As células foram incubadas por 48 horas a 37 °C e 5% CO<sub>2</sub> (37). A expressão de TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-6, IL-2, IL-10, IL-4 e IL-17 foi quantificada no sobrenadante da cultura celular do baço através do kit Th1/Th2/Th17 usando a técnica de microesferas (beads) CBA (Cytometric Bead Array), seguindo as informações do fabricante (BD Biosciences). Os resultados foram adquiridos pelo citometro de fluxo guava e após a leitura, os dados foram analisados com auxílio do software Flow Jow®. Os valores serão expressos em pg/mL para cada uma das citocinas, a partir das curvas padrão.

#### 2.3 Análise estatística

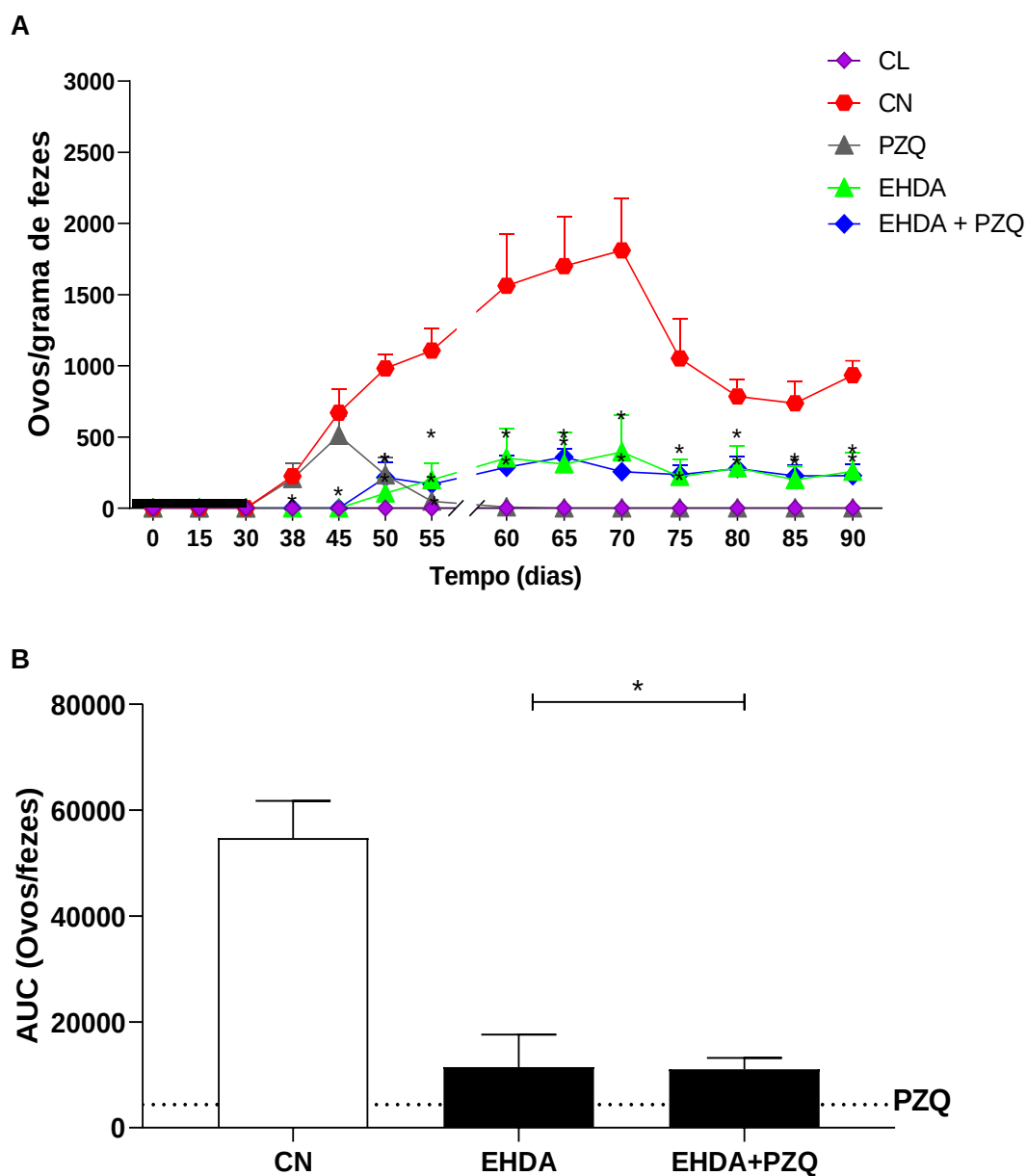
A análise estatística foi realizada com auxílio do Software GraphPad Prism, versão 8.0 (Prism Software, Irvine, Califórnia, EUA). Os dados foram inicialmente avaliados pelo teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov. Utilizando análise de t de Student ou por análise de variância (ANOVA) com pós-teste de Bonferroni. Os resultados foram apresentados como média  $\pm$  desvio padrão. No estudo, foi considerado resultados significativos quando  $p < 0,05$ .

### 3 Resultados

#### 3.1 O uso de EHDA reduziu o número de ovos nas fezes e retidos no fígado e intestino

O uso do dia 0 ao dia 30 pós-infecção, com EHDA isoladamente ou em associação com PZQ, reduziu o número de ovos nas fezes dos animais infectados a partir do 50º dia pós-infecção, com eficácia semelhante. A redução foi mais pronunciada entre o 60º e o 75º dia pós-infecção. Essa redução foi mantida até o 90º dia quando os animais foram eutanasiados (Figura 2A). Ao avaliar a área sob a curva (AUC), identificou-se que os grupo tratado com EHDA e

associado com EHDA+PZQ, reduziu significativamente a área sob a curva em comparação ao controle negativo (**Figura 2B**).

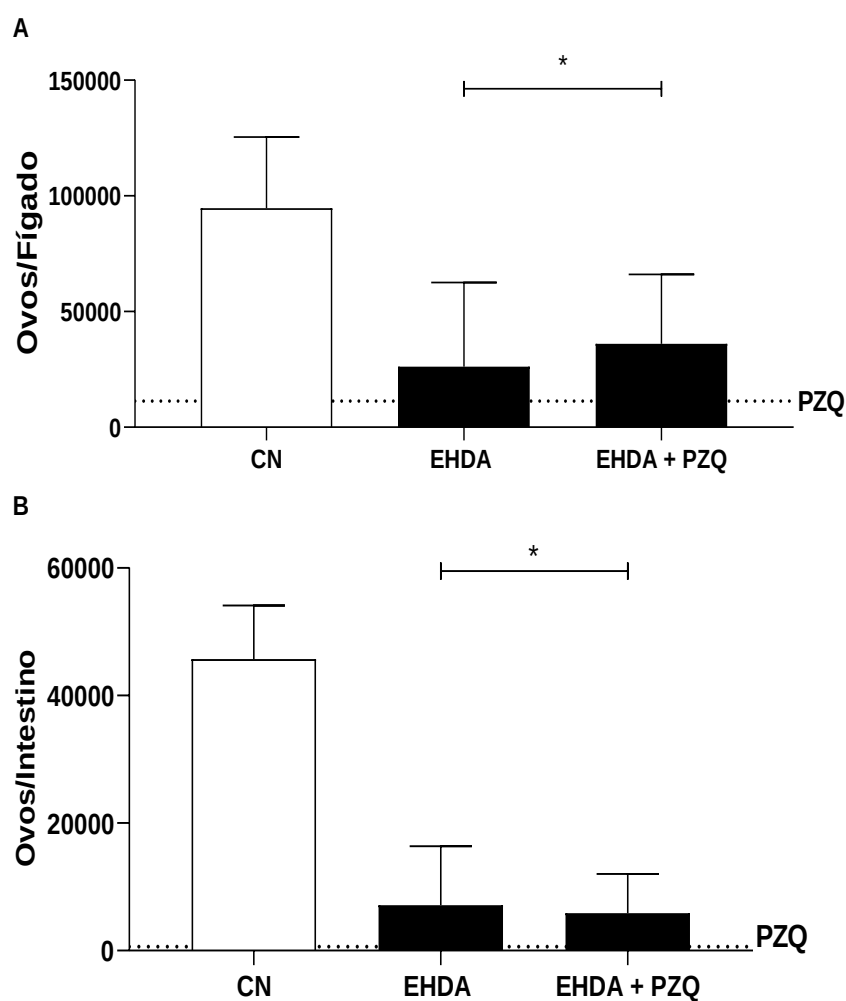


**FIGURA 2**

Efeito do EHDA e da sua associação ao Praziquantel (EHDA + PZQ) sobre o número de ovos liberados por camundongos infectados por *S. mansoni*. Número de ovos nas fezes (**A**) e área sobre a curva (**B**). As fezes foram coletadas nos intervalos do dia 0 ao 90 dia e avaliada a carga parasitária de ovos secretados. Os valores representam a média  $\pm$  desvio padrão de 6 animais por grupo. (\*)  $p < 0.05$  em comparação ao controle negativo.

### 3.2 EHDA reduz permanentemente o número de ovos no fígado e no intestino

O tratamento com EHDA sozinho ou combinado com PZQ reduziu o número total de ovos retidos no fígado (**Figura 3A**) e no intestino (**Figura 3B**).



#### FIGURA 3

Efeito do EHDA e da sua associação ao Praziquantel (EHDA + PZQ) sobre o número de ovos retidos no fígado e intestino de camundongos infectados por *S. mansoni*. Fígado (**A**) e intestino (**B**). Fragmentos do fígado e intestino foram obtidos para avaliação de ovos retidos. Os valores representam a média  $\pm$  desvio padrão de 6 animais por grupo. (\*)  $p < 0.05$  em comparação ao controle negativo.



### 3.3 O EHDA isolado ou associado ao PZQ (EHDA+PZQ) reduz parâmetros inflamatórios no fígado, intestino e rim

A histopatologia hepática (**Tabela 1**), mostra que no CN alterou todos os parâmetros em relação ao controle limpo. O tratamento com EHDA, reduziu a quantidade de ovos, extensão do granuloma e fibrose. O tratamento associado (EHDA+PZQ), reduziu a quantidade de ovos, presença de granulomas, extensão de granulomas, fibrose e lesão tecidual, ambos tratamentos em comparação ao controle negativo. Ao comparar os EHDA e EHDA+PZQ, foi possível observar que o tratamento associado apresentou efeitos, mas significativos.

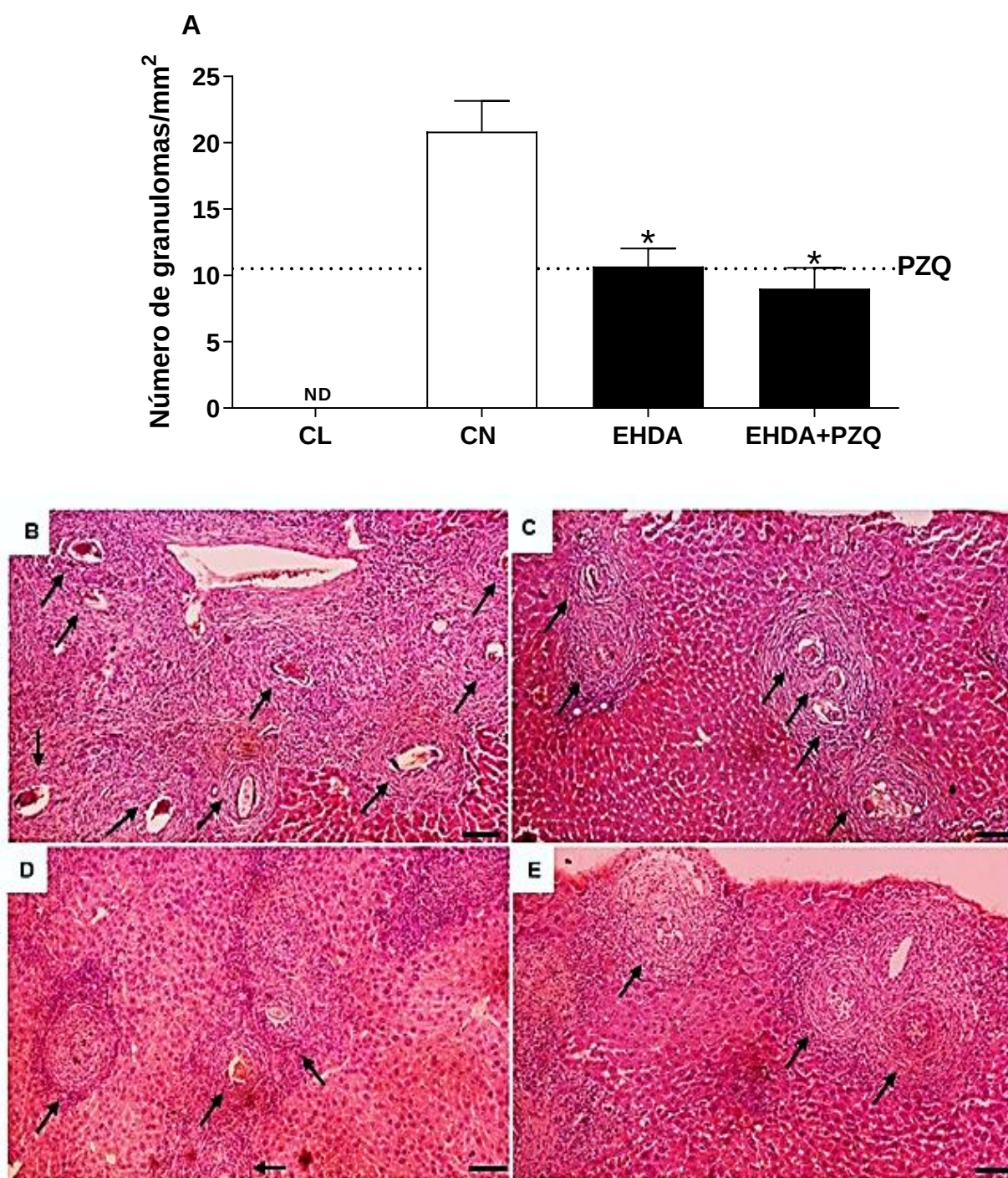
O tratamento com EHDA ou em associação com Praziquantel (EHDA+PZQ) reduziu o número de granulomas no fígado em comparação com o controle negativo (**Figura 4A**). Foi identificada uma redução no dano aos hepatócitos no grupo EHDA (**Figura 4D**). Essa redução pode estar associada à diminuição da fibrose, necrose e congestão vascular, observadas nesse grupo. Consequentemente, há uma regulação da inflamação granulomatosa no fígado, resultando do possível efeito hepatoprotetor do EHDA. Resultado semelhante foi identificado no grupo EHDA+PZQ (**Figura 4E**).

A área de granuloma no fígado e (**Figura 5A**), foi reduzida nos grupos tratados com EHDA ou com EHDA+PZQ em comparação ao controle negativo e ao grupo PZQ. Os granulomas detectados nos grupos EHDA e EHDA+PZQ são semelhantes (**Figura 5D e 5E**), mas mostraram uma organização diferente dos granulomas observados nos grupos controle negativo (**Figura 5B**) e PZQ (**Figura 5C**).

TABELA 1 Análise histopatológica do fígado de camundongos infectados ou não por *S. mansoni*, não tratados ou tratados com EHDA e EHDA+PZQ.

| Parâmetros Avaliados          | Grupos |                      |         |                      |                         |
|-------------------------------|--------|----------------------|---------|----------------------|-------------------------|
|                               | CL     | CN                   | PZQ     | EHDA                 | EHDA+PZQ                |
| <b>Quantidade de ovos</b>     | 0      | 3±0 <sup>@</sup>     | 2±0*    | 2±0*                 | 1.3±1.3*                |
| <b>Presença de granulomas</b> | 0      | 3±0 <sup>@</sup>     | 2±0*    | 2.6±0.5              | 1.6±1.3*                |
| <b>Extensão do granuloma</b>  | 0      | 3±0 <sup>@</sup>     | 2±0*    | 2±0*                 | 2±1.5*                  |
| <b>Fibrose</b>                | 0      | 2±0 <sup>@</sup>     | 1±0*    | 1±0*                 | 0.3±0.5* <sup># a</sup> |
| <b>Lesão tecidual</b>         | 0      | 3±0 <sup>@</sup>     | 2±0*    | 2.6±0.5 <sup>#</sup> | 2±0*                    |
| <b>Necrose</b>                | 0      | 1.3±0.5 <sup>@</sup> | 1±0     | 1±0*                 | 1.3±1.3                 |
| <b>Infiltrado</b>             | 0      | 3±0 <sup>@</sup>     | 2±0*    | 3±0 <sup>#</sup>     | 3±0 <sup>#</sup>        |
| <b>Congestão vascular</b>     | 0      | 1.3±0.5 <sup>@</sup> | 1.3±0.5 | 1±0*                 | 1.6±1                   |

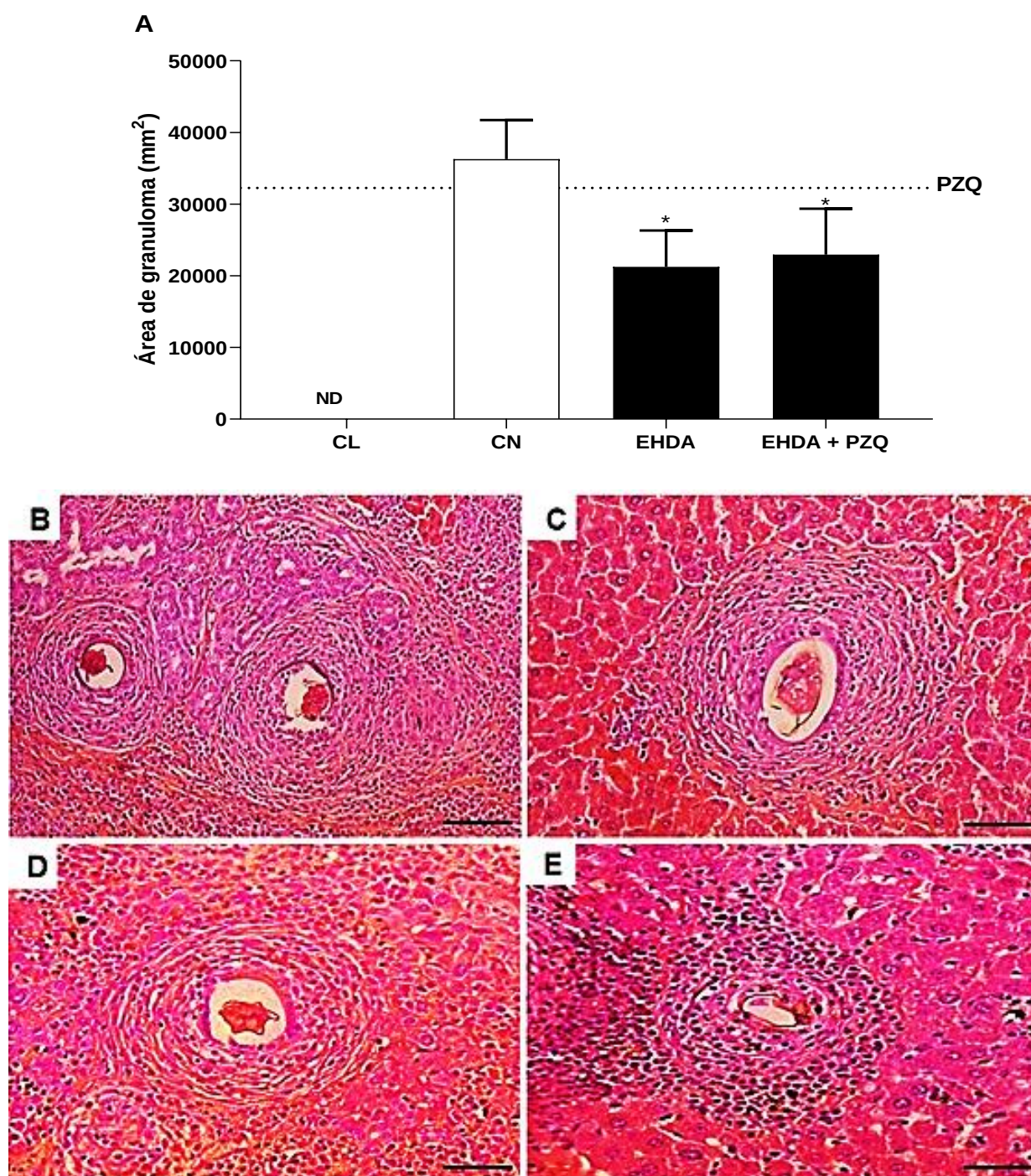
Os valores representam a média ± desvio padrão de 6 animais por grupo. @ p<0.05 em comparação ao controle limpo (CL); \* p<0.05 em comparação ao controle negativo (CN); #p<0.05 em comparação ao grupo PZQ; <sup>a</sup> p<0.05 em comparação aos EHDA ou EHDA+PZQ.



**FIGURA 4**

Efeito do EHDA e da sua associação ao Praziquantel (EHDA+PZQ) sobre o fígado. Número de granulomas hepáticos (A), fotomicrografias do tecido hepático: Controle negativo (B), PZQ (C), EHDA (D) e EHDA+PZQ (E). Cortes histológicos corados com HE (100X). Os valores representam a média  $\pm$  desvio padrão de 6 animais por grupo. (\*)  $p < 0.05$  em comparação ao controle negativo (CN).





**FIGURA 5**

Efeito do EHDA e da sua associação ao Praziquantel sobre o diâmetro dos granulomas hepáticos e fotomicrografias do fígado. Diâmetro médio de granulomas (**A**) e Fotomicrografias do tecido hepático, controle negativo (**B**), PZQ (**C**), EHDA (**D**) e EHDA+PZQ (**E**). Cortes histológicos corados com HE (100X). Os valores representam a média  $\pm$  desvio padrão de 6 animais por grupo. (\*)  $p < 0.05$  em comparação ao controle negativo (CN).

A análise histopatológica do intestino (**Tabela 2**), mostrou que a infecção aumentou todos os parâmetros em comparação ao grupo controle limpo. O tratamento com EHDA reduziu a lesão tecidual, necrose e infiltração celular, o tratamento combinado reduziu o número de ovos, o número de granulomas, dano tecidual, necrose e infiltração celular, em comparação ao controle negativo. Comparando os tratamentos EHDA e EHDA+PZQ, foi possível detectar que o tratamento combinado apresentou um número reduzido de ovos e área de granulomas, nenhuma diferença foi observada com outros parâmetros.

**TABELA 2** Análise histopatológica do intestino de camundongos infectados ou não por *S. mansoni*, não tratados ou tratados com EHDA e EHDA+PZQ.

| Parâmetros avaliados          | Grupos |                      |          |                      |                         |
|-------------------------------|--------|----------------------|----------|----------------------|-------------------------|
|                               | CL     | CN                   | PZQ      | EHDA                 | EHDA+PZQ                |
| <b>Quantidade de ovos</b>     | 0      | 3±0 <sup>@</sup>     | 0.3±0.5* | 2.3±0.5 <sup>#</sup> | 1.3±1.0 <sup>*# a</sup> |
| <b>Presença de granulomas</b> | 0      | 3±0 <sup>@</sup>     | 0.3±0.5* | 2.3±0.5 <sup>#</sup> | 1.3±1.0 <sup>*# a</sup> |
| <b>Extensão do granuloma</b>  | 0      | 1.6±0.5 <sup>@</sup> | 0.3±0.5* | 2.3±0.5 <sup>#</sup> | 1.3±1.0 <sup># a</sup>  |
| <b>Lesão tecidual</b>         | 0      | 3±0 <sup>@</sup>     | 1.3±0.5* | 2.0±0*               | 1.3±1.0*                |
| <b>Necrose</b>                | 0      | 1,3±0.5 <sup>@</sup> | 0±0*     | 0±0*                 | 0±0*                    |
| <b>Infiltrado</b>             | 0      | 3±0 <sup>@</sup>     | 1.6±0.5* | 2.0*                 | 1.6±0.5*                |

Os valores representam a média ± desvio padrão de 6 animais por grupo. @ p<0.05 em comparação ao controle limpo (CL); \* p<0.05 em comparação ao controle negativo (CN); #p<0.05 em comparação ao grupo PZQ; <sup>a</sup> p<0.05 em comparação aos EHDA ou EHDA+PZQ.

A histopatologia renal (**Tabela 3**) mostrou que o tratamento com EHDA e EHDA+PZQ reduziu o número de ovos, o número de granulomas, a área de granulomas e a infiltração celular em comparação ao controle negativo. Nenhuma diferença foi identificada entre os tratamentos EHDA e EHDA+PZQ.

**TABELA 3** Análise histopatológica do rim de camundongos infectados ou não por *S. mansoni*, não tratados ou tratados com EHDA e EHDA+PZQ

| Parâmetros avaliados          | Grupos |                       |      |         |          |
|-------------------------------|--------|-----------------------|------|---------|----------|
|                               | CL     | CN                    | PZQ  | EHDA    | EHDA+PZQ |
| <b>Quantidade de ovos</b>     | 0      | 1.3±1.0 <sup>@</sup>  | 0±0* | 0±0*    | 0±0*     |
| <b>Presença de granulomas</b> | 0      | 1.3±1.0 <sup>@</sup>  | 0±0* | 0±0*    | 0±0*     |
| <b>Extensão do granuloma</b>  | 0      | 1.1±.09 <sup>@</sup>  | 0±0* | 0±0*    | 0±0*     |
| <b>Lesão tecidual</b>         | 0      | 1.6±0.5 <sup>@</sup>  | 1±0* | 1.3±0.5 | 1.0±0.8  |
| <b>Necrose</b>                | 0      | 0,33±0.5 <sup>@</sup> | 0±0  | 0±0     | 0±0      |
| <b>Infiltrado</b>             | 0      | 1.6±0.5 <sup>@</sup>  | 1±0* | 1.0±0*  | 1.0±0*   |

Os valores representam a média ± desvio padrão de 6 animais por grupo. @ p<0.05 em comparação ao controle limpo (CL); \* p<0.05 em comparação ao controle negativo (CN); #p<0.05 em comparação ao grupo PZQ; <sup>a</sup> p<0.05 em comparação aos EHDA ou EHDA+PZQ.

3.4 O uso de EHDA ou em associação com Praziquantel (EHDA+PZQ) reduziu parâmetros leucocitários na fase inicial e crônica da infecção por *S. mansoni* em camundongos

A infecção com *S. mansoni* reduziu o número de neutrófilos e aumentou o número de linfócitos e eosinófilos em animais infectados não tratados (grupo CN) quando comparado ao grupo CL no dia 30. O tratamento com EHDA reduziu o número de linfócitos e eosinófilos, enquanto a combinação com Praziquantel (EHDA+PZQ) reduziu apenas o número de eosinófilos em comparação ao CN. Não houve diferença entre os grupos EHDA e EHDA+PZQ (Tabela 4).

Em relação à porcentagem leucométrica no dia 90 (Tabela 5), o CN reduziu a porcentagem de neutrófilos, não apresentou diferença no número de linfócitos e monócitos e aumentou o número de eosinófilos quando comparado ao grupo CL.

O uso de EHDA do dia 0 ao dia 30 pós-infecção reduziu o número de neutrófilos, monócitos e eosinófilos em comparação ao CN. O tratamento com a combinação (EHDA+PZQ) não apresentou diferença no número de neutrófilos. No entanto, aumentou o número de

linfócitos e reduziu o número de monócitos e eosinófilos em comparação ao CN. Em relação aos grupos EHDA e EHDA+PZQ, foi identificado que o tratamento combinado aumentou o número de neutrófilos e linfócitos.

**TABELA 4** Percentual total e diferencial das populações de leucócitos sanguíneos em camundongos infectados por *S. mansoni* e tratados nos primeiros 30 dias com EHDA ou em associação (EHDA+PZQ).

| Percentual (%)     | Grupos    |            |           |             |            |
|--------------------|-----------|------------|-----------|-------------|------------|
|                    | CL        | CN         | PZQ       | EHDA        | EHDA + PZQ |
| <b>Leucócitos</b>  | 100       | 100        | 100       | 100         | 100        |
| <b>Neutrófilos</b> | 25,8 ±4,4 | 7,6 ±5,1@  | 11.0 ±1.8 | 6,3 ±7,1    | 12,4 ±1,6  |
| <b>Linfócitos</b>  | 60,0 ±5,6 | 74,2 ±3,9@ | 68.0 ±3.9 | 38,5 ±40,1* | 75,2 ±3,8  |
| <b>Monócitos</b>   | 9,6 ±1,8  | 6,6 ±2,7   | 7.2 ±1.4  | 3,5 ±4,4    | 6,2 ±2,7   |
| <b>Eosinófilos</b> | 4,8 ±1,7  | 11,6 ±2,6@ | 9.8 ±0.8@ | 3,6 ±4,2*#  | 4,6 ±1,1*# |

Os valores representam a média ± desvio padrão de 6 animais por grupo. @ p<0.05 em comparação ao controle limpo (CL); \* p<0.05 em comparação ao controle negativo (CN); #p<0.05 em comparação ao grupo controle positivo (PZQ).

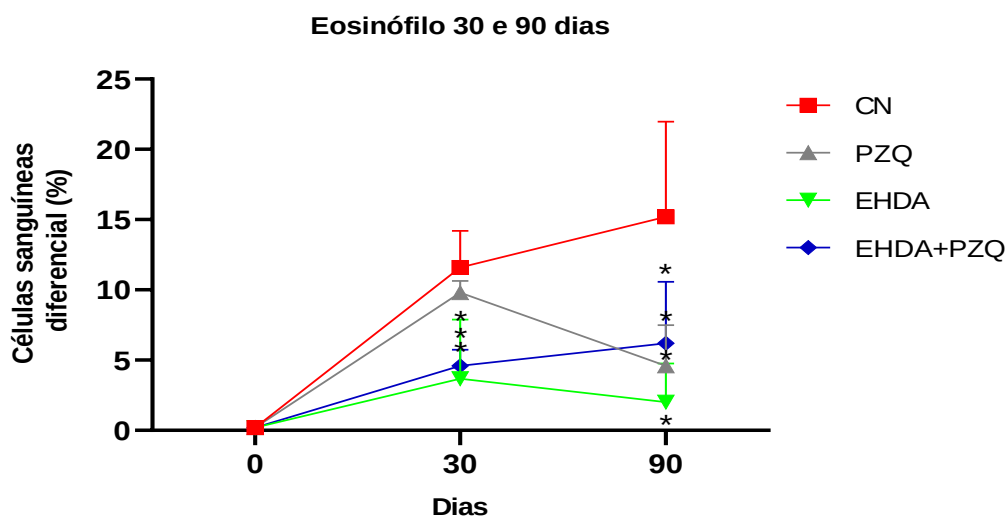
**TABELA 5** Percentual total e diferencial das populações de leucócitos sanguíneos aos 90 dias após tratamento com EHDA ou em associação (EHDA+PZQ) em camundongos infectados por *S. mansoni*.

| Percentual (%)     | Grupos    |            |            |                         |                         |
|--------------------|-----------|------------|------------|-------------------------|-------------------------|
|                    | CL        | CN         | PZQ        | EHDA                    | EHDA+ PZQ               |
| <b>Leucócitos</b>  | 100       | 100        | 100        | 100                     | 100                     |
| <b>Neutrófilos</b> | 30,6 ±5,4 | 14,4 ±2,9@ | 12,4 ±6,0  | 5,8 ±7,2*               | 15,6 ±6,0 <sup>a</sup>  |
| <b>Linfócitos</b>  | 58,2 ±2,5 | 60,6 ±4,2  | 75,2 ±7,4* | 28,4 ±38,9 <sup>#</sup> | 71,8 ±7,5* <sup>a</sup> |
| <b>Monócitos</b>   | 11,8 ±0,8 | 10,2 ±1,6  | 6 ±3,4*    | 3,6 ±5,1*               | 3,6 ±1,3*               |
| <b>Eosinófilos</b> | 0,2±0,4   | 15,2 ±6,7@ | 4,6 ±2,8*  | 2,0 ±2,7*               | 6,2 ±4,3*               |

Os valores representam a média ± desvio padrão de 6 animais por grupo. @ p<0.05 em comparação ao controle limpo (CL); \* p<0.05 em comparação ao controle negativo (CN); #p<0.05 em comparação ao grupo controle positivo (PZQ); <sup>a</sup> p<0.05 em comparação aos grupos EHDA e EHDA+PZQ.

3.5 O uso de EHDA ou em associação com Praziquantel (EHDA+PZQ) reduziu a eosinofilia sanguínea em camundongos infectados por *S. mansoni*

Avaliando especificamente a população de eosinófilos (Figura 6), identificamos variações entre os grupos nos intervalos de 30 e 90 dias. Os controles CN e PZQ antes do tratamento, aumentaram o número de eosinófilos no intervalo de 30 dias em comparação aos grupos tratados com EHDA e EHDA+PZQ. No intervalo de 90 dias (pós-tratamento) o controle PZQ reduziu o número de eosinófilos em relação ao grupo CN, assim como os grupos tratados com EHDA e EHDA+PZQ.



**FIGURA 6**

Variação do número de eosinófilos 30 e 90 dias. Os valores representam a média  $\pm$  desvio padrão de 6 animais por grupo  $p < 0.05$ .

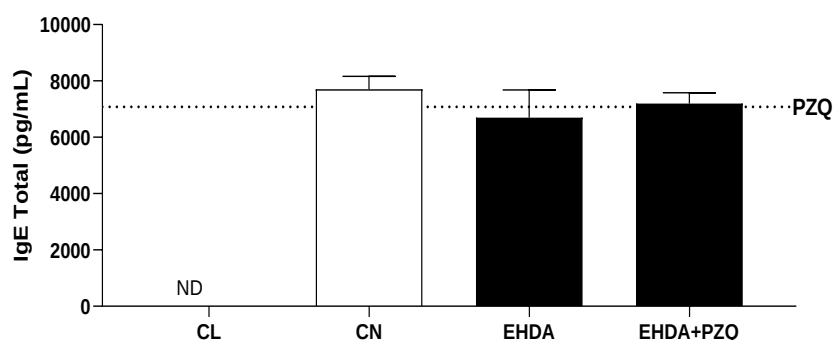
3.6 Efeito do EHDA ou de sua associação com PZQ sobre a concentração sérica de citocinas no soro

A citocinas IL-10 apresentou aumento no grupo CN em comparação ao grupo CL. Com relação aos grupos tratados, todos apresentaram redução em comparação ao grupo CN. A citocina IL-17 apresentou aumento no grupo CN em relação ao grupo CL. Com relação aos grupos tratados não houve diferença em relação ao grupo CN. A citocina TNF- $\alpha$  não foi detectada no soro em nenhum dos grupos avaliados. Gráficos não apresentados.



### 3.7 O EHDA e sua associação com PZQ (EHDA+PZQ) não alterou os níveis de IgE total no soro

A concentração de IgE foi aumentada em CN, PZQ, EHDA e EHDA+PZQ em comparação ao controle limpo (Figura 7). No entanto, não houve diferença entre os grupos tratados em comparação aos animais infectados não tratados.



**FIGURA 7**

Concentrações séricas de IgE total de camundongos limpos e infectados por *S. mansoni*, ausente de tratamento ou tratados com EHDA ou em associação (EHDA+PZQ). Ao final de 90 o soro foi obtido para análise dos níveis IgE total. Os valores representam a média  $\pm$  desvio padrão de 6 animais por grupo  $p < 0.05$ .

### 3.8 O uso de EHDA ou em associação com Praziquantel na fase inicial da infecção por *S. mansoni* em camundongos reduziu a celularidade da medula óssea e do lavado peritoneal na fase crônica

O uso de EHDA ou da associação EHDA+PZQ reduziu o número de células na medula óssea em comparação ao grupo CN, mantendo valores próximos aos observados nos animais do grupo PZQ e mesmo no grupo sem infecção (CL) (Tabela 6).

Com relação à contagem total e diferencial de células peritoneais, o grupo PZQ apresentou redução no número de leucócitos, macrófagos, neutrófilos, eosinófilos e mastócitos, sem alterar a população de linfócitos em comparação ao grupo CN. O tratamento com EHDA ou em associação com PZQ reduziu o número total de células peritoneais, bem como o número de macrófagos, neutrófilos, eosinófilos quando comparado aos animais do grupo CN. Não foram observadas alterações nas contagens de linfócitos. O tratamento com EHDA ou em associação (EHDA+PZQ) não apresentaram diferença entre si (Tabela 7).

**TABELA 6** Contagem global de leucócitos da medula óssea e baço de camundongos após tratamento com EHDA ou em associação (EHDA+PZQ)

| Órgãos                                        | Grupos   |            |               |              |           |
|-----------------------------------------------|----------|------------|---------------|--------------|-----------|
|                                               | CL       | CN         | PZQ           | EHDA         | EHDA+PZQ  |
| <b>Medula óssea</b><br>(x10 <sup>6</sup> /mL) | 1,1 ±0,2 | 15,2 ±8,0@ | 0,66±0,6<br>* | 1,2<br>±1,4* | 1,0 ±1,2* |

Os valores representam a média ± desvio padrão de 6 animais por grupo. @ p<0.05 em comparação ao controle limpo (CL); \* p<0.05 em comparação ao controle negativo (CN).

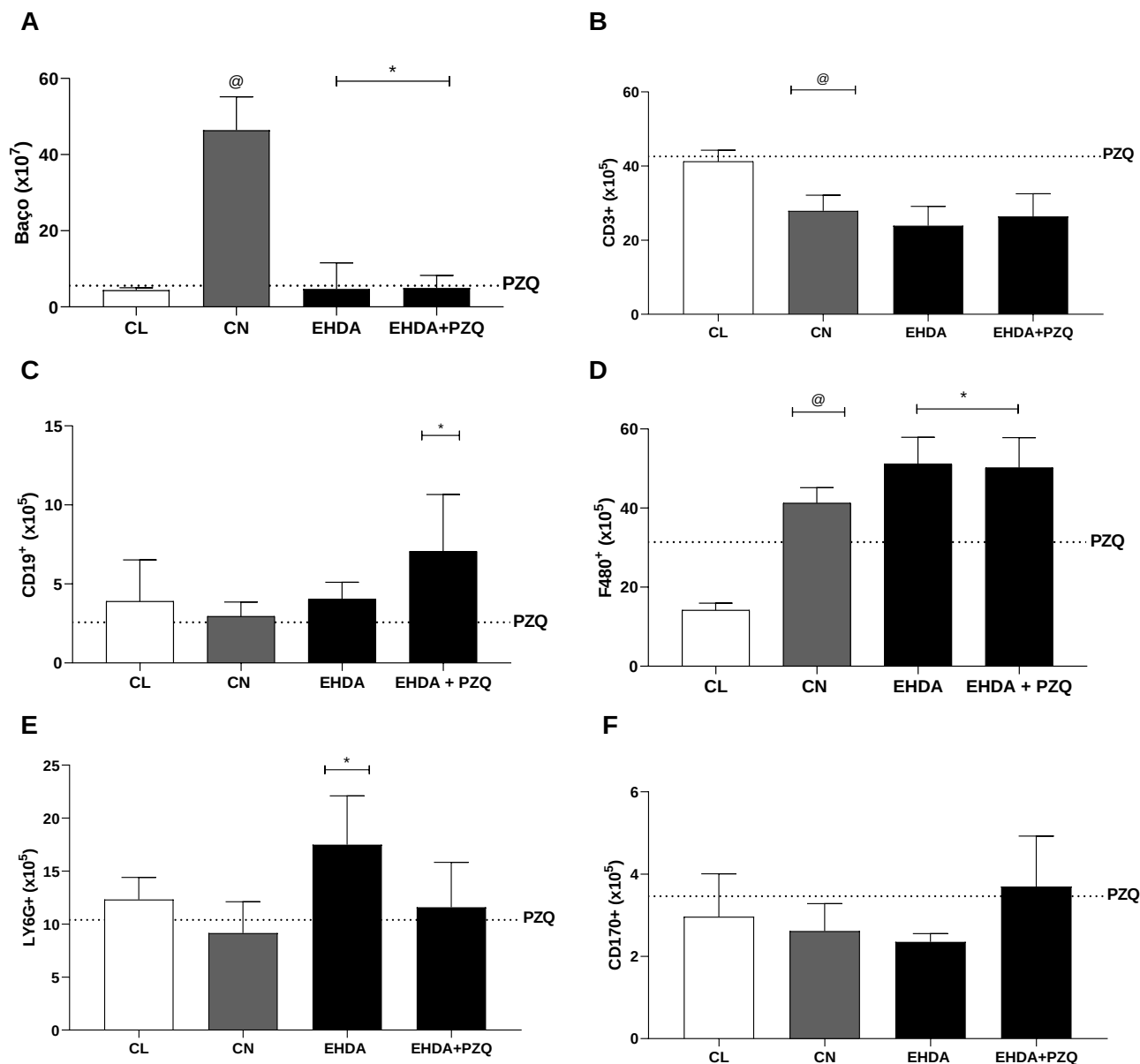
**TABELA 7** Contagem global e diferencial de leucócitos da cavidade peritoneal de camundongos após tratamento com EHDA ou em associação (EHDA+PZQ)

| Célula<br>(x10 <sup>3</sup> / mm <sup>3</sup> ) | Grupos     |            |             |            |             |
|-------------------------------------------------|------------|------------|-------------|------------|-------------|
|                                                 | CL         | CN         | PZQ         | EHDA       | EHDA+PZQ    |
| <b>Leucócitos</b>                               | 2,8 ±0,2   | 20,3 ±4,6@ | 5,0 ±0,5*   | 4,7 ±6,8*  | 4,9 ±3,2*   |
| <b>Macrófagos</b>                               | 2,1 ±0,6   | 12,8 ±4,7@ | 3,1 ± 0,8*  | 2,3 ±2,7*  | 1,9 ±1,9*   |
| <b>Neutrófilos</b>                              | 0,08 ±0,06 | 3,2 ±1,1@  | 0,6 ± 0,2*  | 0,5 ±0,8*  | 0,3 ±0,2*   |
| <b>Linfócitos</b>                               | 0,04 ±0,04 | 0,11 ±0,1  | 0,08 ±0,08  | 1,7 ±2,8   | 0,18 ±0,2   |
| <b>Eosinófilos</b>                              | 0,0 ±0,0   | 1,4 ± 0,6@ | 0,3 ± 0,04* | 0,2 ±0,3*  | 0,08 ±0,04* |
| <b>Mastócitos</b>                               | 0,02±0,02  | 0,5 ±0,3@  | 0,7 ± 0,4   | 0,1 ±0,2*# | 0,2 ±0,2*#  |

Os valores representam a média ± desvio padrão de 6 animais por grupo. @ p<0.05 em comparação ao controle limpo (CL0; \* p<0.05 em comparação ao controle negativo (CN); #p<0.05 em comparação ao grupo controle positivo (PZQ).

### 3.9. Os efeitos de EHDA e EHDA+PZQ são variáveis nas células esplênicas de acordo com as subpopulações

Os grupos tratados com EHDA e EHDA+PZQ apresentaram celularidade reduzida em comparação ao CN. Os grupos EHDA e EHDA+PZQ mantiveram celularidade semelhante. O tratamento com EHDA e EHDA+PZQ não alterou o número de linfócitos em comparação ao grupo CN (**Figura 8B**), mas o tratamento combinado aumentou o número de linfócitos B em comparação aos outros grupos (**Figura 8C**). Os tratamentos com EHDA e EHDA+PZQ aumentaram o número de macrófagos em comparação ao grupo CN (**Figura 8D**), embora nenhuma diferença tenha sido observada em relação a esses dois grupos tratados. O tratamento com PZQ reduziu o número de macrófagos em comparação ao grupo CN (**Figura 8D**). O tratamento com EHDA aumentou os neutrófilos em comparação ao CN, mas não houve diferença entre EHDA e EHDA+PZQ (**Figura 8E**). O número de eosinófilos foi semelhante considerando os animais infectados (**Figura 8F**).



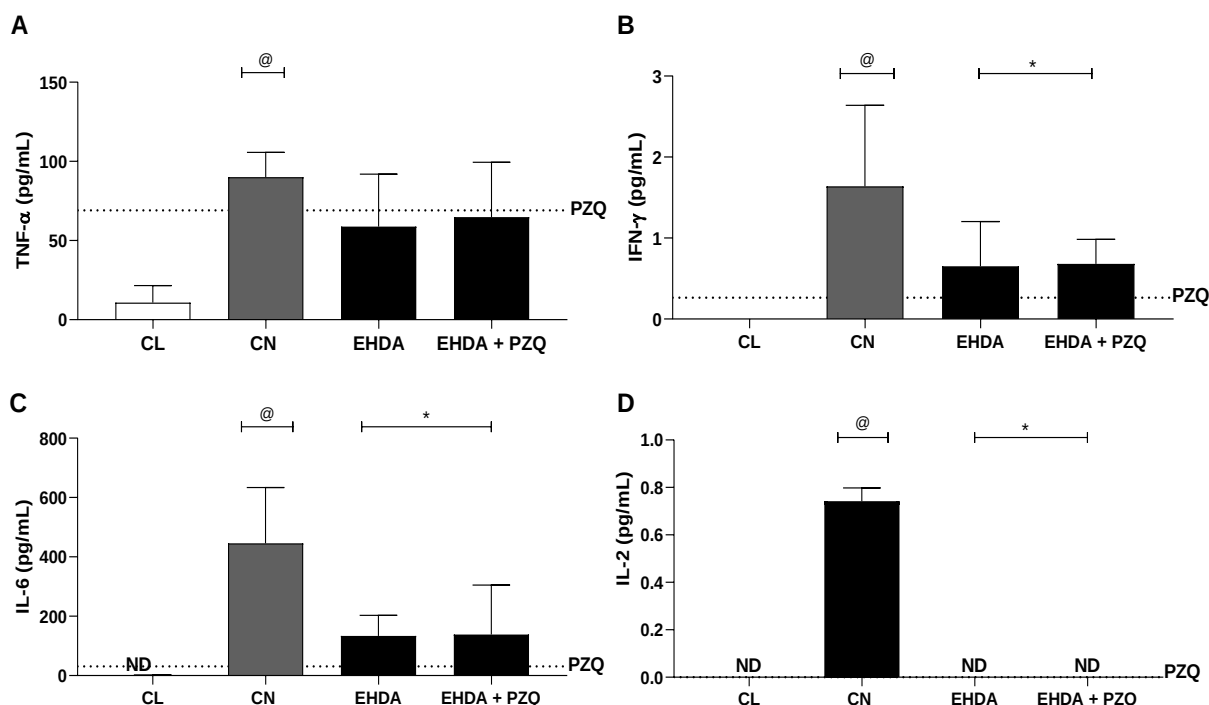
**FIGURA 8**

Cellularidade e caracterização fenotípica do baço de camundongos infectados ou não por *S. mansoni* não tratados ou tratados com EHDA ou EHDA+PZQ. Celularidade total (A) e caracterização fenotípica dos linfócitos T (B), linfócitos B (C), macrófagos (D), neutrófilos (E) e eosinófilos (F). As células do baço foram obtidas após eutanásia aos 90º dia. Os esplenócitos foram marcados com anticorpos específicos para caracterização de cada subtipo celular. Os valores representam a média  $\pm$  desvio padrão de 6 animais por grupo. (@)  $p < 0.05$  em comparação ao controle limpo (CL). (\*)  $p < 0.05$  em comparação ao controle negativo (CN).

### 3.10 Efeito do EHDA e de sua associação com Praziquantel (EHDA+PZQ) sobre citocinas em sobrenadante da cultura de células do baço

A infecção aumentou a concentração de TNF- $\alpha$  (Figura 9A) em comparação ao grupo CL, não havendo diferença quando comparado aos grupos EHDA e EHDA+PZQ.

A concentração de IFN- $\gamma$  (Figura 9B) foi aumentada no grupo CN em comparação ao grupo CL. Em contraste, os grupos tratados com EHDA e EHDA+PZQ apresentaram um nível reduzido de IFN- $\gamma$  em comparação ao grupo CN. Não houve diferença entre os grupos EHDA e EHDA+PZQ. Um resultado semelhante foi detectado em relação aos níveis séricos de IL-6 (Figura 9C). Houve um aumento nos níveis de IL-2 no grupo CN (Figura 9D).

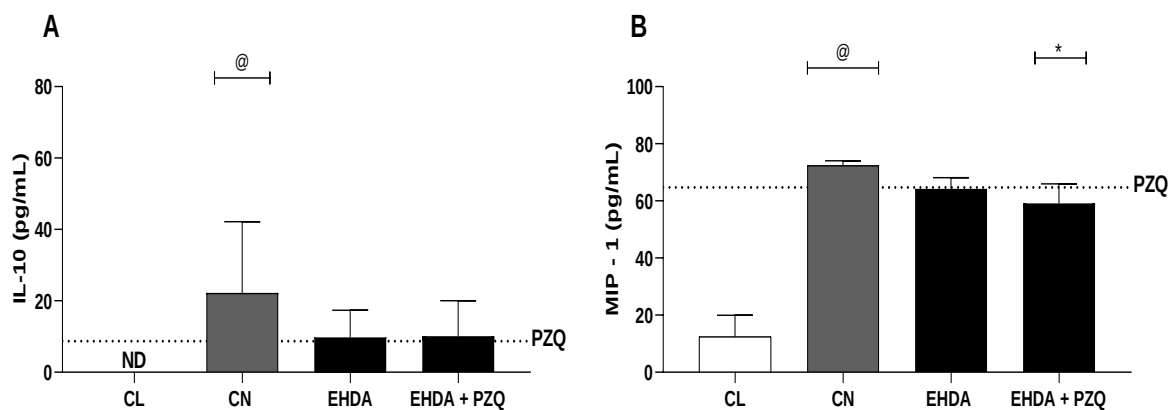


**FIGURA 9**

Efeito do uso de EHDA e da associação com Praziquantel (EHDA + PZQ) sobre as concentrações séricas de citocinas pró-inflamatórias em sobrenadante de cultura de células do baço. NF- $\alpha$  (A), IFN- $\gamma$  (B), IL-6 (C) e IL-2 (D). Valores representam a média  $\pm$  desvio padrão de 6 animais por grupo. @  $p < 0.05$  em comparação ao controle limpo (CL); \*  $p < 0.05$  em comparação ao controle negativo (CN).

A IL-10 apresentou níveis elevados no grupo CN em comparação ao grupo CL, sem nenhuma diferença em relação aos outros grupos (Figura 10A). Nenhuma diferença foi identificada entre os grupos EHDA e EHDA+PZQ. A IL-4 foi detectada apenas no CN. A IL-17 foi detectada apenas no grupo PZQ, dados não mostrados. As concentrações da quimiocina

MIP-1 foram avaliadas (Figura 10B); um aumento foi identificado no grupo CN em comparação ao grupo CL. O grupo tratado em combinação (EHDA+PZQ) mostrou uma redução em relação ao grupo CN. Não houve diferença entre os grupos EHDA e EHDA+PZQ.



**FIGURA 10**

Efeito do EHDA e da associação com PZQ (EHDA + PZQ) sobre as concentrações séricas de citocinas regulatórias no baço. IL-10 (A) e quimiona MIP-1 (B). Os valores representam a média  $\pm$  desvio padrão de 6 animais por grupo. @  $p < 0.05$  em comparação ao controle limpo (CL); \*  $p < 0.05$  em comparação ao controle negativo (CN).

#### 4 Discussão

Os resultados apresentados no presente estudo, mostraram que o uso de EHDA e sua associação com Praziquantel (EHDA+PZQ) apresentaram efeito antiparasitário e imunomodulador na fase inicial da infecção por *S. mansoni*, reduzindo o dano inflamatório na fase crônica da infecção.

Em modelos experimentais *in vivo* avaliando toxicidade subaguda e subcrônica, estudos já relataram que o uso oral de *D. ambrosioides* é seguro, uma vez que o extrato possui baixa toxicidade, foi demonstrado também que doses de 5, 50 e 500 mg/kg de extrato de folhas de *D. ambrosioides* durante o uso por 15 dias, via oral, não causaram letalidade aos animais nem foram tóxicas para os animais experimentais. Os autores identificaram que todas as doses aumentaram a celularidade na medula óssea. As doses de 50 e 500 mg/kg aumentaram o número de células no linfonodo, e todas as doses reduziram a celularidade do peritônio em comparação ao controle. Dados bioquímicos demonstraram que a concentração de 500 mg/kg reduziu os níveis de albumina; e as duas doses mais altas reduziram as concentrações de triglicerídeos e VLDL, sem alteração da AST em nenhum grupo (25). Outros autores mostraram a baixa toxicidade para doses entre 5 a 50 mg/kg usando o extrato das flores de *D. ambrosioides* após

tratamento oral durante 15 dias. Neste caso, apenas a dose mais alta (500 mg/kg) causou baixa ou moderada toxicidade ao fígado e rim, sem qualquer efeito no coração (38). Da mesma forma, o uso de PZQ em modelos experimentais com animais já apresentou baixa toxicidade (39, 40).

Sabendo-se que o a *D. ambrosioides* e o PZQ não apresentam efeitos tóxicos em concentrações adequadas, avaliamos dessa forma o efeito do extrato isolado ou em associação ao fármaco PZQ na infecção por *S. mansoni*.

Os dados do estudo demonstram que o uso de EHDA e a combinação de EHDA com PZQ diminuiu o número de ovos nas fezes na fase inicial da infecção, sendo detectado a presença de ovos a partir do 50º dia pós-infecção, demonstrando que ambos tratamentos diminuíram o aparecimento de ovos nas fezes. O opg de ambos os grupos se manteve inferior a 500 ovos por grama de fezes durante a fase crônica (90 dias) da infecção. Nosso achado do tratamento com EHDA, corrobora ao descrito por (22), que demonstram que o tratamento com *D. ambrosioides* em diferentes fases da infecção por *S. mansoni* reduziu o número de ovos nas fezes, com opg em torno de 200 ao final de 60 dias.

Nosso achado sugere que, o efeito do EHDA e da associação (EHDA+PZQ) na redução do número de ovos nas fezes possa estar associado a redução de parasitos juvenis na fase inicial da infecção, ocasionando dessa forma, a redução de vermes adultos. Além disso, sugerimos que este efeito possa estar associado principalmente a atividade biológica da *D. ambrosioides*, uma vez que, o resultado do EHDA isolado foi semelhante a combinação do EHDA+PZQ, sugerindo que, não houve efeito sinérgico satisfatório entre EHDA e PZQ em potencializar o efeito antiparasitário para eliminar o parasito.

É descrito na literatua que a *D. ambrosioides* apresentou efeito dose-dependente *in vitro* sobre cercarias e vermes adultos, com morte de todas as cercarias após 180min e de vermes adultos em 24 horas (22). *In vivo*, foi descrito que o o tratamento com *D. ambrosioides* na dose de 1.250mg/Kg em camundongos infectados por *S. mansoni* reduziu em 53,7% o número de vermes (41). Além disso, foi evidenciado que o óleo essencial de *D. ambrosioides* nas concentrações de 25 e 12,5 µg/ml apresentou efetividade na letalidade de 100% em pares de vermes adultos de *S. mansoni* em 24 e 72 h, respectivamente (42).

Em relação ao Praziquantel, (43), evidenciaram que as fêmeas são significativamente mais resistentes à incubação com PZQ do que vermes machos. Após a incubação com Praziquantel, vermes machos exibiram, além das degenerações tegumentar e subtegumentar, o encolhimento muscular com vacuolização generalizada. Estudos *in vivo* em camundongos

demonstraram que vermes sobreviventes ao tratamento com Praziquantel, exibem redução na oviposição (44).

Em nosso estudo, ao avaliarmos o efeito da associação entre o extrato de *D. ambrosioides* e o fármaco PZQ, evidenciamos que a associação não foi capaz de eliminar o parasito durante a fase inicial da infecção, mas reduziu o número de ovos nas fezes. Estudos tem investigado mecanismos de potencializar a efetividade do fármaco Praziquantel, uma dessas linhas de investigações está baseada em avaliar o efeito sinérgico entre o PZQ e outros fármacos ou com produtos naturais.

É descrito na literatura que o efeito sinérgico *in vitro* do praziquantel com piplartina e praziquantel com epiisopiloturina apresentaram atividade anti-helmíntica contra vermes adultos de *S. mansoni*, com forte efeito sinérgico entre as combinações de praziquantel (1,98  $\mu$ M) com piplartina (0,63  $\mu$ M) com efeito esquistossomótico eficaz apresentando um IC 0,42  $\mu$ M (45). O efeito do PZQ associado também foi descrito no estudo de (46), que demonstram que a própolis isolada e sua associação com praziquantel não foi capaz de eliminar o parasito, entretanto, apresentou resultados positivos, promovendo nas alterações histológicas e bioquímicas.

No decorrer da oviposição, cerca de 60% dos ovos alcançam a luz intestinal e o restante fica retido nos capilares da mucosa do intestino, ocasionando a morte do miracídio. Alguns ovos permanecem retidos nesse local, ao passo que outros vão sendo carreados pela circulação mesentérica até o fígado, onde esbarram nos sinusóides hepáticos (47). A diminuição ou inibição da oviposição gera grande interesse, visto que uma das características da esquistossomose é a formação do granuloma em diversos órgãos. A diminuição no número de ovos pode levar a uma diminuição na morbidade desta doença, uma vez que, a resposta inflamatória aumenta devido às reações granulomatosas. Os granulomas hepáticos são formados quando os ovos ficam presos no sistema porta do fígado, enquanto os granulomas intestinais têm papel central em auxiliar no transporte de ovos do parasito da vasculatura mesentérica para o lúmen intestinal (48).

Quando avaliado o número de ovos retidos no fígado e intestino, os grupos EHDA e EHDA+PZQ apresentam redução em comparação ao controle negativo, mas sem diferença entre si. Foi evidenciado que, o tratamento com *D. ambrosioides* em diferentes fases do desenvolvimento na infecção por *S. mansoni* em camundongos, ocasionou redução no número de ovos no fígado. Estes achados em conjunto, demostram o efeito positivo da *D. ambrosioides*



em reduzir a carga parasitaria de ovos nas fezes, fígado e intestino frente a infecção por *S. mansoni* (22).

É descrito na literatura que alguns produtos avaliados como esquistossomicida apresentaram o potencial de reduzir ou não o número de ovos no fígado e intestino. Foi demonstrado que a Carboximetilcelulose e silimarina, não ocasionaram a redução de ovos retidos no fígado e intestino na esquistossomose experimental (49). A espécie vegetal *Ceratonia siliqua* na dose de 300 e 600 mg/kg em modelo esquistossomótico *in vivo*, reduziu no número de ovos no fígado em 50 e 72,8% respectivamente (50).

Ao avaliarmos se o EHDA e EHDA+PZQ em animas infectados por *S. mansoni* conferiu proteção tecidual, evidenciamos no grupo EHDA reduziu os danos no fígado, tais como: quantidade de ovos, extensão do granuloma, fibrose, necrose e congestão vascular. No intestino, houve redução do grau de lesão tecidual, necrose e infiltrado. No rim, houve redução da quantidade de ovos, presença de granuloma, extensão de granuloma, necrose e infiltrado inflamatório.

Nosso achado do fígado corrobora ao descrito por (22), que demonstraram que o tratamento com *D. ambrosioides* durante 7 dias nas fases de esquistossômulo cutâneo, esquistossômulo pulmonar e vermes jovens, reduziu parâmetros teciduais no fígado como: infiltrado inflamatório, lesão tecidual, presença de granulomas e congestão vascular. Durante o tratamento da fase de vermes adultos e durante a oviposição, identificou-se redução somente do grau de congestão vascular. Este efeito protetor da *D. ambrosioides* nestes órgãos pode estar associado ao efeito da quercetina como demonstrado por (51), onde identificaram que a quercetina reduziu a oxidação, inflamação e preveniu a fibrose hepática. (52), relataram o efeito protetor da quercetina na hepatotoxicidade e nefrotoxicidade induzidas pelo sulfato ferroso.

O uso da associação entre EHDA e PZQ, reduziu no fígado a quantidade de ovos, presença de granulomas, extensão de granulomas, fibrose e lesão tecidual. No intestino, reduziu a quantidade de ovos, presença de granulomas, lesão tecidual, necrose e infiltrado inflamatório. No rim, reduziu a quantidade de ovos, presença de granuloma, extensão de granuloma, lesão tecidual, necrose e infiltrado inflamatório. Dados comparativos ao controle negativo. Esses dados demonstram que o tratamento em associação apresentou mecanimo de ação anti-inflamatório, promovendo a redução dos danos teciduais.

Ao verificarmos quais dos dois tratamentos reduziu mais danos teciduais, a associação se mostrou mais eficaz, reduzindo os danos fibróticos no fígado, assim como reduziu a

quantidade de ovos, presença e extensão dos granulomas no intestino, não sendo vista alterações entre os grupos no rim. Tendo em vista a redução dos danos fibroticos, nossos achados sugerem melhor efeito na proteção tecidual do fígado.

No fígado, ao analisarmos a histomorfometria dos granulomas, identificamos que o grupo EHDA e EHDA+PZQ reduziram o número e área de granulomas em relação ao grupo CN. Não havendo diferença entre os granulomas entre os grupos HEDA e EHDA+PZQ. (22), identificaram que o tratamento com *D. ambrosioides* nas fases de esquistossômulo cutâneo, esquistossômulo pulmonar e vermes jovens reduziu o número e área de granulomas no fígado, entretanto não foi observada redução do número de ovos no tratamento na fase de vermes adultos durante a oviposição, mas identificado a redução da área do granuloma.

Com relação a análise das fotomicrografias, os grupos tratados com EHDA e EHDA+PZQ apresentavam melhor organização dos hepatócitos, assim como, apresentavam distinção entre os granulomas do controle negativo. Sugerindo que, a alteração destes granulomas esteja associada a redução de danos fibróticos.

Em relação a imunopatologia do *S. mansoni* durante e após a uso do EHDA e EHDA+PZQ, foi identificado no intervalo do 30º dia, correspondente a uma fase aguda da infecção, que o EHDA reduziu o número de linfócitos e eosinófilos, enquanto a associação (EHDA+PZQ) reduziu eosinófilos. Aos 90 dias, correspondente a uma fase crônica da infecção, observou-se que o EHDA reduziu neutrófilos, monócitos e eosinófilos, a associação (EHDA+PZQ) não alterou neutrófilos, aumentou o número de linfócitos e reduziu monócitos e eosinófilos. Por outro lado, o controle negativo manteve o número de eosinófilos aumentado nas duas análises

A infecção por *S. mansoni* é caracterizada por induzir uma forte resposta Th2 com alta produção de IL-4 e IL-13, síntese de IgE e eosinofilia (53). Representando menos de 5% dos leucócitos sanguíneos em animais saudáveis, os eosinófilos de tecido e sangue aumentam expressivamente durante infecções parasitárias, com isso, o número de eosinófilos do sangue periférico é aumentado sob a influência de IL-5, IL-3 e GM-CSF derivadas de células da resposta imunológica Th2, o recrutamento dessa população celular da circulação para tecidos inflamados ou danificados ocorre pela quimiocina seletiva de eosinófilos, eotaxina (54). Em modelo de infecção humana controlada por vermes machos de *S. mansoni* para o desenvolvimento de fármacos e diagnóstico, identificaram que o número de eosinófilos aumentou em 11 de 17 (65%) voluntários com pico entre as semanas 2 e 8 após a infecção (55).

Em conjunto, nossos resultados demonstram que os grupos tratados com EHDA e EHDA+PZQ mantiveram a redução da eosinofilia sanguínea. Este resultado corrobora com o descrito por (22), que ao avaliar o extrato de *D. ambrosioides* durante o tratamento por fases na infecção por *S. mansoni*, identificou redução de eosinófilos em todos os grupos ao final de 60 dias. Essa redução de eosinófilos identificada em nosso estudo, pode estar associada a redução da carga parasitária.

Os nossos achados leucocitários sugerem que o EHDA e EHDA+PZQ apresentaram efeito imunomodulador e anti-inflamatório durante a fase inicial da infecção, sugerindo que, essa resposta imunológica positiva no hospedeiro vertebrado na fase inicial da infecção, possivelmente tenha ocasionado a morte de parasitos ou possa ter ocasionado danos ao aparelho reprodutor de alguns vermes, fatores sugestivos que podem estar associados aos achados descritos como: redução de ovos nas fezes, redução de ovos retidos no fígado e intestino, redução no número e extensão dos granulomas e redução de danos teciduais. Vale destacar que, o perfil imunomodulador da espécie *D. ambrosioides* já foi relatado por (20, 21, 22). Além disso, estudos já demonstraram o potencial efeito anti-inflamatório da espécie *D. ambrosioides* (56,57).

Ao avaliarmos os níveis de citocinas no soro aos 90º dias, evidenciou-se que os grupos EHDA e EHDA+PZQ apresentavam redução dos níveis de IL-10, a IL-17 não apresentou diferença e os níveis de TNF- $\alpha$  foram indetectáveis em todos os grupos, dados em comparação ao controle negativo. Em relação a expressão de IgE Total, todos os grupos infectados, tratados ou não apresentaram níveis aumentados.

Ao se analisar a celularidade da medula óssea e cavidade peritoneal, os grupos EHDA e EHDA+PZQ mantiveram regulada a celularidade, com dados semelhantes ao controle limpo. O controle negativo encontrava-se com a celularidade aumentada nas respectivas análises. Dados do baço mostram que ambos os grupos tratados apresentaram efeito em regular o número total de esplenócitos. Ao se avaliar a especificidade das células, o grupo EHDA imunoestimulou macrófagos e neutrófilos e o grupo EHDA+PZQ imunoestimulou linfócitos B e macrófagos.

Foi descrito que o baço de camundongos tratados com *D. ambrosioides* durante as fases do desenvolvimento da infecção por *S. mansoni*, que o tratamento aumentou o número total de esplenócitos durante a fase de vermes jovens em comparação ao controle negativo. Durante a fase pulmonar e de vermes jovens, houve aumento no número de linfócitos B. O tratamento não alterou em nenhuma das fases o número de macrófagos, entretanto, na fase de vermes jovens

aumentou o número de linfócitos T, tanto a população de linfócitos T helper e linfócitos T citotóxicos. Em conjunto, esses dados sugerem que a *D. ambrosioides* imunomodula a resposta imunológica a favor do hospedeiro vertebrado durante as fases iniciais e mantém o efeito sobre as populações celulares durante a fase crônica da infecção por *S. mansoni* (22).

Estudos tem demonstrado o potencial da *D. ambrosioides* como imunoestimulante celular. Este efeito foi relatado no estudo de (25), onde demonstraram que o extrato das folhas de *D. ambrosioides* na toxicidade subcrônica induziu aumento da celularidade da medula óssea e linfonodo. Efeito descrito também por (21), na qual os autores sugerem que este feito pode ser decorrente da ativação da população de macrófagos e do recrutamento de células pelos órgãos linfoides secundários, como baço e linfonodos.

Com relação expressão de citocinas no sobrenadante da cultura de baço, o grupo EHDA manteve os níveis de TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-10 e IL-17 semelhante ao controle negativo e reduziu IL-6 e IL-4. O grupo EHDA+PZQ manteve os níveis de TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-6, IL-10 e IL-17 semelhante ao controle negativo e reduziu IL-2, IL-4 e a quimiocina MIP-1. No estudo de (22), os autores identificaram que as citocinas IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-4 reduziram durante o tratamento em todas as fases da infecção por *S. mansoni*. A citocina IL-17 reduziu durante o tratamento nas fases cutânea, vermes imaturos e vermes adultos. A IL-10 apresentou aumento durante o tratamento na fase pulmonar e vermes adultos, o que segundo os autores sugerem, que o efeito anti-inflamatório da IL-10 na fase aguda modulou positivamente a resposta inflamatória granulomatosa na fase crônica da infecção reduzindo os danos no tecido hepático.

Diante dos resultados expostos, concluímos que, o uso do EHDA isolado ou em associação com Praziquantel apresentou efeito antiesquistossomótico associado aos efeitos imunomodulador e anti-inflamatório. Os resultados sugerem o efeito do extrato desde a fase inicial do tratamento, correspondente a fase aguda da infecção, ocasionando a redução de ovos nas fezes, assim como, a redução de ovos retidos no fígado e intestino, regulação da eosinofilia sanguínea, redução dos danos teciduais, inflamação granulomatosa em diversos órgãos e regulação de mediadores inflamatórios. Este estudo está entre os pioneiros em demonstrar cientificamente o efeito do uso prolongado do mastruz sobre o desenvolvimento de uma infecção parasitária, assim como de sua associação a um fármaco. Dessa forma, nosso estudo promove perspectivas futuras para novas investigações do seu potencial efeito terapêutico sobre as infecções parasitárias.

### **Contribuições do autor**

**dos Santos V. A. F., Guerra R. N. M., Nascimento F.R.F.:** Desenho experimental, análise estatística, preparação do manuscrito.

**dos Santos V. A. F., Licá I. C. L.:** Análise estatística.

**Rodrigues J.G.M., Nascimento F.R.F., Miranda S, G.:** Preparo do extrato, caracterização química, publicação científica da composição química e fornecimento do extrato.

**dos Santos V. A. F., Guimarães S.J.A., Licá I. C. L., Frazão, G. C. C. G.:** Avaliação e análises citométricas.

**dos Santos V. A. F., Guimarães S.J.A., Licá I. C. L., Frazão, G. C. C. G., Nogueira, R. A., Lira, M. G. S.:** Quantificação de IgE e citocinas.

**Silva L.A., dos Santos V. A. F.:** Análises histopatológicas e morfométricas do tecido hepático.

### **Financiamento**

Os autores gostariam de agradecer às agências de fomento brasileiras FAPEMA (Fundação de Amparo à Pesquisa e ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Maranhão) pelo apoio financeiro; CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento da Pesquisa) pela bolsa de pesquisador e CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pelo apoio financeiro (código de financiamento: 001) e bolsa de estudante.

### **Agradecimentos**

Todas as figuras interativas foram criadas usando Bio render.

### **Conflito de interesses**

Os autores desta pesquisa declaram que, a pesquisa foi conduzida na ausência de quaisquer relações comerciais ou financeiras que que pudessem ser interpretadas como um potencial conflito de interesses.

### **References**

1. Colley DG, Bustinduy AL, Secor WE, King CH. Human schistosomiasis. Lancet. (2014) 28;383(9936):2253-64. doi: 10.1016/S0140-6736(13)61949-2

2. World Health Organization (2020) Status of Schistosomiasis Endemic Countries: 2018. Available at [https://apps.who.int/neglected\\_diseases/ntddata/sch/sch.html](https://apps.who.int/neglected_diseases/ntddata/sch/sch.html). Accessed 24 May 2022.
3. Wei Y, Huang N, Chen S, Chen D, Li X, Xu J, Yang Z. The diagnosis and treatment introspection of the first imported case of atypical cerebral schistosomiasis in Guangzhou city. *PLoS Negl Trop Dis*. (2018) 15;12(3):e0006171. doi: 10.1371/journal.pntd.0006171
4. Bajiro M, Dana D, Levecke B. Prevalence and intensity of *Schistosoma mansoni* infections among schoolchildren attending primary schools in an urban setting in Southwest, Ethiopia. *BMC Res Notes*. (2017) 4;10(1):677. doi: 10.1186/s13104-017-3023-9
5. Verjee MA. Schistosomiasis: Still a Cause of Significant Morbidity and Mortality. *Res Rep Trop Med*. (2019) 31;10:153-163. doi: 10.2147/RRTM.S204345
6. Barsoum RS, Esmat G, El-Baz T. Human schistosomiasis: clinical perspective: review. *J Adv Res*. (2013) 4(5):433-44. doi: 10.1016/j.jare.2013.01.005
7. Butrous G. Schistosome infection and its effect on pulmonary circulation. *Glob Cardiol Sci Pract*. (2019) 31;2019(1):5. doi: 10.21542/gcsp.2019.5
8. McManus DP, Dunne DW, Sacko M, Utzinger J, Vennervald BJ, Zhou XN. Schistosomiasis. *Nat Rev Dis Primers*. (2018) 9;4(1):13. doi: 10.1038/s41572-018-0013-8
9. Mutapi F, Maizels R, Fenwick A, Woolhouse M. Human schistosomiasis in the post mass drug administration era. *Lancet Infect Dis*. (2017) 17(2):e42-e48. doi: 10.1016/S1473-3099(16)30475-3
10. 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) 24;61(5):e02582-16. doi: 10.1128/AAC.02582-16
11. Doenhoff MJ, Cioli D, Utzinger J. Praziquantel: mechanisms of action, resistance and new derivatives for schistosomiasis. *Curr Opin Infect Dis*. (2008) 21(6):659-67. doi: 10.1097/QCO.0b013e328318978f
12. Seto EY, Wong BK, Lu D, Zhong B. Human schistosomiasis resistance to praziquantel in China: should we be worried? *Am J Trop Med Hyg*. (2011) 85(1):74-82. doi: 10.4269/ajtmh.2011.10-0542
13. Wang W, Wang L, Liang YS. Susceptibility or resistance of praziquantel in human schistosomiasis: a review. *Parasitol Res*. (2012) 111(5):1871-7. doi: 10.1007/s00436-012-3151-z
14. Gray DJ, Ross AG, Li YS, McManus DP. Diagnosis and management of schistosomiasis. *BMJ*. (2011) 17;342:d2651. doi: 10.1136/bmj.d2651

15. Botros S, Sayed H, Amer N, El-Ghannam M, Bennett JL, Day TA. Current status of sensitivity to praziquantel in a focus of potential drug resistance in Egypt. *Int J Parasitol.* (2005) 35(7):787-91. doi: 10.1016/j.ijpara.2005.02.005
16. Alonso D, Muñoz J, Gascón J, Valls ME, Corachan M. Failure of standard treatment with praziquantel in two returned travelers with *Schistosoma haematobium* infection. *Am J Trop Med Hyg.* (2006) 74(2):342-4
17. Lira MGS, Nogueira RA, Licá ICL, Frazão GCCG, dos Santos VAF, Mendes ACC, Rodrigues JGM, Miranda GS, Silva LA, Guerra RNM, Carvalho RC, Nascimento FRF. Immunomodulating and Anti-parasitary Mechanisms of Plant Products in the Treatment of Schistosomiasis. *Rev. Bras. Farmacogn.* (2023) 33(6), 1110–1125. doi: 10.1007/s43450-023-00442-2
18. Simoben CV, Ntie-Kang F, Akone SH, Sippl W. Compounds from African Medicinal Plants with Activities Against Selected Parasitic Diseases: Schistosomiasis, Trypanosomiasis and Leishmaniasis. *Nat Prod Bioprospect.* (2018) 8(3):151-169. doi: 10.1007/s13659-018-0165-y
19. Ososki AL, Lohr P, Reiff M, Balick MJ, Kronenberg F, Fugh-Berman A, O'Connor B. Ethnobotanical literature survey of medicinal plants in the Dominican Republic used for women's health conditions. *J Ethnopharmacol.* (2002) 79(3):285-98. doi: 10.1016/s0378-8741(01)00376-2
20. Nascimento FR, Cruz GV, Pereira PV, Maciel MC, Silva LA, Azevedo AP, Barroqueiro ES, Guerra RN. Ascitic and solid Ehrlich tumor inhibition by *Chenopodium ambrosioides* L. treatment. *Life Sci.* (2006) 25;78(22):2650-3. doi: 10.1016/j.lfs.2005.10.006
21. 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. *J Ethnopharmacol.* (2007) 20;111(1):148-54. doi: 10.1016/j.jep.2006.11.006
22. 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.* (2021) 10;264:113287. doi: 10.1016/j.jep.2020.113287
23. Cysne DN, Fortes TS, Reis AS, de Paulo Ribeiro B, Dos Santos Ferreira A, do Amaral FM, Guerra RN, Marinho CR, Nicolete R, Nascimento FR. Antimalarial potential of leaves of *Chenopodium ambrosioides* L. *Parasitol Res.* (2016) 115(11):4327-4334. doi: 10.1007/s00436-016-5216-x
24. Bezerra JL, Costa GC, Lopes TC, Carvalho ICDS, Patrício FJ, Sousa SM, Amaral FMM, Rebelo JMM, Guerra RNM, Ribeiro MNS, Nascimento FRF. Evaluation of leishmanicidal

activity in vitro of medicinal plants. Brazilian Journal of Pharmacognosy. (2006) 16: 631–637. doi: 10.1590/S0102-695X2006000500008

25. Pereira WS, Ribeiro BP, Sousa AI, Serra IC, Mattar NS, Fortes TS, Reis AS, Silva LA, Barroqueiro ES, Guerra RN, Nascimento FR. Evaluation of the subchronic toxicity of oral treatment with *Chenopodium ambrosioides* in mice. J Ethnopharmacol. (2010) 17;127(3):602-5. doi: 10.1016/j.jep.2009.12.018

26. Pereira WS, da Silva GP, Vigliano MV, Leal NRF, Pinto FA, Fernandes DC, Santos SVM, Martino T, Nascimento JR, de Azevedo APS, Fonseca EN, Velozo LSM, Souza Neto LR, Bastos FF, Portari EA, Sabino KCC, Nascimento F, Coelho MGP. Anti-arthritic properties of crude extract from *Chenopodium ambrosioides* L. leaves. J Pharm Pharmacol. (2018) 70(8):1078-1091. doi: 10.1111/jphp.12926

27. Calado GP, Lopes AJ, Costa Junior LM, Lima Fd, Silva LA, Pereira WS, Amaral FM, Garcia JB, Cartágenes Mdo S, Nascimento FR. *Chenopodium ambrosioides* L. Reduces Synovial Inflammation and Pain in Experimental Osteoarthritis. PLoS One. (2015) 2;10(11):e0141886. doi: 10.1371/journal.pone.0141886

28. Pinheiro Neto VF, Ribeiro RM, Moraes CS, Campos MB, Vieira DA, Guerra PC, Abreu-Silva AL, Silva Junior JR, Nascimento FRF, Borges MOR, Borges ACR. *Chenopodium ambrosioides* as a bone graft substitute in rabbits radius fracture. BMC Complement Altern Med. (2017) 4;17(1):350. doi: 10.1186/s12906-017-1862-5

29. Lescano SZ, Chieffi PP, Canhassi RR, Boulos M, Amato Neto V. Antiparasitic activity of artemether in experimental *schistosomiasis mansoni* [Antischistosomal activity of artemether in experimental *Schistosomiasis mansoni*]. Rev Saude Publica. (2004) 38(1):71-5. Portuguese. doi: 10.1590/s0034-89102004000100010

30. Aires Ade L, Ximenes EC, Barbosa VX, Góes AJ, Souza VM, Albuquerque MC.  $\beta$ -Lapachone: a naphthoquinone with promising antischistosomal properties in mice. Phytomedicine. (2014) 15;21(3):261-7. doi: 10.1016/j.phymed.2013.08.012

31. 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. Infect Immun. (2004) 72(2):1135-42. doi: 10.1128/IAI.72.2.1135-1142.2004

32. Cheever AW. Conditions affecting the accuracy of potassium hydroxide digestion techniques for counting *Schistosoma mansoni* eggs in tissues. Bull World Health Organ. (1968) 39(2):328-31.

33. Luna LG. Manual of the Histologic Staining Methods of the Armed Forces Institute of Pathology. (1968). 3 ed. McGraw Hill, New York.

34. Liberio SA, Pereira AL, Dutra RP, Reis AS, Araújo MJ, Mattar NS, Silva LA, Ribeiro MN, Nascimento FR, Guerra RN, Monteiro-Neto V. Antimicrobial activity against oral pathogens and immunomodulatory effects and toxicity of geopropolis produced by the stingless bee



*Melipona fasciculata* Smith. BMC Complement Altern Med. (2011) 4;11:108. doi: 10.1186/1472-6882-11-108

35. Maciel MC, Fialho EM, Guerra RN, Borges VM, Kwasniewski FH, Nascimento FR. *Tityus serrulatus* scorpion venom improves survival and lung inflammation in lethal sepsis induced by CLP in mice. Toxicon. (2014) 89, 1-8. doi: 10.1016/j.toxicon.2014.06.018

36. Oliveira AS, Nascimento JR, Trovão LO, Alves PCS, Maciel MCG, Silva LDM, Marques AA, Santos APSA, Silva LA, Nascimento FRF, Guerra RNM. The anti-inflammatory activity of *Anacardium occidentale* L. increases the lifespan of diabetic mice with lethal sepsis. J Ethnopharmacol. (2019) 23;236:345-353. doi: 10.1016/j.jep.2019.03.014.

37. Yang Q, Wang B, Yu H, Zhu Y, Wang X, Jiang H, Wang C, Peng J, Hou M. TLR7 promotes Th1 polarization in immune thrombocytopenia. Thromb Res. (2011) 128(3):237-42. doi: 10.1016/j.thromres.2011.02.024.

38. Kandsi F, Lafdil FZ, Elbouzidi A, Bouknana S, Miry A, Addi M, Conte R, Hano C, Gseyra N. Evaluation of Acute and Subacute Toxicity and LC-MS/MS Compositional Alkaloid Determination of the Hydroethanolic Extract of *Dysphania ambrosioides* (L.) Mosyakin and Clemants Flowers. Toxins (Basel). (2022) 12;14(7):475. doi: 10.3390/toxins14070475.

39. Bartsch H, Kuroki T, Malaveille C, Loprieno N, Barale R, Abbondandolo A, Bonatti S, Rainaldi G, Vogel E, Davis A. Absence of mutagenicity of praziquantel, a new, effective, anti-schistosomal drug, in bacteria, yeasts, insects and mammalian cells. Mutat Res. (1978) 58(2-3):133-42. doi: 10.1016/0165-1218(78)90002-2.

40. Frohberg H, Schulze Schencking M. Toxicological profile of praziquantel, a new drug against cestode and schistosome infections, as compared to some other schistosomicides. Arzneimittelforschung. (1981) 31(3a):555-65.

41. Kamel EG, El-Emam MA, Mahmoud SS, Fouda FM, Bayaomy FE. Parasitological and biochemical parameters in *Schistosoma mansoni*-infected mice treated with methanol extract from the plants *Chenopodium ambrosioides*, *Conyza dioscorides* and *Sesbania sesban*. Parasitol Int. (2011) 60(4):388-92. doi: 10.1016/j.parint.2011.06.016

42. Soares MH, Dias HJ, Vieira TM, de Souza MGM, Cruz AFF, Badoco 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). Chem Biodivers. (2017) 14(8). doi: 10.1002/cbdv.201700149

43. Winkelmann F, Frank M, Rabes A, Koslowski N, Schulz C, Bischofsberger M, Reisinger EC, Sombetzki M. Human serum activates the tegument of female schistosomes and supports recovery from Praziquantel. Parasitol Res. (2021) 120(1):209-221. doi: 10.1007/s00436-020-06968-x

44. Lamberton PHL, Faust CL, Webster JP. Praziquantel decreases fecundity in *Schistosoma mansoni* adult worms that survive treatment: evidence from a laboratory life-history trade-offs selection study. *Infect Dis Poverty*. (2017) 16;6(1):110. doi: 10.1186/s40249-017-0324-0
45. Campelo YDM, Mafud AC, Vêras LMC, Guimarães MA, Yamaguchi LF, Lima DF, Arcanjo DDR, Kato MJ, Mendonça RZ, Pinto PLS, Mascarenhas YP, Silva MPN, de Moraes J, Eaton P, de Souza de Almeida Leite JR. Synergistic effects of in vitro combinations of pipartine, epiisopiloturine and praziquantel against *Schistosoma mansoni*. *Biomed Pharmacother*. (2017) 88:488-499. doi: 10.1016/j.biopha.2016.12.057
46. Mahmoud TY, Rizk SM, Maghraby AS, Shaheen AA. Propolis enhances the effectiveness of praziquantel in experimental schistosomiasis: biochemical and histopathological study. *Parasitol Res*. (2014) 113(12):4513-23. doi: 10.1007/s00436-014-4141-0
47. Souza FPC, Vitorino RR, Costa AP, Júnior FCF, Santana LA, Gomes AP. *Schistosomiasis mansoni*: general aspects, immunology, pathogenesis and natural history. *Journal of the Brazilian Society of Clinical Medicine*. (2011) 9 (4): 300-7.
48. Schwartz C, Fallon PG. *Schistosoma* "Eggs-Itting" the Host: Granuloma Formation and Egg Excretion. *Front Immunol*. (2018) 29;9:2492. doi: 10.3389/fimmu.2018.02492
49. 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*. (2014) 58(4):2076-83. doi: 10.1128/AAC.01936-13
50. Al-Olayan EM, El-Khadragy MF, Alajmi RA, Othman MS, Bauomy AA, Ibrahim SR, Abdel Moneim AE. Ceratonia siliqua pod extract ameliorates *Schistosoma mansoni*-induced liver fibrosis and oxidative stress. *BMC Complement Altern Med*. (2016) 8;16(1):434. doi: 10.1186/s12906-016-1389-1
51. Hernández-Ortega LD, Alcántar-Díaz BE, Ruiz-Corro LA, Sandoval-Rodriguez A, Bueno-Topete M, Armendariz-Borunda J, Salazar-Montes AM. Quercetin improves hepatic fibrosis reducing hepatic stellate cells and regulating pro-fibrogenic/anti-fibrogenic molecules balance. *J Gastroenterol Hepatol*. (2012) 27(12):1865-72. doi: 10.1111/j.1440-1746.2012.07262.x
52. Gholampour F, Saki N. Hepatic and renal protective effects of quercetin in ferrous sulfate-induced toxicity. *Gen Physiol Biophys*. (2019) 38(1):27-38. doi: 10.4149/gpb\_2018038
53. Schramm G, Haas H. Th2 immune response against *Schistosoma mansoni* infection. *Microbes Infect*. (2010) 12(12-13):881-8. doi: 10.1016/j.micinf.2010.06.001
54. Basten A, Boyer MH, Beeson PB. Mechanism of eosinophilia. I. Factors affecting the eosinophil response of rats to *Trichinella spiralis*. *J Exp Med*. (1970) 1;131(6):1271-87. doi: 10.1084/jem.131.6.1271
55. Langenberg MCC, Hoogerwerf MA, Koopman JPR, Janse JJ, Kos-van Oosterhoud J, Feijt C, Jochems SP, de Dood CJ, van Schuijlenburg R, Ozir-Fazalalikhhan A, Manurung MD,

Sartono E, van der Beek MT, Winkel BMF, Verbeek-Menken PH, Stam KA, van Leeuwen FWB, Meij P, van Diepen A, van Lieshout L, van Dam GJ, Corstjens PLAM, Hokke CH, Yazdanbakhsh M, Visser LG, Roestenberg M. A controlled human *Schistosoma mansoni* infection model to advance novel drugs, vaccines and diagnostics. Nat Med. (2020) 26(3):326-332. doi: 10.1038/s41591-020-0759-x

56. Ibironke GF, Ajiboye KI. Studies on the anti-inflammatory and analgesic properties of *Chenopodium ambrosioides* leaf extract in rats. International Journal of Pharmacology. (2007) 3: 111-115. doi: 10.3923/ijp.2007.111.115

57. TrivellatoGrassi L, Malheiros A, Meyre-Silva C, Buss Zda S, Monguilhott ED, Fröde TS, da Silva KA, de Souza MM. From popular use to pharmacological validation: a study of the anti-inflammatory, anti-nociceptive and healing effects of *Chenopodium ambrosioides* extract. J Ethnopharmacol. (2013) 9;145(1):127-38. doi: 10.1016/j.jep.2012.10.040

## CAPÍTULO II

**O uso do extrato padronizado de própolis de *Apis melífera* (EPP-AF®) reduz a carga parasitária e o perfil inflamatório durante infecção por *Schistosoma mansoni***

**O trabalho avalia pela primeira vez os mecanismos imunológicos do EPP-AF® sobre a infecção por *S. mansoni*.**

**Trabalho submetido no periódico Journal of Ethnopharmacology, em 2024.**

## MANUSCRITO II

**O uso do extrato padronizado de própolis de *Apis melífera* (EPP-AF®) reduz a carga parasitária e o perfil inflamatório durante infecção por *Schistosoma mansoni***

**Vitor Augusto Ferreira dos Santos <sup>a</sup>, Irla Correia Lima Licá <sup>a</sup>, Gleycka Cristine Carvalho Gomes Frazão <sup>a</sup>, Ranielly Araujo Nogueira <sup>a</sup>, Maria Gabriela Sampaio Lira <sup>a</sup>, João Gustavo Mendes Rodrigues <sup>b</sup>, Guilherme Silva Miranda <sup>c</sup>, Josivan Regis Farias <sup>a</sup>, Sulayne Janayna Araujo Guimarães <sup>a</sup>, Lucilene Amorim Silva <sup>a</sup>, Rosane Nassar Meireles Guerra <sup>a</sup>, Flávia Raquel Fernandes Nascimento <sup>a</sup>**

<sup>a</sup> Laboratório de Imunofisiologia, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal do Maranhão, CEP: 65.055-970, São Luís, MA, Brasil

<sup>b</sup> Laboratório de Imunohelminologia, Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, CEP: 31.270-901, Belo Horizonte, MG, Brasil

<sup>c</sup> Laboratório de Biologia, Departamento de Educação, Instituto Federal de Educação, CEP: 65.840-000, São Raimundo Das Mangabeiras, MA, Brasil

## RESUMO

**Relevância etnofarmacológica:** Relatos da medicina popular destacam os efeitos benéficos do uso da própolis verde sobre diferentes doenças, cientificamente, as propriedades imunomoduladoras, anti-inflamatórias e antioxidante já foram comprovadas e estão envoldidas em uma série de efeitos no organismos. Embora a própolis tenha demonstrado efeito anti-helmíntico contra *S. mansoni*, os mecanismos imunológicos envolvidos nesse processo ainda não foram elucidados na literatura. A esquistossomose mansoni é uma das principais doenças infecto-parasitária, apresenta apenas um único medicamento para controle, o Praziquantel. As investigações de produtos naturais têm apresentado resultados promissores sobre diversos parasitas, dentre os quais, o *S. mansoni*.

**Objetivo do estudo:** Avaliar o efeito do extrato padronizado de própolis de *Apis mellífera* (EPP-AF®) *in vitro* e *in vivo* na infecção por *Schistosoma mansoni*.

**Materiais e métodos:** Inicialmente, foram realizados ensaios *in vitro* com vermes fêmeas de *S. mansoni*, expostos a diferentes concentrações do extrato (250 µg/mL, 150 µg/mL e 50 µg/mL). Para a avaliação *in vivo*, camundongos Swiss foram infectados com 70 cercárias viáveis de *S. mansoni* por via subcutânea e divididos em quatro grupos (n=6): grupo não infectado (animais sem infecção e sem tratamento), grupo infectado (animais infectados e sem tratamento), grupo PZQ (animais infectados e tratados com Praziquantel) e grupo EPP-AF® (animais infectados e tratados com própolis na dose de 4,5mg/Kg durante 30 dias, via oral). Após 90 dias, os animais foram eutanasiados para a avaliação dos parâmetros parasitológicos, histopatológicos e imunológicos

**Resultados:** O EPP-AF® reduziu a viabilidade dos vermes *in vitro* em todas as concentrações testadas, com efeito letal observado após 36 horas na concentração de 250 µg/mL. No modelo *in vivo*, o tratamento com EPP-AF® reduziu o número de ovos nas fezes, bem como aqueles retidos no fígado e intestino. Também foi observada uma redução nos danos histopatológicos no fígado, intestino e rim, além de diminuição do número e diâmetro médio dos granulomas. Em relação à celularidade sanguínea, o EPP-AF® reduziu a eosinofilia aos 30 e 90 dias, sem alterar as concentrações de IgE total e as de IL-10 e IL-17 no soro. No baço, a fenotipagem revelou que o EPP-AF® reduziu a expressão de F480+ e estimulou a de CD170+, além de diminuir as citocinas IFN-γ, IL-2 e IL-6, aumentar IL-10 e reduzir a quimiocina MIP-1.

**Conclusão:** Este estudo demonstra que o EPP-AF® possui atividade anti-helmíntica e imunomoduladora eficaz contra as diferentes fases da infecção por *S. mansoni*. O EPP-AF® reduziu a viabilidade dos vermes, diminuiu a carga parasitária. Além disso, o extrato modula o perfil inflamatório, reduzindo os danos histopatológicos e melhorando o quadro clínico da esquistossomose.

**Palavras-chave:** Anti-inflamatório; Imunomodulador; própolis; *Schistosoma mansoni*.

## 1. Introdução

A esquistossomose é uma doença infecto-parasitária reconhecida como uma das doenças tropicais negligenciadas, acometendo principalmente países do continente africano, asiático e americano, dados apontam a ocorrência em 78 países (McManus et al., 2018; Who, 2018). Ocasionalmente por helmintos trematódeos do gênero *Schistosoma*, a espécie *Schistosoma mansoni* é a única registrada até o momento no Brasil, esta espécie afeta cerca de 240 milhões de pessoas e provoca milhões de mortes ao ano (Who, 2018; LoVerde, 2019).

No hospedeiro vertebrado, a fase inicial da infecção pode ser sintomática podendo ocorrer reações inflamatórias dérmicas e sub-dérmicas, febre, dor abdominal e cefaleia (Souza et al., 2011; Hams et al., 2013; Who, 2018). Antes da oviposição do parasito, há predominância de uma resposta imune tipo Th1, caracterizada pela produção de citocinas pró-inflamatórias como IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-1, IL-12, IL-6 e TNF- $\alpha$ , que ativam células imunes inatas, como macrófagos (Turner et al., 2011; Licá et al., 2023).

Na fase aguda, os ovos que deveriam ser eliminados nas fezes acabam permanecendo no organismo, ficando retidos em vários órgãos, o que resulta na formação de inflamação granulomatosa, e posteriormente em fibrose. Neste momento a resposta imunológica tem predomínio do tipo Th2, que induz a produção de citocinas (IL-4, IL-13, IL-10, IL-5), que estimulam a eosinofilia, diferenciação de macrófagos alternativamente ativados e a produção de IgE. Nesta fase, o quadro clínico tende a evoluir com comprometimento das funções morfológicas e fisiológicas no tecido hepático, tais como hepatomegalia e fibrose (Hams et al., 2013; Who, 2018; Licá et al., 2023).

Nos últimos 40 anos, o Praziquantel (PZQ) é o único fármaco recomendado pela OMS para tratamento eficaz contra a esquistossomose (Cupit; Cunningham, 2015). No entanto, estudos têm relatado os efeitos colaterais dessa droga e a baixa eficácia sobre vermes jovens. Também há evidências de que o PZQ não impede a reinfecção, e não reverte a fibrose (Doenhoff et al., 2008; Vale et al., 2017; Seto et al., 2011; Wang et al., 2012; Gray et al., 2011). Apesar de sua eficácia já comprovada contra verme adulto de *Schistosoma mansoni*, o uso prolongado, repetidamente e em massa em áreas endêmicas pode gerar grandes problemas devido ao desenvolvimento de resistência ou tolerância do parasito ao fármaco (Wang et al., 2019).

Sendo assim, os produtos naturais são importantes fontes farmacológicas para desenvolvimento ou aprimoramento de novos medicamentos, apresentam uma ampla gama de compostos biologicamente ativos com efeitos sobre diversas doenças, dentre elas, as infecções

causadas por parasitas (Simoben et al., 2018). Entre os diversos produtos naturais com efeitos farmacológicos promissores, destaca-se a própolis, um produto resinoso de composição química complexa (Bankova, 2005). Estudos evidenciaram o efeito positivo da própolis no uso como suplemento alimentar ou adjuvante imunológico (Pahlavani et al., 2022; Tasca et al., 2023; Chermut et al., 2023).

Entre as diversas atividades biológicas que a própolis apresenta (Zingue et al., 2020; Kwon et al., 2020; Fiorini et al., 2021), estudos têm destacado efeito antiparasitário (Alday-Provencio et al., 2015; Mohamed et al., 2016; Afrouzan et al., 2017, Algabbani et al., 2017; Alotaibi et al., 2021; Fouad et al., 2021; Barakat et al., 2022).

Entre as atividades antiparasitárias da própolis, a ação contra helmintos tem se mostrado promissora, com estudos demonstrando seu potencial frente à infecção pelo *S.mansoni* (Mohamed et al., 2016; De L Paula et al., 2022; Silva et al., 2021). Embora alguns trabalhos já tenham evidenciado a eficácia parasitológica da própolis, os mecanismos de ação dessa substância, especialmente sobre a resposta imunológica do hospedeiro vertebrado durante a infecção por *S. mansoni* e outras infecções helmínticas, permanecem pouco compreendidos. Nesse contexto, nosso estudo buscou avaliar o efeito do extrato padronizado de própolis de *Apis mellifera* (EPP-AF®) ao longo da fase inicial e crônica da infecção por *S. mansoni* em camundongos, com o intuito de investigar os mecanismos imunológicos envolvidos na sua ação antiparasitária.

## **2. Materiais e métodos**

### **2.1 Extrato de própolis Padronizado EPP-AF®**

Neste estudo, foi utilizado o extrato padronizado de própolis de *Apis mellifera* (EPP-AF®), fornecido pela empresa Apis Flora em parceria com o laboratório de Imunofisiologia da Universidade Federal do Maranhão. O EPP-AF® é um produto comercial padronizado, composto por própolis verde, álcool neutro e água purificada, com uma concentração mínima de 16% p/v de extrato seco (Lote: 251400119LP).

### **2.2 Ensaio *in vitro***

#### **2.2.1 Ensaio esquistossomicida com vermes**

Para o ensaio esquistossomicida, foram utilizados vermes fêmeas adultas, estes vermes foram obtidos por sistema portal via perfusão com solução salina estéril (NaCl 0,9% p/v)



(Smithers e Terry, 1965) de camundongos após sessenta dias de infecção. Os vermes foram imediatamente transferidos para meio RPMI 1640 suplementados com 100  $\mu$ g/mL penicilina, 100  $\mu$ g/mL estreptomicina e 10% soro bovino fetal e lavado duas vezes com este meio. Os vermes foram colocados ( $n = 2/\text{poço}$ ) em cultura (placas de 24 poços) contendo 2 mL de meio suplementado antes de ser incubado a 37 °C em estufa de CO<sub>2</sub>. Após duas horas de incubação, o EPP-AF® foi adicionado em concentrações de 250  $\mu$ g/mL, 150  $\mu$ g/mL e 50  $\mu$ g/mL. Vermes incubados em meio RPMI suplementado serviram como grupo controle negativo. Vermes incubados em 10 $\mu$ g/mL de PZQ serviram como controle positivo. A viabilidade do verme foi monitorada nos intervalos de 6, 12, 18, 24, 30, 36, 48 e 60 horas de cultura (adaptado de Soares et al., 2017), de acordo com os critérios de viabilidade, com base em uma escala (Horiuchi et al., 2005). Ambos os testes foram repetidos quatro vezes, em triplicata.

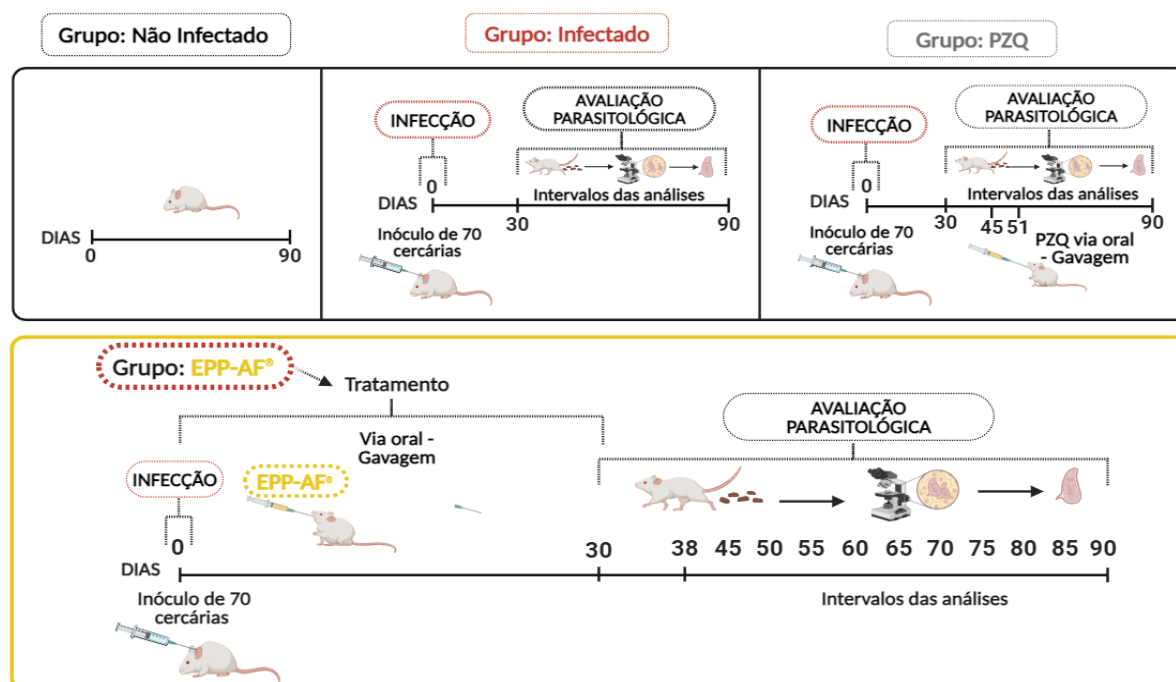
## 2.3 Ensaio *in vivo*

### 2.3.1 Infecção e tratamento dos camundongos com EPP-AF®

Para o modelo experimental foram utilizados camundongos Swiss machos ( $n=24$ ) com 2-3 meses de idade (35g), oriundos do Biotério Central da Universidade Federal do Maranhão. Todos os procedimentos foram previamente aprovados pela CEUA- UFMA, protocolo: 23115.002254/2020-18 (Anexo A).

Os camundongos foram divididos em quatro grupos de seis animais cada, grupo não infectado, animais sem infecção e sem tratamento (Fig. 1), grupo infectado, animais infectados e sem tratamento (Fig. 1B)), grupo PZQ, animais infectados e tratados com Praziquantel no intervalo entre os dias 45 a 51 após a infecção na dose de 50mg/Kg, por via oral com gavagem (Aires et al., 2014), (Fig. 1C) e grupo EPP-AF®, correspondeu a animais infectados e tratados com própolis na dose de 4,5mg/Kg, durante 30 dias, por via oral, gavagem, esse tratamento teve início logo após a infecção (Fig. 1D). A infecção dos camundongos foi realizada com 70 cercárias viáveis de *S. mansoni* (estirpe LE) inoculadas por via subcutânea (Lescano et al., 2004).

No 30º dia foi realizada uma análise leucocitária e iniciado a coleta de fezes para avaliação de liberação de ovos. Ao final do 90º dia, os animais foram eutanasiados e foi obtido o sangue, soro, lavado peritoneal, medula óssea, baço, fígado, intestino e rim para procedimentos posteriores.



**Fig. 1.** Delineamento experimental dos grupos não tratados ou tratados com EPP-AF. Controle não infectado (A), controle infectado (B), controle positivo (PZQ) (C) e grupo EPP-AF (D). Fonte: Criado com BioRender.com.

### 2.3.2 Quantificação de ovos de *S. mansoni* nas fezes e retido no fígado e intestino

A avaliação de ovos nas fezes ocorreu inicialmente com a obtenção das amostras das fezes, em seguida, o material biológico foi pesado e homogeneizado com 10mL de solução tamponada de formaldeído a 10%. Posteriormente foi realizada a contagem de ovos. O resultado da quantificação de ovos foi obtido a partir da contagem e posteriormente convertido para ovos/grama de fezes (Negro-Corréa et al., 2004). Para a avaliação da estimativa do número de ovos retidos no fígado utilizou-se a metodologia descrita por Cheever (1996), o maior lobo do fígado de cada animal foi removido durante a necropsia e processado separadamente usando a técnica de digestão com hidróxido de potássio (KOH 5%). Para a quantificação da estimativa de ovos retidos no intestino, seguiu-se a mesma metodologia descrita acima, com adaptações para a análise do intestino, onde foi obtido todo o intestino e separado um fragmento do intestino delgado e grosso para realização do processo de digestão, sendo utilizado 15cm do fraqueamento do intestino delgado e grosso.

### 2.3.3 Avaliação histopatológica e histomorfométrica do tecido hepático, intestinal e renal

Amostras do fígado (parte central do lobo direito do lobo bilobado), intestino (fragmento do intestino delgado e grosso) e renal (Rim direito) de cada animal foram armazenadas em formaldeído a 10% por 48 h. Após a fixação, todas as amostras foram lavadas e colocadas em álcool 70%. Posteriormente, foram desidratadas em séries crescentes de álcool, diafanizadas em xilol, e embebido em parafina, para posterior preparação das lâminas histológicas, que foram coradas com hematoxilina e eosina (HE) (Luna, 1968). Os parâmetros histopatológicos analisados nas amostras foram: Quantidade de ovos, presença de granulomas, extensão de granulomas, fibrose, lesão tecidual, necrose, infiltrado inflamatório e congestão vascular. A avaliação destes parâmetros se deu através da classificação de pontuações como, ausente (0), leve (1), moderado (2) ou intenso (3) (Liberio et al., 2011), com adaptações. A análise histomorfométrica (Contagem do número e área dos granulomas) foi realizada com imagens de seis campos aleatórios por amostra histológica obtida em fotomicroscópio, modelo Zeiss Axio Scope.A1, acoplado a um computador, utilizando o software ImageJ 6.0 (Bethesda, Maryland, EUA).

#### 2.3.4 Análise de leucócitos no sangue aos 30 e 90 dias

Ao 30º dia, foi realizada uma incisão na ponta da cauda dos camundongos e coletado alíquotas de 10µL de sangue. Ao final do 90º dia, também foi coletado alíquotas de 10µL de sangue. Em ambas as amostras individuais de cada animal, foi realizado o preparado de esfregaço sanguíneo para contagem diferencial dos leucócitos. Os esfregaços foram corados com um kit panóptico rápido (Laborclin, Brasil) (Maciel et al., 2014).

#### 2.3.5 Análise da celularidade da medula óssea, baço e peritônio

Para análise das células do lavado peritoneal, as amostras foram obtidas e em seguida centrifugadas com auxílio da centrífuga CitoSpin, após centrifugação as lâminas foram coradas com kit panóptico rápido (Laborclin, Brasil), a contagem foi realizada com auxílio de microscópio óptico de luz (Oliveira et al., 2019). Para análise das células da medula óssea, inicialmente o fêmur foi obtido, em seguida foi perfundido com 1mL de solução salina tamponada com fosfato (PBS). Para obtenção dos esplenócitos, o baço foi moído, as amostras foram filtradas e ressuspensas em 3mL de PBS. Após isto, as suspensões celulares foram

fixadas e coradas com cristal violeta de cristal na proporção de 9:1, com auxílio da câmara de Neubauer e microscópio óptico de luz as amostras foram avaliadas (Cruz et al., 2007).

### 2.3.6 Avaliação da celularidade do baço por citometria de fluxo

Células do baço ( $1 \times 10^6$ ) foram incubadas junto com anticorpos monoclonais conjugados a fluorocromos respectivamente: anti-CD3 conjugado a FITC; anti-CD19 a FITC; anti-F4/80 a FITC; anti-CD170 a FITC e anti-LY6G a PERCP, seguindo as recomendações do fabricante (BD Biosciences Pharmingen). As amostras foram analisadas no citometro de fluxo guava, os resultados foram analisados pelo software Flow Jow®.

### 2.3.7 Cultura e quantificação de citocinas pela técnica CBA no baço

As células do baço (após hemólise) foram cultivadas em placas de 96 poços ( $2 \times 10^5$  por poço) em meio RPMI 1640 completo (Sigma, EUA) suplementado com 2 mM de L-glutamina, 23 mM de L-asparagina, 0,1 mM de pirúvico ácido, ácido fólico 1 mM, estreptomicina a 1% (100 µg/mL), penicilina G (100 U/mL) e 2% de soro fetal bovino. As células foram incubadas por 48 horas a 37 °C e 5% CO<sub>2</sub> (Yang et al., 2011). A expressão de TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-6, IL-2, IL-10, IL-4, IL-17 e da quimiocina MIP-1 foram quantificadas no sobrenadante da cultura celular do baço através do kit Th1/Th2/Th17 usando a técnica de microesferas (beads) CBA (Cytometric Bead Array), seguindo as informações do fabricante (BD Biosciences). Os resultados foram adquiridos por citometria de fluxo com FACScalibur (BD Biosciences) e após a leitura, os dados foram analisados com auxílio do software Flow Jow®. Os valores foram expressos em pg/mL para cada uma das citocinas, a partir das curvas padrão.

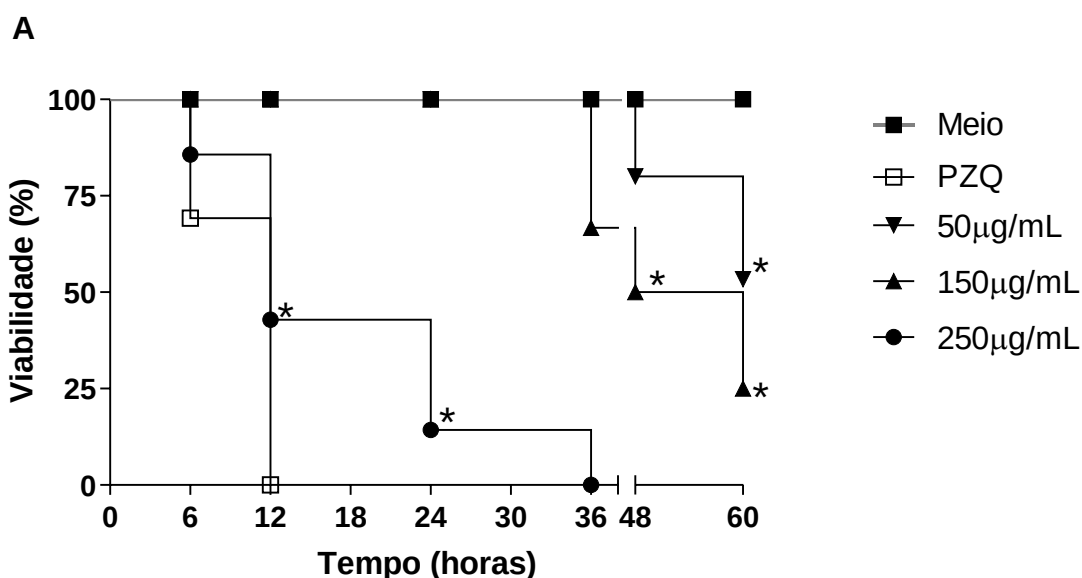
## 2.4 Análise estatística

A análise estatística foi realizada com auxílio do Software GraphPad Prism, versão 8.0 (Prism Software, Irvine, Califórnia, EUA). Os dados foram inicialmente avaliados pelo teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov e os resultados foram apresentados como média  $\pm$  desvio padrão (S.D). Além disso, o teste *t* de Student foi aplicado. As curvas de Kaplan-Meier foram utilizadas para análise de sobrevivência, seguido do teste Log-Rank. No estudo, foi considerado resultados significativos quando  $p < 0,05$ .

### 3. Resultados

#### 3.1 O EPP-AF® apresenta atividade esquistossomicida *in vitro*

Vermes fêmeas de *S. mansoni* expostas na concentração de 250µg/mL apresentaram redução da viabilidade em 85,71%, 42,85%, 14,28% nos tempos de 6, 12 e 24 horas respectivamente, sendo identificado efeito letal no tempo de 36 horas. A concentração de 150µg/mL reduziu a viabilidade em 66,66%, 50% e 25% nos tempos de 36, 48 e 60 horas respectivamente. A concentração de 50µg/mL reduziu a viabilidade em 80% e 53,33% nos tempos de 48 e 60 horas respectivamente. Os vermes expostos ao Praziquantel reduziram a viabilidade em 69,23 no tempo de 6 horas e promoveram letalidade dos vermes no tempo de 12 h. E os vermes do grupo controle negativo permaneceram com 100% de viabilidade no tempo de 60 horas (Fig. 2).

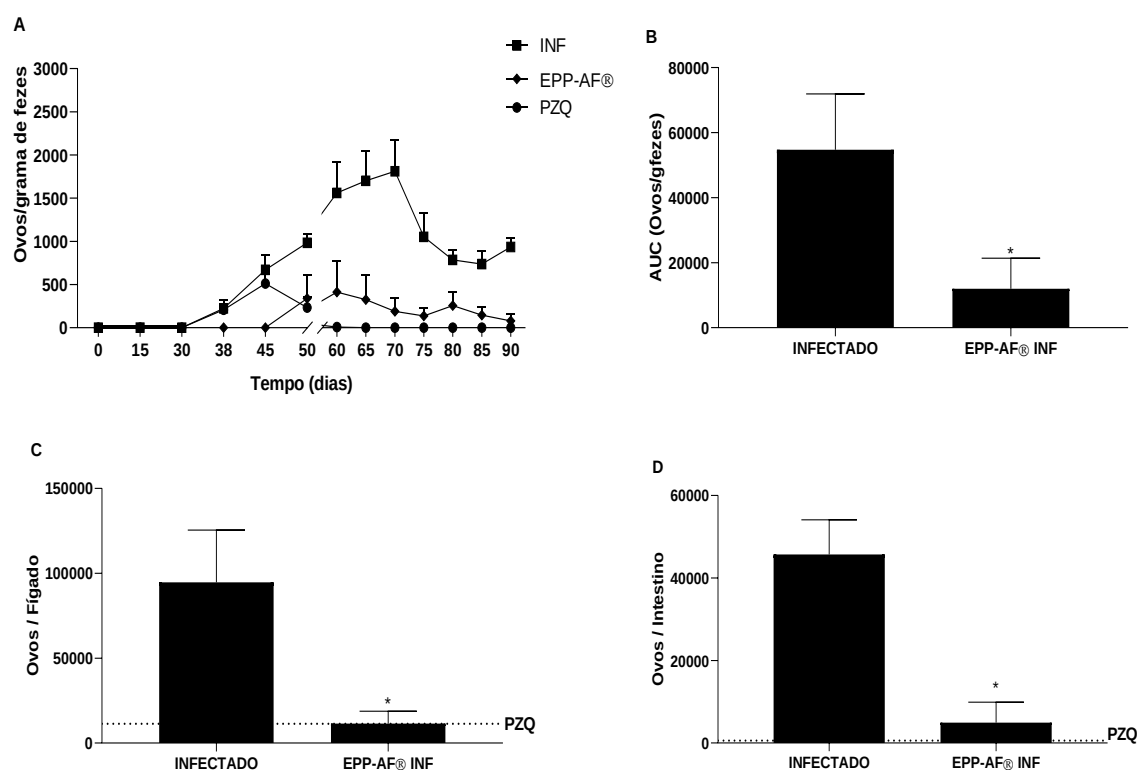


**Fig. 2.** Efeito do extrato padronizado de própolis de *Apis mellifera* (EPP-AF®) na viabilidade de vermes fêmeas adultas de *S. mansoni*. Vermes adultos foram expostos em concentrações de 50, 150 e 240µg/mL de EPP-AF® e em 10µg/mL de Praziquantel®. Análise estatística pelo teste Long-Rank considerando \*  $p < 0.05$  comparado ao controle negativo.

#### 3.2 O EPP-AF® reduziu o número de ovos nas fezes, área sobre a curva e o número de ovos retidos no fígado e intestino

O uso do dia 0 ao dia 30 pós-infecção com EPP-AF® provocou efeitos em reduzir o número de ovos nas fezes (Fig. 3A). A presença de ovos no grupo EPP-AF® foi identificada a

partir do 50º dia, enquanto o grupo controle infectado já apresentava ovos no 38º dia de infecção, assim como no controle PZQ antes do tratamento. Após tratamento, o PZQ inibiu a oviposição. O EPP-AF® apresentou efeito significativo em reduzir o número de ovos nos intervalos entre 60º e 90º dia (Fig. 3A). Quando avaliado a área sob a curva (Fig. 3B), o EPP-AF® reduziu significativamente o número de ovos. Ao avaliarmos o número de ovos retidos no fígado (Fig. 3C) e intestino (Fig. 3D) identificamos redução de ovos no grupo EPP-AF® em ambos os órgãos em relação ao controle infectado. Com relação ao grupo PZQ e EPP-AF® não houve diferença.



**Fig. 3.** Efeito do extrato padronizado de própolis de *Apis mellifera* (EPP-AF®) sobre o número de ovos nas fezes (A) área sob a curva (B), número de ovos no fígado (C) e intestino (D). No dia 0 os animais foram infectados com 70 cercárias. Após infecção, do dia 0 ao 30º dia, um grupo infectado foi tratado com EPP-AF®. O grupo PZQ, recebeu Praziquantel nos dias 45-51. O grupo controle infectado, esteve ausente de tratamento. Os valores representam a média  $\pm$  desvio padrão de 6 animais por grupo. (\*)  $p < 0.05$  em comparação ao controle infectado sem tratamento.

### 3.3 EPP-AF® reduziu alterações no tecido hepático, intestino e rim na infecção por *S. mansoni*

O tratamento com EPP-AF® reduziu a quantidade de ovos, extensão do granuloma, fibrose, lesão tecidual, infiltrado inflamatório e congestão vascular em relação ao grupo infectado. Não apresentando diferença entre os grupos PZQ e EPP-AF® (Tabela 1).

**Tabela 1**

Análise histopatológica do tecido hepático de camundongos infectados ou não por *S. mansoni*, tratados ou não com EPP-AF®.

| Parâmetros Analisados  | Grupos        |                      |          |          |
|------------------------|---------------|----------------------|----------|----------|
|                        | NÃO INFECTADO | INFECTADO            | PZQ      | EPP-AF®  |
| Quantidade de ovos     | 0             | 3±0 <sup>@</sup>     | 2±0*     | 1,3±1.5* |
| Presença de granulomas | 0             | 3±0 <sup>@</sup>     | 2±0*     | 2±1.7    |
| Extensão do granuloma  | 0             | 3±.0 <sup>@</sup>    | 2±0*     | 1.3±1.5* |
| Fibrose Lesão          | 0             | 2±0 <sup>@</sup>     | 1±0*     | 0.6±0.5* |
| Tecidual               | 0             | 3±0 <sup>@</sup>     | 2±0*     | 1±0*     |
| Necrose                | 0             | 1,3±0.5 <sup>@</sup> | 1±0      | 1±0      |
| Infiltrado             | 0             | 3±0 <sup>@</sup>     | 1.6±0.5* | 2.0*     |
| Congestão vascular     | 0             | 2±0 <sup>@</sup>     | 1,3±0.5  | 0.6±0.5* |

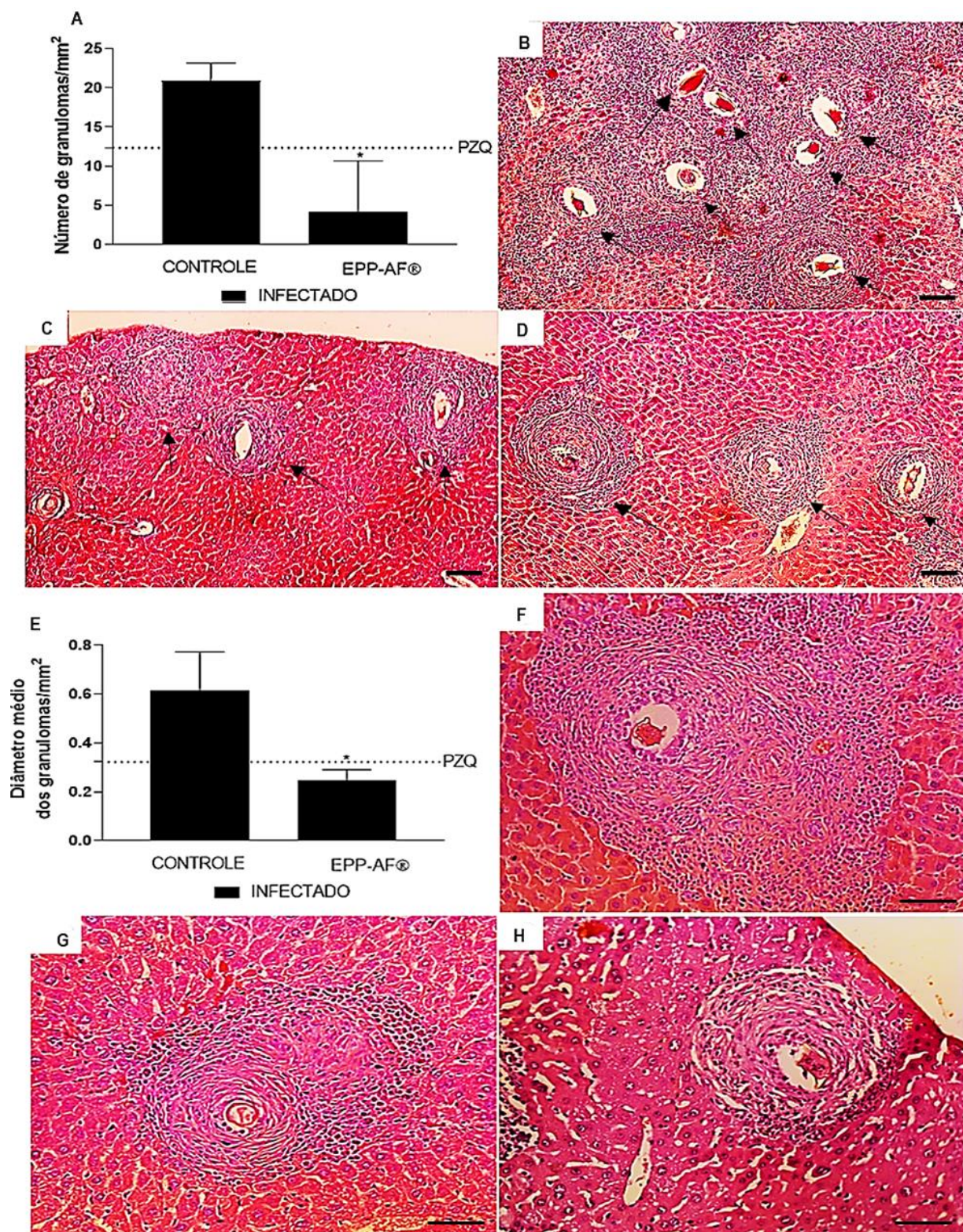
Os valores representam a média ± desvio padrão de 6 animais por grupo. <sup>@</sup> p<0.05 em comparação ao controle não infectado; \* p<0.05 em comparação ao controle infectado sem tratamento.

Os animais foram infectados e tratados por via oral com EPP-AF® (4,5 mg/kg) por 30 dias, durante a fase aguda da infecção ou tratados com Praziquantel® (50 mg/kg) nos dias 45–51 (PZQ). O controle infectado (Infestado) tinha apenas animais infectados. O controle não infectado (Não infectado) tinha animais não infectados e não tratados.

As análises histológicas revelaram que, ao final de 90 dias, o grupo tratado com EPP-AF® apresentou uma redução significativa no número de granulomas em comparação ao controle infectado (Fig. 4A). No grupo controle infectado, além do aumento no número de granulomas, observou-se uma intensificação do infiltrado celular, fibrose e danos aos hepatócitos (Fig. 4B). Nos animais infectados que receberam EPP-AF® (Fig. 4D), houve uma melhor organização dos hepatócitos, com redução do infiltrado celular e ausência de danos fibróticos. O número de granulomas nos grupos tratados com PZQ (Fig. 4C) e EPP-AF® (Fig. 4D) não apresentou diferença significativa.

Além de reduzir o número de granulomas, o EPP-AF® também diminuiu o diâmetro médio desses granulomas (Fig. 4E). Os granulomas no grupo EPP-AF® (Fig. 4H) apresentaram características distintas em relação ao controle infectado sem tratamento (Fig. 4F), como a redução no número de células ao redor dos ovos, o que contribuiu para a diminuição da área dos granulomas. O diâmetro dos granulomas nos grupos PZQ (Fig. 4G) e EPP-AF® (Fig. 4H) foi semelhante.





**Fig. 4.** Efeito do EPP-AF® sobre o número de granulomas (A) e diâmetro médio de granulomas (E) no tecido hepático de camundongos infectados com *S. mansoni*. Cortes histológicos corados com HE (40x). Em B e F, controle infectado sem tratamento. Em C e G controle PZQ, animais tratados com Praziquantel® (50 mg/kg) nos dias 45–51. Em D e H, grupo EPP-AF®, animais que receberam EPP-AF® durante 30 dias, na fase inicial da infecção. Os valores representam a média  $\pm$  desvio padrão de 6 animais por grupo. (\*)  $p < 0.05$  em comparação ao controle infectado sem tratamento. As setas indicam os granulomas no fígado.

Em relação ao intestino (Tabela 2), foi identificado aumento de todos os parâmetros avaliados no controle infectado em comparação ao controle não infectado. Ao comparar o grupo infectado com o grupo tratado com EPP-AF®, o uso de EPP-AF® na fase inicial da infecção por *S. mansoni* reduziu significativamente todos os parâmetros inflamatórios analisados. Não houve diferenças estatísticas entre os grupos tratados com PZQ e EPP-AF®.

As análises histológicas do intestino mostraram que o grupo EPP-AF® apresentou uma redução no número de granulomas em comparação ao controle infectado, que exibiu um aumento expressivo de ovos retidos, resultando em uma intensa resposta inflamatória (Fig. 5A). Os granulomas do grupo tratado com EPP-AF® apresentaram uma diminuição no diâmetro médio (Fig. 5E). Em relação à estrutura dos granulomas, os do grupo EPP-AF® (Fig. 5H) apresentaram menor quantidade de células ao redor dos ovos e menos fibras colágenas, em comparação ao controle infectado (Fig. 5F). Os grupos tratados com PZQ e EPP-AF® não apresentaram diferenças entre si.

**Tabela 2**

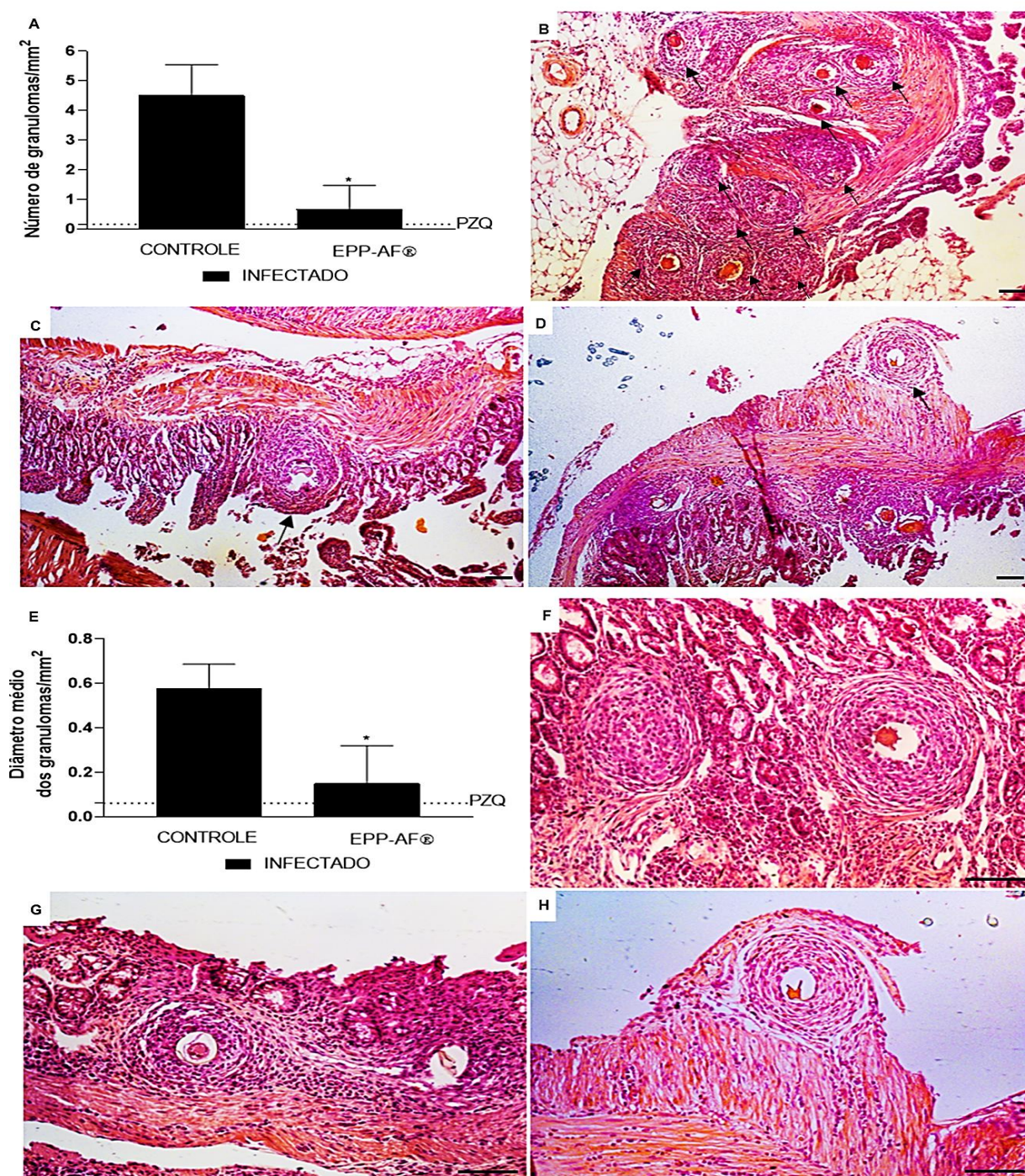
Análise histopatológica do intestino de camundongos infectados ou não por *S. mansoni*, e tratados ou não com EPP-AF®.

| Parâmetros Analisados  | Grupos        |                      |          |          |
|------------------------|---------------|----------------------|----------|----------|
|                        | NÃO INFECTADO | INFECTADO            | PZQ      | EPP-AF®  |
| Quantidade de ovos     | 0             | 3±0 <sup>@</sup>     | 0.3±0.5* | 0.6±1.0* |
| Presença de granulomas | 0             | 3±0 <sup>@</sup>     | 0.3±0.5* | 0.6±1.0* |
| Extensão do granuloma  | 0             | 1.6±0.5 <sup>@</sup> | 0.3±0.5* | 0.3±0.5* |
| Lesão tecidual         | 0             | 3±0 <sup>@</sup>     | 1.3±0.5* | 1.3±0.5* |
| Necrose                | 0             | 1,3±0.5 <sup>@</sup> | 0±0*     | 0±0*     |
| Infiltrado             | 0             | 3±0 <sup>@</sup>     | 1.6±0.5* | 2.0*     |

Os valores representam a média ± desvio padrão de 6 animais por grupo. <sup>@</sup> p<0.05 em comparação ao controle limpo; \* p<0.05 em comparação ao controle infectado sem tratamento.

Os animais foram infectados e tratados por via oral com EPP-AF® (4,5 mg/kg) por 30 dias, durante a fase aguda da infecção ou tratados com Praziquantel® (50 mg/kg) nos dias 45–51 (PZQ). O controle infectado (Infectado) tinha apenas animais infectados. O controle não infectado (Não infectado) tinha animais não infectados e não tratados.





**Fig. 5.** Efeito do EPP-AF® sobre o número de granulomas (A) e diâmetro médio de granulomas (E) em tecidos do intestino de camundongos infectados com *S. mansoni*. Cortes histológicos corados com HE (40x). Em B e F, controle infectado sem tratamento. Em C e G controle PZQ, animais tratados com Praziquantel® (50 mg/kg) nos dias 45–51. Em D e H, grupo EPP-AF®, animais que receberam EPP-AF® durante 30 dias, na fase inicial da infecção. Os valores representam a média  $\pm$  desvio padrão de 6 animais por grupo. (\*)  $p < 0.05$  em comparação ao controle infectado sem tratamento. As setas indicam os granulomas no intestino.

No rim (Tabela 3), a análise histopatológica mostrou que o controle infectado apresentou aumento em todos os parâmetros avaliados. Comparado ao controle infectado, o uso

de EPP-AF® resultou em uma redução significativa desses parâmetros, demonstrando um efeito protetor sobre o rim. Não houve diferença significativa entre os grupos tratados com PZQ e EPP-AF®, ambos apresentando resultados semelhantes.

As análises histológicas revelaram um aumento no número de granulomas e um intenso infiltrado inflamatório no grupo controle infectado (Fig. 6A). No grupo tratado com EPP-AF®, não foram encontrados granulomas, e a estrutura renal permaneceu preservada, sem alterações significativas (Fig. 6D). Da mesma forma, os grupos tratados com PZQ (Fig. 6C) e EPP-AF® (Fig. 6D) não apresentaram formação de granulomas.

Além disso, observou-se um aumento na extensão dos granulomas e danos inflamatórios no controle infectado (Fig. 6F), enquanto no grupo tratado com EPP-AF® não foram detectados granulomas (Fig. 6H). Os grupos PZQ (Fig. 6G) e EPP-AF® (Fig. 6H) apresentaram resultados semelhantes, sem a presença de granulomas.

**Tabela 3**

Análise histopatológica do rim de camundongos infectados ou não por *S. mansoni*, tratados ou não com EPP-AF®.

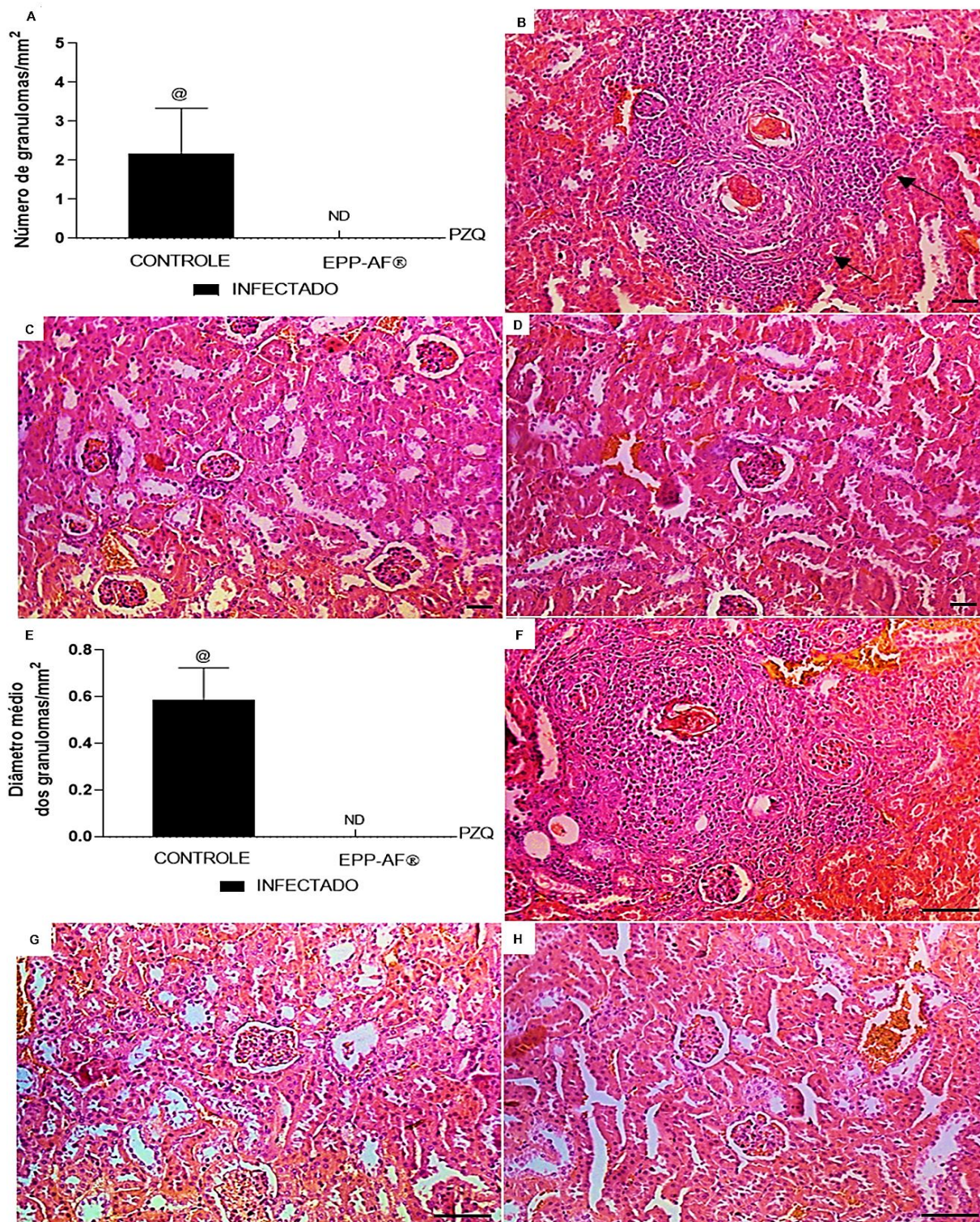
| Parâmetros Analisados   | Grupos        |                       |      |         |
|-------------------------|---------------|-----------------------|------|---------|
|                         | NÃO INFECTADO | INFECTADO             | PZQ  | EPP-AF® |
| Quantidade de ovos      | 0             | 1.3±1.0 <sup>@</sup>  | 0±0* | 0±0*    |
| Presença de granulomas  | 0             | 1.3±1.0 <sup>@</sup>  | 0±0* | 0±0*    |
| Extensão do granuloma   | 0             | 1.1±.09 <sup>@</sup>  | 0±0* | 0±0*    |
| Lesão tecidual          | 0             | 1.6±0.5 <sup>@</sup>  | 1±0* | 1±0*    |
| Necrose                 | 0             | 0,33±0.5 <sup>@</sup> | 0±0* | 0±0*    |
| Infiltrado inflamatório | 0             | 1.6±0.5 <sup>@</sup>  | 1±0* | 1.0±0*  |

Os valores representam a média ± desvio padrão de 6 animais por grupo. <sup>@</sup> p<0.05 em comparação ao controle limpo; \* p<0.05 em comparação ao controle infectado

Os animais foram infectados e tratados por via oral com EPP-AF® (4,5 mg/kg) por 30 dias, durante a fase aguda da infecção ou tratados com Praziquantel® (50 mg/kg) nos dias 45–51 (PZQ). O controle infectado



(Infectado) tinha apenas animais infectados. O controle não infectado (Não infectado) tinha animais não infectados e não tratados.



**Fig. 6.** Efeito do EPP-AF® sobre o número de granulomas (A) e diâmetro médio de granulomas (E) em tecidos do rim de camundongos infectados com *S. mansoni*. Cortes histológicos corados com HE (40x). Em B e F, controle infectado sem tratamento. Em C e G controle PZQ, animais tratados com Praziquantel® (50 mg/kg) nos dias 45–51. Em D e H, grupo EPP-AF®, animais que receberam EPP-AF® durante 30 dias, na fase inicial da infecção. Os valores representam a média  $\pm$  desvio padrão de 6 animais por grupo. (\*)  $p < 0.05$  em comparação ao controle infectado sem tratamento. As setas indicam os granulomas no rim.

### 3.4 O EPP-AF® influenciou a celularidade sanguínea ao 30 e 90 dias em camundongos infectados por *S. mansoni*

Aos 30 dias, a análise das populações leucocitárias sanguíneas (Tabela 4) revelou um aumento significativo no número de neutrófilos, linfócitos e eosinófilos no grupo controle infectado em comparação ao controle não infectado. O tratamento com EPP-AF® resultou em uma redução significativa de eosinófilos em relação ao grupo controle infectado. Ao comparar os grupos tratados com PZQ e EPP-AF®, observou-se que o EPP-AF® foi eficaz na redução de eosinófilos.

**Tabela 4**

Percentual total e diferencial de leucócitos do sangue de camundongos infectados após uso de EPP-AF® nos primeiros 30 dias

| Células Percentual (%) | Grupos        |                        |                       |                        |
|------------------------|---------------|------------------------|-----------------------|------------------------|
|                        | NÃO INFECTADO | INFECTADO              | PZQ                   | EPP-AF®                |
| Leucócitos             | 100           | 100                    | 100                   | 100                    |
| Neutrófilos            | 26.8 ±3.4     | 7.6 ±5.1 <sup>@</sup>  | 11.0 ±1.8             | 12.2 ±7.4              |
| Linfócitos             | 60.0 ±5.6     | 74.2 ±3.9 <sup>@</sup> | 68.0 ±3.9             | 54.2 ±31.9             |
| Monócitos              | 11 ±1.2       | 6.6 ±2.7               | 7.2 ±1.4              | 5.6 ±5.0               |
| Eosinófilos            | 1.4 ±1.1      | 11.6 ±2.6 <sup>@</sup> | 9.8 ±0.8 <sup>@</sup> | 3.6 ±3.5 <sup>*#</sup> |

Os valores representam a média ± desvio padrão de 6 animais por grupo. <sup>@</sup> p<0.05 em comparação ao controle não infectado. <sup>\*</sup> p<0.05 em comparação ao controle infectado sem tratamento. <sup>#</sup> p<0.05 em comparação ao controle infectado sem tratamento.

Os animais foram infectados e tratados por via oral com EPP-AF® (4,5 mg/kg) por 30 dias, durante a fase aguda da infecção ou tratados com Praziquantel® (50 mg/kg) nos dias 45–51 (PZQ). O controle infectado (Infectado) tinha apenas animais infectados. O controle não infectado (Não infectado) tinha animais não infectados e não tratados.

Aos 90 dias (Tabela 5), observou-se que, entre os grupos controle não infectado e infectado, o controle infectado apresentou um aumento no número de neutrófilos e eosinófilos, sem alteração nas populações de linfócitos e monócitos. Comparando o controle infectado com o grupo tratado com EPP-AF®, o tratamento com EPP-AF® promoveu uma redução significativa nos níveis de monócitos e eosinófilos. Não foi identificada diferença entre os grupos tratados com PZQ e EPP-AF®.

**Tabela 5**

Percentual total e diferencial de leucócitos do sangue de camundongos infectados e após a suplementação com EPP-AF® aos 90 dias

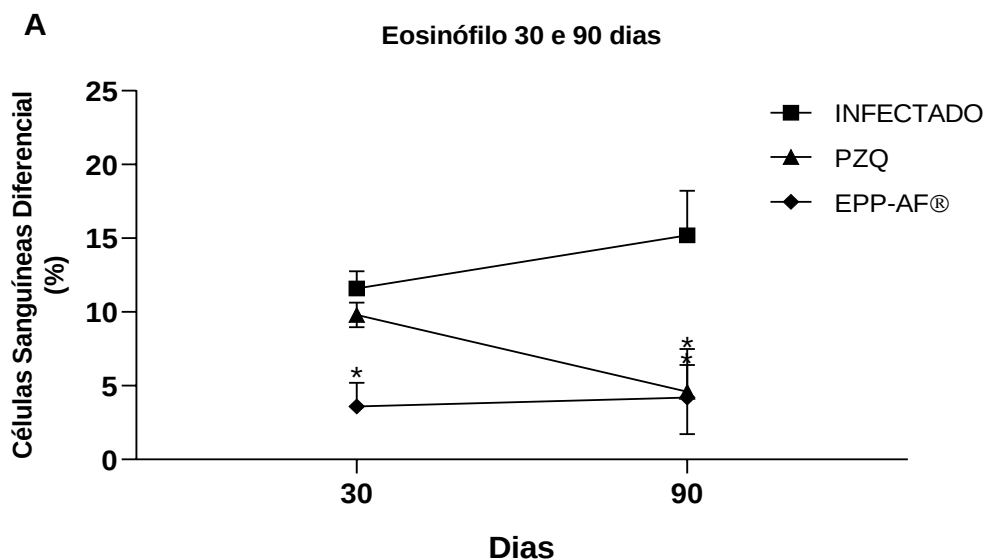
| Células<br>Percentual<br>(%) | Grupos           |            |               |            |
|------------------------------|------------------|------------|---------------|------------|
|                              | NÃO<br>INFECTADO | INFECTADO  | PZQ           | EPP-AF®    |
| Leucócitos                   | 100              | 100        | 100           | 100        |
| Neutrófilos                  | 30.6 ±5.4        | 14.4 ±2.9@ | 12.4 ±6.0     | 21.0 ±12.8 |
| Linfócitos                   | 58.2 ±2.5        | 60.6 ±4.2  | 75.2<br>±7.4* | 68.2 ±13.7 |
| Monócitos                    | 11.8 ±0.8        | 10.2 ±1.6  | 6.0 ±3.4*     | 2.2 ±1.6*  |
| Eosinófilos                  | 0.2±0.4          | 15.2 ±6.7@ | 4.6 ±2.8*     | 4.2 ±4.9*  |

Os valores representam a média ± desvio padrão de 6 animais por grupo. @ p<0.05 em comparação ao controle não infectado \* p<0.05 em comparação ao controle infectado.

Os animais foram infectados e tratados por via oral com EPP-AF® (4,5 mg/kg) por 30 dias, durante a fase aguda da infecção ou tratados com Praziquantel® (50 mg/kg) nos dias 45–51 (PZQ). O controle infectado (Infectado) tinha apenas animais infectados. O controle não infectado (Não infectado) tinha animais não infectados e não tratados.

Ao avaliar a eosinofilia sanguínea durante as fases aguda e crônica da infecção por *S. mansoni* (Fig. 7), observou-se que, entre os dias 30 e 90, o grupo tratado com EPP-AF® apresentou redução significativa na eosinofilia em ambas as fases da infecção, em comparação ao controle infectado. Quando comparados os grupos tratados com PZQ e EPP-AF®, o EPP-

AF® promoveu uma redução mais acentuada no número de eosinófilos até o 30º dia, e, ao final dos 90 dias, ambos os grupos apresentavam níveis semelhantes de eosinofilia sanguínea.



**Fig. 7.** Eosinofilia sanguínea. Percentual de eosinófilo aos 30 e 90 dias (7A). Os valores representam a média  $\pm$  desvio padrão de 6 animais por grupo. \*  $p < 0.05$  em comparação ao controle infectado. #  $p < 0.05$  em comparação ao grupo PZQ.

### 3.5 O uso de EPP-AF® reduz a celularidade da medula óssea e peritônio de camundongos infectados por *S. mansoni*

Ao avaliar a celularidade da medula óssea e do peritônio (Tabela 6), observou-se que o controle infectado apresentou um aumento significativo na celularidade em comparação ao controle não infectado e aos grupos PZQ e EPP-AF®, indicando uma indução da resposta celular durante a infecção. Entre os grupos tratados, tanto PZQ quanto EPP-AF® estimularam a celularidade na medula óssea e no peritônio, com o EPP-AF® mostrando uma capacidade de estimulação comparável à do PZQ.



**Tabela 6**

Contagem global de leucócitos da medula óssea e peritônio de camundongos após uso de EPP-AF®

| Células                             | Grupos        |                        |                        |                          |
|-------------------------------------|---------------|------------------------|------------------------|--------------------------|
|                                     | NÃO INFECTADO | INFECTADO              | PZQ                    | EPP-AF®                  |
| Medula óssea (x10 <sup>6</sup> /mL) | 1,1 ±0,2      | 15,2 ±8,0 <sup>@</sup> | 0,66±0,6*              | 6,1 ±5,8 <sup>@*#</sup>  |
| Peritônio (x10 <sup>6</sup> /mL)    | 2,8 ±0,2      | 20,3 ±4,6 <sup>@</sup> | 5,0 ±0,5* <sup>@</sup> | 8,11 ±5,2 <sup>@*#</sup> |

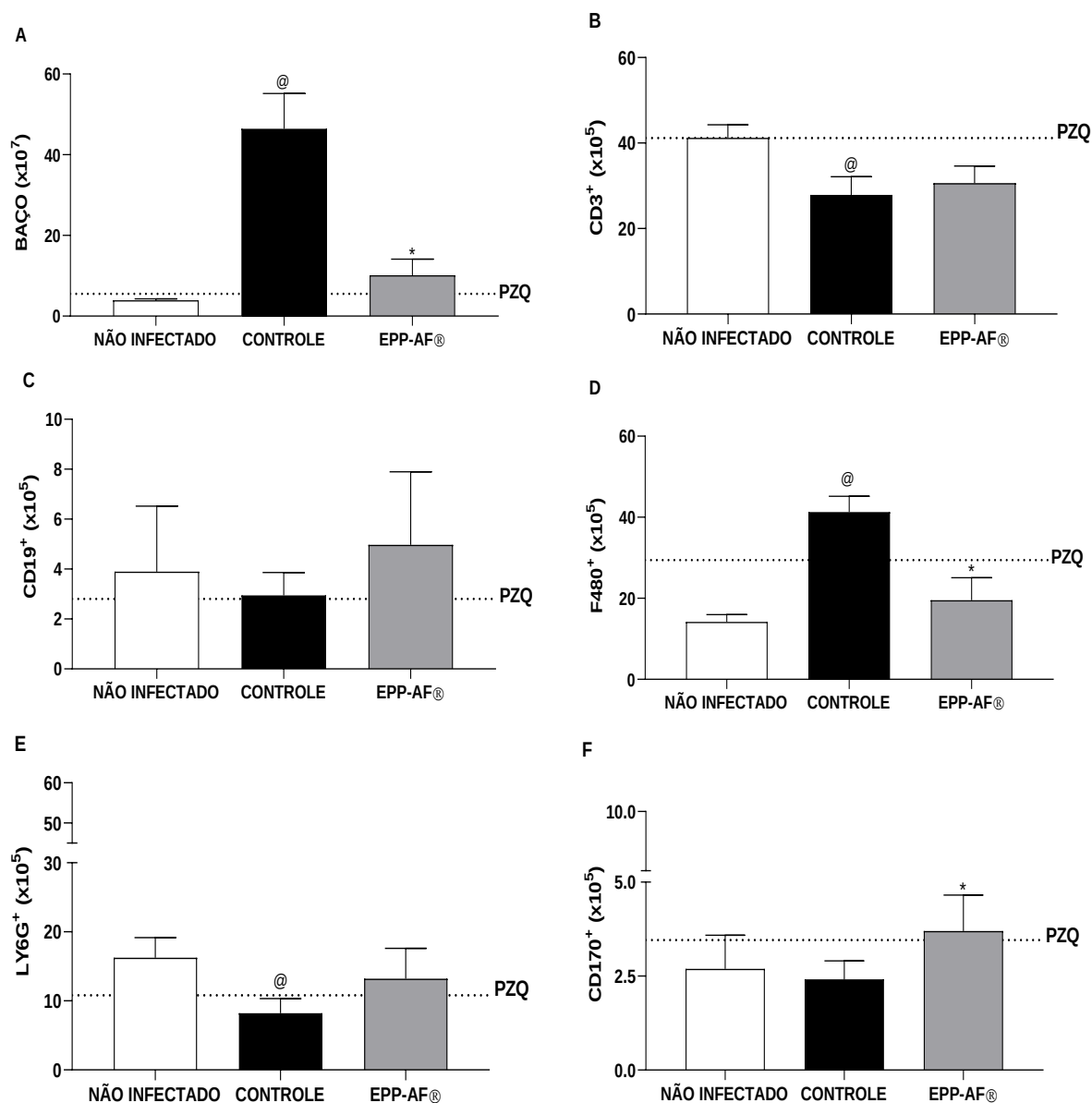
Os valores representam a média ± desvio padrão de 6 animais por grupo. @ p<0.05 em comparação ao controle não infectado; \* p<0.05 em comparação ao controle infectado sem tratamento; # p<0.05 em comparação ao controle PZQ.

Os animais foram infectados e tratados por via oral com EPP-AF® (4,5 mg/kg) por 30 dias, durante a fase aguda da infecção ou tratados com Praziquantel® (50 mg/kg) nos dias 45–51 (PZQ). O controle infectado (Infectado) tinha apenas animais infectados. O controle não infectado (Não infectado) tinha animais não infectados e não tratados.

### 3.6 O uso de EPP-AF® apresentou efeito sobre a celularidade do baço

Ao avaliar a celularidade do baço (Fig. 8A), observou-se que animais infectados sem tratamento apresentaram um aumento significativo na celularidade, semelhante ao observado na medula óssea e no peritônio. Nos grupos tratados, tanto o controle PZQ quanto o grupo EPP-AF® reduziram a celularidade em comparação ao controle infectado sem tratamento. A celularidade do baço nos grupos PZQ e EPP-AF® foi comparável entre si e similar à do controle não infectado.

A análise de fenotipagem revelou que os grupos PZQ e EPP-AF® reduziram o número de macrófagos em relação ao controle infectado, apresentando resultados semelhantes ao controle não infectado (Fig. 8D). Além disso, tanto o controle PZQ quanto o grupo EPP-AF® estimularam a presença de eosinófilos em comparação ao controle infectado (Fig. 8F). As demais populações celulares, como linfócitos (Fig. 8B), linfócitos B (Fig. 8C) e neutrófilos (Fig. 8E), não mostraram diferenças significativas entre os grupos PZQ, EPP-AF®, controle infectado sem tratamento e controle não infectado.

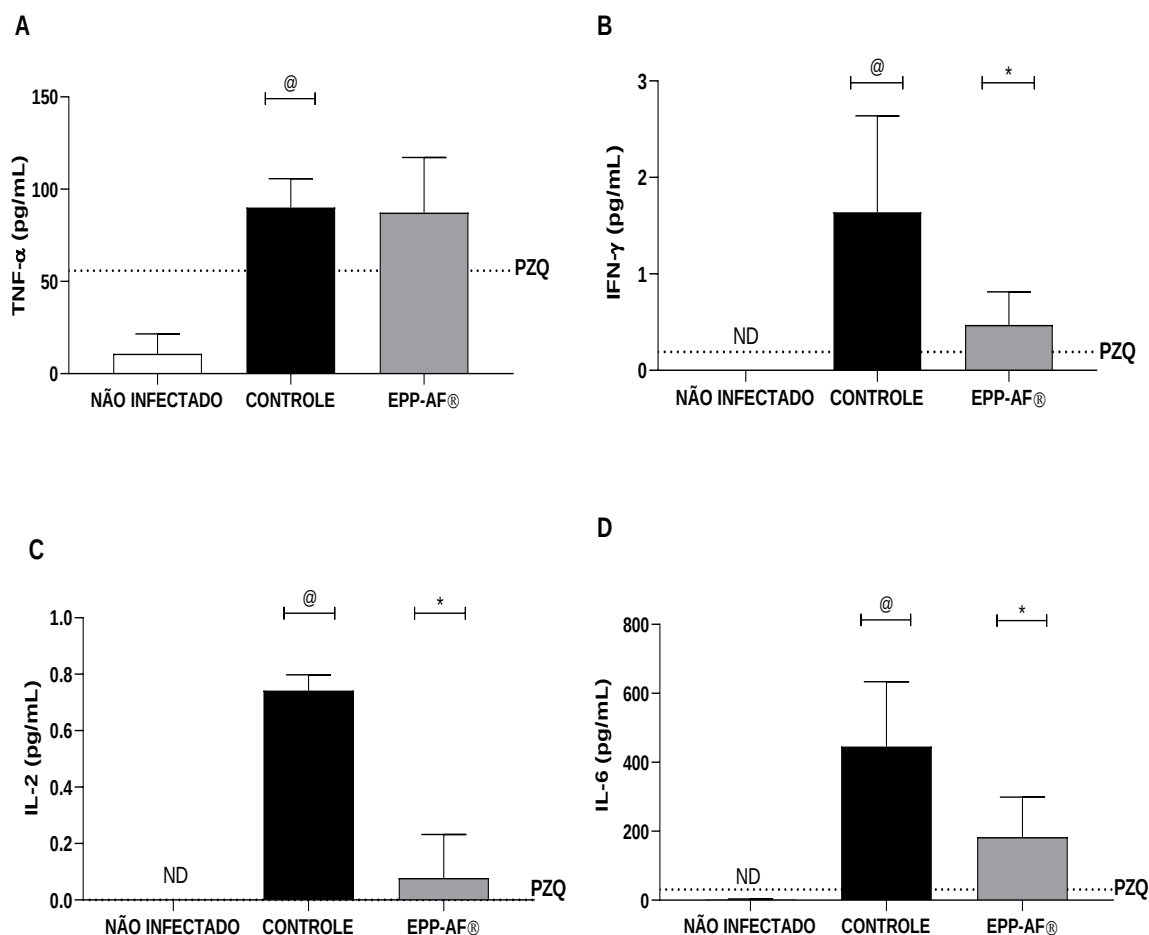


**Fig. 8.** Imunofenotipagem do baço de camundongos infectados ou não por *S. mansoni*, e tratados ou não. Celularidade do baço (A) e caracterização fenotípica de linfócitos (B), linfócitos B (C), macrófagos (D) neutrófilo (E) e eosinófilo (F). As células do baço foram obtidas A final de 90 dias pós-infecção todos os animais foram eutanasiados. Os valores representam a média  $\pm$  desvio padrão de 6 animais por grupo. (@)  $p < 0.05$  em comparação ao grupo não infectado; (\*)  $p < 0.05$  em comparação ao controle infectado.

### 3.7 Efeito do EPP-AF® sobre citocinas e quimiocina em sobrenadante da cultura de células do baço por CBA

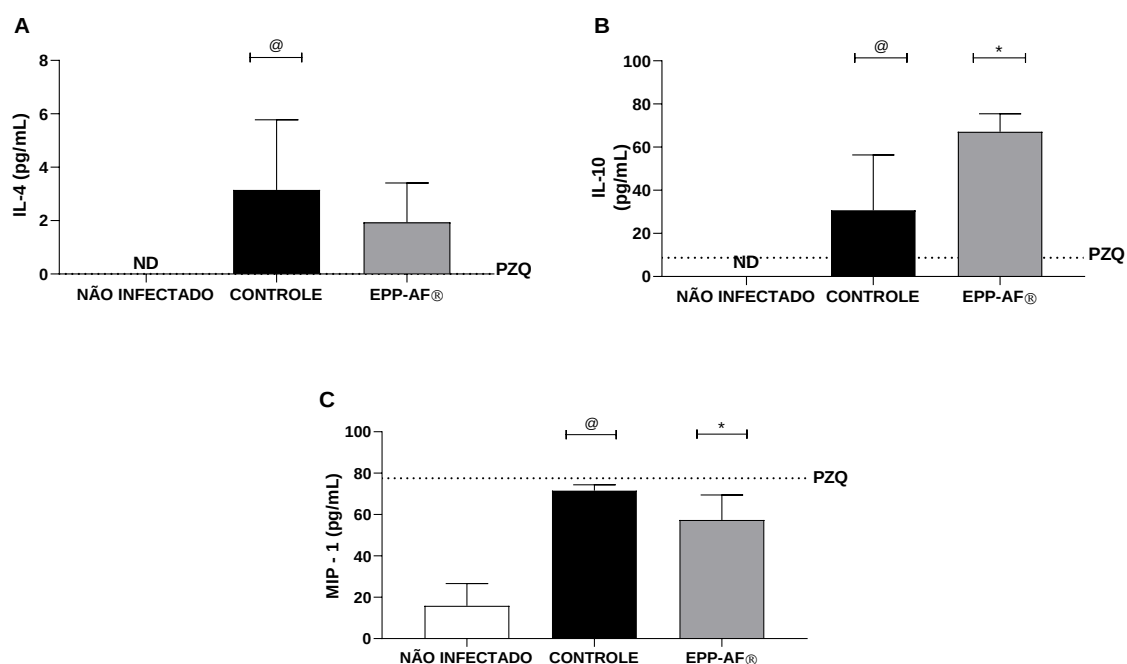
Em relação às citocinas pró-inflamatórias, os níveis de TNF- $\alpha$  (Fig. 9A), IFN- $\gamma$  (Fig. 9B), IL-2 (Fig. 9C) e IL-6 (Fig. 9D) estavam elevados no controle infectado sem tratamento, indicando uma intensa resposta inflamatória. O tratamento com EPP-AF® reduziu os níveis de

IFN- $\gamma$  (Fig. 9B), IL-2 (Fig. 9C) e IL-6 (Fig. 9D) em comparação ao controle infectado. No entanto, não foram observadas diferenças estatísticas significativas entre os grupos tratados com EPP-AF® e PZQ.



**Fig. 9.** Efeito do EPP-AF® sobre os níveis de citocinas pró-inflamatória no baço. TNF- $\alpha$  (A), IFN- $\gamma$  (B), IL-2 (C) e IL-6 (D). Os valores representam a média  $\pm$  desvio padrão de 6 animais por grupo. @  $p < 0.05$  em comparação ao grupo não infectado; \*  $p < 0.05$  em comparação ao controle infectado.

Em relação às citocina IL-4 (Fig. 10A) no controle infectado, apresentou aumento em comparação ao controle não infectado, mas não apresentando diferença entre o grupo EPP-AF®. A IL-10 (Fig. 10B) apresentou aumento no grupo tratado com EPP-AF® em comparação aos demais grupos, indicando efeito anti-inflamatório do EPP-AF®. A expressão da quimiocina MIP-1 (Fig. 10C), apresentou aumento no controle infectado em relação ao grupo não infectado. O grupo infectado que recebeu EPP-AF® apresentou redução em relação ao controle infectado e PZQ.



**Fig. 10.** Efeito do EPP-AF® sobre os níveis de citocinas anti-inflamatórias. IL-10 (A), IL-4 (B) e quimiocina MIP-1 (C) em sobrenadante de cultura de células do baço de camundongos saudáveis e infectados por *S. mansoni*. 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 INF.

#### 4. Discussão

Os resultados deste estudo demonstram que o extrato padronizado de própolis verde EPP-AF® apresenta ação anti-esquistossomótica promissora, com efeitos significativos *in vitro* quanto *in vivo*. *In vitro*, o EPP-AF® reduziu a viabilidade dos vermes de *S. mansoni*, apresentando letalidade significativa em 36 horas na concentração de 250  $\mu$ g/mL. *In vivo*, o tratamento com EPP-AF® retardou a oviposição dos vermes, reduzindo o número de ovos nas fezes e os retidos no fígado e intestino. Reduziu teciduais no fígado, intestino e renal, com redução no número e diâmetro dos granulomas e melhora na sua estrutura. Além disso, o EPP-AF® reduziu a eosinofilia e modulou a resposta inflamatória, destacando-se como uma intervenção terapêutica eficaz na esquistossomose.

Os resultados obtidos *in vitro* evidenciam que o extrato padronizado de própolis verde EPP-AF® exerce uma ação significativa sobre a viabilidade de *S. mansoni*. A concentração de 250  $\mu$ g/mL foi particularmente eficaz, resultando em letalidade dos vermes após 36 horas de exposição. Este achado é relevante, pois demonstra que o EPP-AF® pode induzir uma resposta letal em parasitas, sugerindo um potencial terapêutico considerável. Em concentrações mais

baixas, 150µg/mL, o EPP-AF® ainda apresentou uma redução significativa na viabilidade dos vermes, embora com um efeito mais gradual, alcançando 50% de viabilidade após 60 horas. Esse feito progressivo ressalta a dose-dependência do EPP-AF® e indica que, mesmo em concentrações intermediárias, o extrato possui um impacto relevante, embora menos intenso comparado à concentração mais alta. A concentração de 50µg/mL, por sua vez, mostrou uma viabilidade dos vermes superior a 50% após 60 horas, indicando que essa concentração é insuficiente para induzir um efeito letal eficaz. Este resultado é consistente com a literatura, que frequentemente relata que concentrações mais baixas de extratos naturais podem não ser adequadas para atingir a eficácia desejada em tratamentos antiparasitários.

Esses resultados estão de acordo com estudos anteriores que documentaram a atividade antiparasitária da própolis frente a infecção por *S. mansoni*. Silva et al., (2021) relataram mortalidade significativa em parasitas tratados com extrato de própolis vermelha, destacando a importância da dose e do tempo de exposição para a eficácia antiparasitária. Em seus experimentos, eles observaram que a mortalidade dos parasitas era dependente da concentração e do tempo de exposição, com efeitos positivos significativos nas concentrações de 100, 50 e 325 µg/mL.

De L Paula et al. (2022) também forneceram evidências relevantes sobre a atividade antiparasitária do extrato de própolis verde brasileira. No estudo, a exposição a concentrações de 200 µg/mL induziu 100% de mortalidade dos vermes adultos de *S. mansoni* nas primeiras 24 horas, evidenciando uma potente ação letal. Para a concentração de 100 µg/mL, foi observada uma mortalidade de 70% e 86% após 24 e 72 horas, respectivamente. Concentrações menores, como 50 e 25 µg/mL, ainda foram eficazes, resultando em viabilidades reduzidas de 55% e 47%. Além disso, os vermes expostos às concentrações de 100, 50 e 25 µg/mL mostraram incapacidade de se fixar às placas, reforçando o impacto do extrato na adesão do parasita. Entretanto, a concentração de 12 µg/mL não apresentou eficácia, com vermes ainda ativos e aderidos à parede das placas. Esses achados demonstram que, embora a própolis tenha um potencial significativo para reduzir a viabilidade e induzir mortalidade de vermes *S. mansoni*, a eficácia é altamente dependente da concentração utilizada.

Esses resultados corroboram a eficácia do EPP-AF® observada em nosso estudo e destacam a importância de otimizar as concentrações para maximizar a atividade antiparasitária. A comparação com dados da literatura confirma a robustez dos efeitos do EPP-AF® e sugere

que esse extrato pode ser uma opção promissora para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas contra a esquistossomose.

Nossos achados demonstram *in vivo* que, o EPP-AF® reduziu o número de ovos nas fezes, sendo identificado ovos nas fezes a partir do dia 50, essa redução de ovos foi vista até o durante toda a fase aguda da infecção por *S. mansoni*. Ao final de 90 dias, identificamos que uso de EPP-AF® reduziu expressivamente o número de ovos retidos no fígado e intestino, corroborando aos achados da redução de ovos excretados nas fezes, sugerindo que o efeito antiparasitário do EPP-AF® sobre *S. mansoni*. Nossos dados sugerem que o efeito na redução do número de ovos pode estar associado à letalidade de vermes juvenis e inibição da oviposição.

Em modelos experimentais *in vitro*, Silva et al., (2021), ao avaliarem o efeito da própolis sobre a oviposição, os autores demonstraram que concentrações de 25µg/mL e 6,25µg/mL apresentaram redução de 85 a 100% no número de ovos postos por pares de vermes, ao avaliarem o tegumento por microscopia eletrônica de varredura, identificaram que os vermes expostos em concentrações de 100, 50 e 25 µg/mL apresentaram ruptura tegumentar substancial, com alterações nos tubérculos espinhosos. De L Paula et al., (2022) demonstraram *in vitro* que os pares de vermes expostos nas concentrações de 200 e 100µg/mL de própolis impediu a oviposição, o que segundo os autores, este efeito está associado a morte e o desaparecer dos vermes.

A diminuição ou inibição da oviposição gera grande interesse, visto que uma das características da esquistossomose é a formação do granuloma em diversos órgãos. É estimado que 40% dos ovos tendem a ficar retidos nos tecidos do hospedeiro, sobretudo no fígado e intestino. Essa retenção de ovos induz uma potente resposta Th2, que será primordial na regulação da inflamação granulomatosa (Gryseels et al., 2006; Souza et al., 2011; Schwartz et al., 2018).

Nossos achados sobre o efeito da própolis em reduzir os ovos nas fezes e retidos nos tecidos corroboram aos achados de outros estudos, Silva et al., (2021), ao avaliarem *in vivo* o tratamento com própolis na dose de 400mg/Kg a 21 dias pós-infecção (infecção precoce) e 49 dias pós-infecção (infecção crônica) por *S. mansoni*, observaram que em ambas as fases da infecção houve redução do número de ovos nas fezes em 67,3% e 59,4%, respectivamente. Quando avaliado o número de ovos no intestino pelo método do oograma demonstraram a redução do número de ovos imaturos na infecção inicial em 54,71%, quanto na infecção crônica em 63,11% (Silva et al., 2021).

A redução de vermes e de ovos foi vista também nos estudos de Issa et al., (2007), os autores identificaram que camundongos imunossuprimidos que receberam tratamento durante 5 dias com própolis tiveram redução no número de vermes adultos em 58,28%, esquistossômulos pulmonares em 59,22%, número de ovos nas fezes em 61,8%, número de ovos no fígado e intestino 49,9% e 45,8% respectivamente. El-sisi et al. (2011), demonstraram que o tratamento com própolis na dose de 250 mg/kg reduziu significativamente o número de ovos no tecido hepático ( $2285,88 \pm 79,43^*$ ) e intestino ( $2420,75 \pm 155,89^*$ ) em comparação ao controle infectado sem tratamento (tecido hepático  $2285,88 \pm 79,43^*$  e intestino  $4447,38 \pm 376,24$  respectivamente).

Mohamed et al., (2016), ao avaliarem o tratamento com o extrato de própolis egípcia na infecção por *S. mansoni*, demonstraram o efeito do extrato na redução no número médio total de vermes assim como no número médio de vermes machos e fêmeas em comparação ao controle infectado. Sendo identificado também a redução no número de ovos no fígado em relação ao controle infectado ( $1308,57 \pm 19,18^*$  e  $1478,386 \pm 6,87$  respectivamente) e aumento no número de ovos no intestino com relação ao controle infectado ( $1200,68 \pm 19,67^*$  e  $994,66 \pm 40,9$  respectivamente). Fouad et al., (2021), investigando o efeito da própolis *in vivo* sobre *Fasciola gigantica*, após 15 dias identificaram uma redução de 54,54% no número de ovos liberados nas fezes.

Ao avaliarmos se o uso de EPP-AF® promoveria melhora no quadro clínico dos animais infectados, investigamos possíveis alterações histopatológicas. Nossos dados mostram que o EPP-AF® promoveu redução de danos inflamatórios e consequentemente da inflamação granulomatosa no fígado, intestino e rim. O controle infectado sem tratamento apresentou aumento de todos os parâmetros avaliados em relação ao grupo não infectado, Controle PZQ e ao grupo EPP-AF®. Os grupos tratados com Praziquantel e EPP-AF® apresentaram resultados semelhantes. Dados morfométricos do tecido hepático, fígado e rim mostram reduções da área e diâmetro médio de granulomas no grupo EPP-AF® em comparação ao controle infectado. Em conjunto, nossos achados demonstram efeito protetor nos órgãos do grupo EPP-AF® durante a inflamação granulomatosa por *S. mansoni*.

O efeito da própolis como hepatoprotetor durante a infecção por *S. mansoni* foi demonstrado no estudo de Mohamed et al., (2016), que identificaram que o uso de própolis na dose de 200 mg/Kg por três dias consecutivos, reduziu os danos às células hepáticas. El-Sisi et al. (2011), utilizando uma dose de 200 mg/Kg durante a 5ª a 12ª semanas pós-infecção

por *S. mansoni* identificaram a partir de exame imuno-histoquímico de cortes hepáticos que os animais apresentaram baixa expressão de colágeno tipo IV, sendo observado a presença apenas nos pericitos da vênula central e na região de ligação dos lóbulos do fígado.

Assim como a carga parasitária, biomarcadores imunológicos como leucócitos, mediadores pró e anti-inflamatórios e as imunoglobulinas são determinantes para investigações dos mecanismos imunológicos no percurso das infecções parasitárias no hospedeiro vertebrado. A uma escassez de estudos que demonstrem os mecanismos de ação da própolis envolvidos na resposta imunológica sobre helmintos.

Ao avaliarmos os mecanismos envolvidos após o uso de EPP-AF® sobre a resposta imunológica de camundongos infectados por *S. mansoni*, identificamos redução da eosinofilia sanguínea na fase aguda e crônica da infecção. De oliveira et al., (2022), demonstraram que a infecção por *S. mansoni* em camundongos BALB/c selvagens (WT) e camundongos BALB/c seletivamente deficientes para a diferenciação de eosinófilos ( $\Delta$ dblGATA) apresentaram respostas imunes distintas. Camundongos BALB/c deficientes de eosinófilos apresentaram concentrações hepáticas de citocinas reduzidas, IL-5, IL-13, IL-33, IL-17, IL-10 e TGF- $\beta$  e aumento de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , essa resposta imune foi acompanhada por redução na deposição de colágeno, maiores granulomas e danos hepáticos, além de evidenciarem maior taxa de mortalidade e expressiva carga parasitária. Em conjunto, os autores concluíram que os eosinófilos atuam na modulação da resposta imune induzida por *S. mansoni*, estabelecendo ou amplificando a resposta Th2 hepática.

Dados do nosso estudo demonstram que, o EPP-AF® reduziu a celularidade da medula óssea e peritônio em relação ao controle infectado e aumentou a celularidade em comparação aos controles não infectado e PZQ. Investigando os efeitos imunomoduladores da própolis sobre o baço de camundongos infectados por *S. mansoni*, identificamos redução da celularidade do baço no grupo PZQ e EPP-AF®. Nossos dados apontaram redução de F480<sup>+</sup> e aumento de CD170<sup>+</sup> nos grupos PZQ e EPP-AF®, as demais populações celulares não apresentaram diferença em relação aos controles não infectado e infectado.

Ao avaliarmos os níveis de citocinas pró e anti-inflamatórias no sobrenadante da cultura de esplenócitos, identificamos aumento dos níveis de TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , e IL-6 no controle infectado em comparação ao grupo não infectado. Em relação ao controle infectado sem tratamento e os grupos PZQ e EPP-AF®, ambos os grupos tratados reduziram IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-6. Quando comparado os grupos tratados (PZQ e EPP-AF®), não houve diferença



estatisticamente. Por outro lado, a citocina IL-4 não apresentou diferença entre o grupo infectado e o grupo EPP-AF®. A citocina IL-10 apresentou aumento no grupo EPP-AF® em relação aos grupos controles, infectado e PZQ. Com redução da quimiocina MIP-1 no grupo EPP-AF®.

A partir dos resultados descritos neste estudo, enfatizamos o potencial da própolis na atividade anti-esquistossomótica, modulando a resposta imunológica em benefício do hospedeiro vertebrado, com efeito na fase inicial da infecção e mantendo a resposta imunológica estimulada no decorrer da fase crônica, ocasionando redução da carga parasitária, inflamação granulomatosa, celularidade e os níveis de mediadores pró-inflamatórios e estímulo de mediador anti-inflamatório. Este estudo está entre os pioneiros em tentar elucidar o efeito da própolis sobre a resposta imunológica no curso da infecção por *S. mansoni* em modelo experimental. Além disso, provê perspectivas para futuras investigações da própolis sobre os mecanismos imunológicos na infecção por helmintos.

## 5. Conclusão

Os resultados do estudo mostram que o uso de EPP-AF® na fase inicial da infecção apresentou efeito sobre vermes adultos, reduziu o número de ovos nas fases e retidos no fígado e intestino, regulou a eosinofilia sanguínea, reduziu os danos teciduais em diversos órgãos e regulou mediadores inflamatórios. Estes resultados indicam o efeito anti-esquistossomose do EPP-AF®, apesar de não promover o impedimento da infecção, a própolis promoveu redução da intensa resposta inflamatória, ocasionando efeitos benéficos para os animais.

## Contribuições do autor

**Dos Santos V. A. F., Guerra R. N. M., Nascimento F.R.F.:** Desenho experimental, análise estatística, preparação do manuscrito.

**Dos Santos V. A. F., Licá I. C. L.:** Análise estatística.

**Dos Santos V. A. F., Guimarães S.J.A., Licá I. C. L., Frazão, G. C. C. G.:** Avaliação e análises citométricas.

**Dos Santos V. A. F., Guimarães S.J.A., Licá I. C. L., Frazão, G. C. C. G., Nogueira, R. A., Lira, M. G. S.:** Quantificação de IgE e citocinas.

**Silva L.A., Dos Santos V. A. F.:** Análises histopatológicas e morfométricas do tecido hepático.

## Agradecimentos

Os autores gostariam de agradecer às agências de fomento brasileiras FAPEMA (Fundação de Amparo à Pesquisa e ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Maranhão) pelo apoio financeiro; CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento da Pesquisa) pela bolsa de pesquisador e CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pelo apoio financeiro (código de financiamento: 001) e bolsa de estudante.

## Conflito de interesses

Os autores desta pesquisa declaram que, a pesquisa foi conduzida na ausência de quaisquer relações comerciais ou financeiras que que pudessem ser interpretadas como um potencial conflito de interesses.

## Referencias

Afrouzan, H., Zakeri, S., Abouie Mehrizi, A., Molasalehi, S., Tahghighi, A., Shokrgozar, M. A., Es-Haghi, A., Dinparast Djadid, N. 2017. Anti-Plasmodial Assessment of Four Different Iranian Propolis Extracts. *Archives of Iranian medicine*, 20(5), 270–281.

Alday-Provencio, S., Diaz, G., Rascon, L., Quintero, J., Alday, E., Robles-Zepeda, R., Garibay-Escobar, A., Astiazaran, H., Hernandez, J., & Velazquez, C. 2015. Sonoran propolis and some of its chemical constituents inhibit in vitro growth of *Giardia lamblia* trophozoites. *Planta medica*, 81(9), 742–747. <https://doi.org/10.1055/s-0035-1545982>

AlGabbani, Q., Mansour, L., Elnakady, Y. A., Al-Quraishy, S., Alomar, S., Al-Shaebi, E. M., & Abdel-Baki, A. S. 2017. In vivo assessment of the antimalarial and spleen-protective activities of the Saudi propolis methanolic extract. *Parasitology research*, 116(2), 539–547. <https://doi.org/10.1007/s00436-016-5318-5>

Alotaibi, A., Ebiloma, G. U., Williams, R., Alfayez, I. A., Natto, M. J., Alenezi, S., Siheri, W., AlQarni, M., Igoli, J. O., Fearnley, J., De Koning, H. P., & Watson, D. G. 2021. Activity of Compounds from Temperate Propolis against *Trypanosoma brucei* and *Leishmania mexicana*. *Molecules* (Basel, Switzerland), 26(13), 3912. <https://doi.org/10.3390/molecules26133912>

Bankova V. 2005. Chemical diversity of propolis and the problem of standardization. *Journal of ethnopharmacology*, 100(1-2), 114–117. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2005.05.004>

Barakat, A. M., Fadaly, H. A. M. E., Gareh, A., Abd El-Razik, K. A., Ali, F. A. Z., Saleh, A. A., Sadek, S. A. S., Dahran, N., El-Gendy, A. E. G., El-Khadragy, M. F., & Elmahallawy, E.

K. 2022. Wheat Germ Oil and Propolis Decrease Parasite Burden and Restore Marked Histopathological Changes in Liver and Lung in Mice with Chronic Toxoplasmosis. *Animal: an open access journal from MDPI*, 12(22), 3069. <https://doi.org/10.3390/ani12223069>

Cheever A. W. 1968. Conditions affecting the accuracy of potassium hydroxide digestion techniques for counting *Schistosoma mansoni* eggs in tissues. *Bulletin of the World Health Organization*, 39(2), 328–331.

Chermut, T. R., Fonseca, L., Figueiredo, N., de Oliveira Leal, V., Borges, N. A., Cardozo, L. F., Correa Leite, P. E., Alvarenga, L., Regis, B., Delgado, A., Berretta, A. A., Ribeiro-Alves, M., & Mafra, D. 2023. Effects of propolis on inflammation markers in patients undergoing hemodialysis: A randomized, double-blind controlled clinical trial. *Complementary therapies in clinical practice*, 51, 101732. <https://doi.org/10.1016/j.ctcp.2023.101732>

Cruz, G. V., Pereira, P. V., Patrício, F. J., Costa, G. C., Sousa, S. M., Frazão, J. B., Aragão-Filho, W. C., Maciel, M. C., Silva, L. A., Amaral, F. M., Barroqueiro, E. S., Guerra, R. N., & Nascimento, F. R. 2007. Increase of cellular recruitment, phagocytosis ability and nitric oxide production induced by hydroalcoholic extract from *Chenopodium ambrosioides* leaves. *Journal of ethnopharmacology*, 111(1), 148–154. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2006.11.006>

Cupit, P. M., & Cunningham, C. 2015. What is the mechanism of action of praziquantel and how might resistance strike?. *Future medicinal chemistry*, 7(6), 701–705. <https://doi.org/10.4155/fmc.15.11>

de L Paula, L. A., Santos, M. F. C., Pagotti, M. C., Veneziani, R. C. S., Bastos, J. K., Caffrey, C. R., Ambrósio, S. R., & Magalhães, L. G. 2022. Brazilian green propolis reduces worm burden and hepatic granuloma formation in a *Schistosoma mansoni* experimental murine model. *Parasitology research*, 121(2), 775–780. <https://doi.org/10.1007/s00436-021-07408-0>

de Oliveira, V. G., Rodrigues, V. F., Moreira, J. M. P., Rodrigues, J. L., Maggi, L., Resende, S. D., & Negrão-Corrêa, D. 2022. Eosinophils participate in modulation of liver immune response and tissue damage induced by *Schistosoma mansoni* infection in mice. *Cytokine*, 149, 155701. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2021.155701>

Doenhoff, M. J., Cioli, D., & Utzinger, J. 2008. Praziquantel: mechanisms of action, resistance and new derivatives for schistosomiasis. *Current opinion in infectious diseases*, 21(6), 659–667. <https://doi.org/10.1097/QCO.0b013e328318978f>

El-Sisi A., Awara W., El-Masry T., El-Kowrany S., El-Gharbawy R. 2011. Effects and mechanism of action of immunomodulating agents against schistosomiasis-induced hepatic inflammation and fibrosis in mice. *Research in Pharmaceutical Biotechnology*, 3(4), 32-4.

Fiorini, A. C., Scorza, C. A., de Almeida, A. G., Fonseca, M. C. M., Finsterer, J., Fonseca, F. L. A., & Scorza, F. A. 2021. Antiviral activity of Brazilian Green Propolis extract against SARS-CoV-2 (Severe Acute Respiratory Syndrome - Coronavirus 2) infection: case report and review. *Clinics (Sao Paulo, Brazil)*, 76, e2357. <https://doi.org/10.6061/clinics/2021/e2357>

- Fouad, E. A., Toaleb, N. I., Hassan, S. E., El Shanawany, E. E., Keshta, H. G., Abdel-Rahman, E. H., & Hegazi, A. G. 2021. Evaluation of the therapeutic effect of propolis on *Fasciola gigantica* and *Clostridium novyi* type B infections in sheep. *Tropical biomedicine*, 38(2), 102–110. <https://doi.org/10.47665/tb.38.2.041>
- Gray, D. J., Ross, A. G., Li, Y. S., McManus, D. P. 2011. Diagnosis and management of schistosomiasis. *BMJ (Clinical research ed.)*, 342, d2651. <https://doi.org/10.1136/bmj.d2651>
- Gryseels, B., Polman, K., Clerinx, J., Kestens, L. 2006. Human schistosomiasis. *Lancet* (London, England), 368(9541), 1106–1118. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(06\)69440-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(06)69440-3)
- Hams, E., Aviello, G., Fallon, P. G. 2013. The schistosoma granuloma: friend or foe?. *Frontiers in immunology*, 4, 89. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2013.00089>
- Horiuchi, A., Satou, T., Akao, N., Koike, K., Fujita, K., & Nikaido, T. 2005. The effect of free and polyethylene glycol-liposome-entrapped albendazole on larval mobility and number in *Toxocara canis* infected mice. *Veterinary parasitology*, 129(1-2), 83–87. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2004.12.017>
- Igarashi, G., Segawa, T., Akiyama, N., Nishino, T., Ito, T., Tachimoto, H., & Urashima, M. 2019. Efficacy of Brazilian Propolis Supplementation for Japanese Lactating Women for Atopic Sensitization and Nonspecific Symptoms in Their Offspring: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial. *Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM*, 2019, 8647205. <https://doi.org/10.1155/2019/8647205>
- Issa R.M. 2007. "*Schistosoma mansoni*: The prophylactic and curative effects of propolis in experimentally infected mice." *Rawal Med J.* 32 (2007): 94-98.
- Kwon M.J., Shin H.M., Perumalsamy H., Wang X., Ahn Y.J. 2020. Antiviral effects and possible mechanisms of action of Brazilian propolis constituents and related compounds. *J. Apic. Res.* 59:413–425.
- Lescano, S. Z., Chieffi, P. P., Canhassi, R. R., Boulos, M., Amato Neto, V. 2004. Atividade antiparasitária do artemeter na esquistossomose mansônica experimental [Antischistosomal activity of artemether in experimental *Schistosomiasis mansoni*]. *Revista de saúde pública*, 38(1), 71–75. <https://doi.org/10.1590/s0034-89102004000100010>
- Liberio, S. A., Pereira, A. L., Dutra, R. P., Reis, A. S., Araújo, M. J., Mattar, N. S., Silva, L. A., Ribeiro, M. N., Nascimento, F. R., Guerra, R. N., & Monteiro-Neto, V. (2011). Antimicrobial activity against oral pathogens and immunomodulatory effects and toxicity of geopropolis produced by the stingless bee *Melipona fasciculata* Smith. *BMC complementary and alternative medicine*, 11, 108. <https://doi.org/10.1186/1472-6882-11-108>
- Licá, I. C. L., Frazão, G. C. C. G., Nogueira, R. A., Lira, M. G. S., Dos Santos, V. A. F., Rodrigues, J. G. M., Miranda, G. S., Carvalho, R. C., Silva, L. A., Guerra, R. N. M., & Nascimento, F. R. F. (2023). Immunological mechanisms involved in macrophage activation and polarization in schistosomiasis. *Parasitology*, 150(5), 401–415. <https://doi.org/10.1017/S0031182023000021>

LoVerde P.T. 2019. Schistosomiasis. *Advances in experimental medicine and biology*, 1154, 45–70. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-18616-6\\_3](https://doi.org/10.1007/978-3-030-18616-6_3)

Maciel, M. C., Fialho, E. M., Guerra, R. N., Borges, V. M., Kwasniewski, F. H., Nascimento, F. R. 2014. *Tityus serrulatus* scorpion venom improves survival and lung inflammation in lethal sepsis induced by CLP in mice. *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology*, 89, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2014.06.018>

McManus, D. P., Dunne, D. W., Sacko, M., Utzinger, J., Vennervald, B. J., & Zhou, X. N. 2018. Schistosomiasis. *Nature reviews. Disease primers*, 4(1), 13. <https://doi.org/10.1038/s41572-018-0013-8>

Mohamed, A. H., Hassab El-Nabi, S. E., Bayomi, A. E., & Abdelaal, A. A. 2016. Effect of bee venom or propolis on molecular and parasitological aspects of *Schistosoma mansoni* infected mice. *Journal of parasitic diseases : official organ of the Indian Society for Parasitology*, 40(2), 390–400. <https://doi.org/10.1007/s12639-014-0516-5>

Negrão-Corrêa, D., Souza, D. G., Pinho, V., Barsante, M. M., Souza, A. L., & Teixeira, M. M. 2004. Platelet-activating factor receptor deficiency delays elimination of adult worms but reduces fecundity in *Strongyloides venezuelensis*-infected mice. *Infection and immunity*, 72(2), 1135–1142. <https://doi.org/10.1128/IAI.72.2.1135-1142.2004>

Oliveira, A. S., Nascimento, J. R., Trovão, L. O., Alves, P. C. S., Maciel, M. C. G., Silva, L. D. M., Marques, A. A., Santos, A. P. S. A., Silva, L. A., Nascimento, F. R. F., Guerra, R. N. M. 2019. The anti-inflammatory activity of *Anacardium occidentale* L. increases the lifespan of diabetic mice with lethal sepsis. *Journal of ethnopharmacology*, 236, 345–353. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2019.03.014>

Pahlavani, N., Malekahmadi, M., Sedaghat, A., Rostami, A., Alkadir, O. K. A., Taifi, A., Ranjbar, G., Sahebkar, A., Abdelbasset, W. K., Beigmohammadi, M. T., Mir, M., Bagheri Moghaddam, A., Tabesh, H., Sadeghi, O., Gholizadeh Navashenaq, J., Firouzi, S., Fathi Najafi, M., Safarian, M., & Ghayour-Mobarhan, M. 2022. Effects of Melatonin and Propolis Supplementation on Inflammation, Oxidative Stress, and Clinical Outcomes in Patients with Primary Pneumosepsis: A Randomized Controlled Clinical Trial. *Auswirkungen der Melatonin- und Propolis-Supplementierung auf das Entzündungsgeschehen, den oxidativen Stress und die klinischen Ergebnisse bei Patienten mit primärer Pneumosepsis: Eine randomisierte kontrollierte klinische Studie. Complementary medicine research*, 29(4), 275–285. <https://doi.org/10.1159/000523766>

Schwartz, C., Fallon, P. G. 2018. *Schistosoma* "Eggs-Itting" the Host: Granuloma Formation and Egg Excretion. *Frontiers in immunology*, 9, 2492. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02492>

Seto, E. Y., Wong, B. K., Lu, D., & Zhong, B. 2011. Human schistosomiasis resistance to praziquantel in China: should we be worried?. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 85(1), 74–82. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2011.10-0542>

- Silva, M. P., Silva, T. M., Mengarda, A. C., Salvadori, M. C., Teixeira, F. S., Alencar, S. M., Luz Filho, G. C., Bueno-Silva, B., & de Moraes, J. 2021. 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. *Journal of ethnopharmacology*, 264, 113387. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.113387>
- Silva, M. P., Silva, T. M., Mengarda, A. C., Salvadori, M. C., Teixeira, F. S., Alencar, S. M., Luz Filho, G. C., Bueno-Silva, B., de Moraes, J. 2021. 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. *Journal of ethnopharmacology*, 264, 113387. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.113387>
- Simoben, C. V., Ntie-Kang, F., Akone, S. H., & Sippl, W. 2018. Compounds from African Medicinal Plants with Activities Against Selected Parasitic Diseases: Schistosomiasis, Trypanosomiasis and Leishmaniasis. *Natural products and bioprospecting*, 8(3), 151–169. <https://doi.org/10.1007/s13659-018-0165-y>
- Souza, F. P. C., Vitorino, R. R., Costa, A. P., Júnior, F., Santana, L., & Gomes, A. 2011. Schistosomiasis mansoni: general aspects, immunology, pathogenesis and natural history. *Rev Bras Clin Med*, 9(4), 300-7.
- Tasca, K. I., Conte, F. L., Correa, C. R., Santiago, K. B., Cardoso, E. O., Manfio, V. M., Garcia, J. L., Berretta, A. A., Sartori, A. A., Honório, M. D. S., Souza, L. D. R., Sforcin, J. M. 2023. Propolis consumption by asymptomatic HIV-individuals: Better redox state? A prospective, randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*, 162, 114626. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2023.114626>
- Turner, J. D., Jenkins, G. R., Hogg, K. G., Aynsley, S. A., Paveley, R. A., Cook, P. C., Coles, M. C., & Mountford, A. P. 2011. CD4+CD25+ regulatory cells contribute to the regulation of colonic Th2 granulomatous pathology caused by schistosome infection. *PLoS neglected tropical diseases*, 5(8), e1269. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001269>
- Vale, N., Gouveia, M. J., Rinaldi, G., Brindley, P. J., Gärtner, F., Correia da Costa, J. M. 2017. Praziquantel for Schistosomiasis: Single-Drug Metabolism Revisited, Mode of Action, and Resistance. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 61(5), e02582-16. <https://doi.org/10.1128/AAC.02582-16>
- Wang, W., Wang, L., Liang, Y. S. 2012. Susceptibility or resistance of praziquantel in human schistosomiasis: a review. *Parasitology research*, 111(5), 1871–1877. <https://doi.org/10.1007/s00436-012-3151-z>
- Wang, X., Yu, D., Li, C., Zhan, T., Zhang, T., Ma, H., Xu, J., & Xia, C. 2019. In vitro and in vivo activities of DW-3-15, a commercial praziquantel derivative, against *Schistosoma japonicum*. *Parasites & vectors*, 12(1), 199. <https://doi.org/10.1186/s13071-019-3442-7>
- WHO – WORLD HEALTH ORGANIZATION. Schistosomiasis: Fact sheet. 2018. [https://www.who.int/health-topics/schistosomiasis#tab=tab\\_1](https://www.who.int/health-topics/schistosomiasis#tab=tab_1) > Acesso em 06 de maio de 2020.

Yang, Q., Wang, B., Yu, H., Zhu, Y., Wang, X., Jiang, H., Wang, C., Peng, J., & Hou, M. 2011. TLR7 promotes Th1 polarization in immune thrombocytopenia. *Thrombosis research*, 128(3), 237–242. <https://doi.org/10.1016/j.thromres.2011.02.024>

Zingue, S., Maxeiner, S., Rutz, J., Ndinteh, D. T., Chun, F. K., Fohouo, F. T., Njamen, D., Blaheta, R. A. 2020. Ethanol-extracted Cameroonian propolis: Antiproliferative effects and potential mechanism of action in prostate cancer. *Andrologia*, 52(9), e13698. <https://doi.org/10.1111/and.13698>

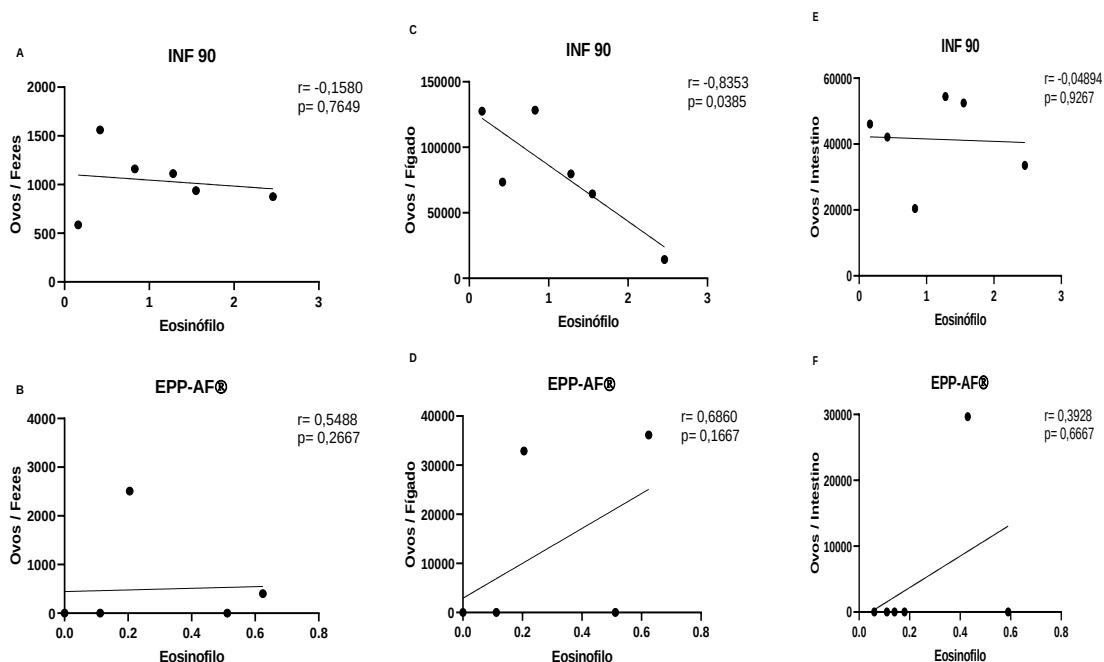
### 4.3 DADOS COMPLEMENTARES

#### 4.3.1 Correlações entre a eosinofilia sanguínea, mediadores inflamatórios sistêmicos e IgE sérica com o número de ovos nas fezes, fígado, intestino e o número e área de granulomas de camundongos infectados por *S. mansoni* e suplementados com Extrato padronizado de própolis, extrato das folhas de *Dhyspahina ambrosioides* e da sua associação com Praziquantel

Correlações grupo infectado e grupo suplementado com EPP-AF®

Na fase crônica da infecção por *S. mansoni*, a eosinofilia sanguínea está correlacionada a quantidade de ovos no fígado, não apresentando correlação com ovos nas fezes, intestino e ao número e área de granulomas hepáticos

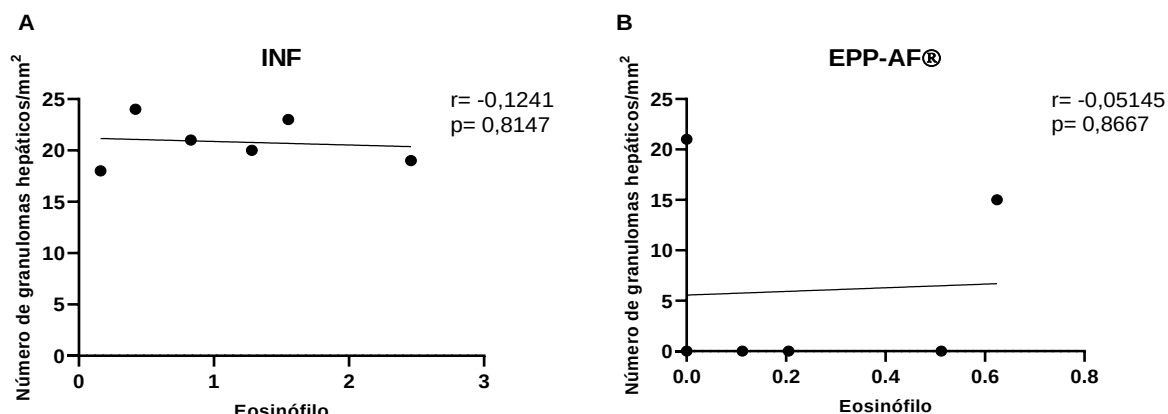
A análise de Pearson foi aplicada a fim de observar correlação positiva e negativa entre as variáveis eosinófilo - ovo fezes (Figura 1 A-B) eosinófilo - ovo fígado (Figura 1 C-D), eosinófilo – ovo intestino (Figura 1 E-F). Após o cruzamento das variáveis foi identificada apenas uma correlação, correspondente entre o número de eosinófilos do sangue e o número de ovos no fígado do controle INF90 (Figura 1C).



**Figura 1: Correlações eosinófilo e ovos fezes INF (A) e EPP-AF® (B), Correlações eosinófilo e ovos fígado INF (C) e EPP-AF® (D), Correlações eosinófilo e ovos intestino INF (E) e EPP-AF® (F). Análise de correlação de Pearson para todas as correlações. Os valores representam a média  $\pm$  desvio padrão de 6 animais por grupo  $p < 0.05$**



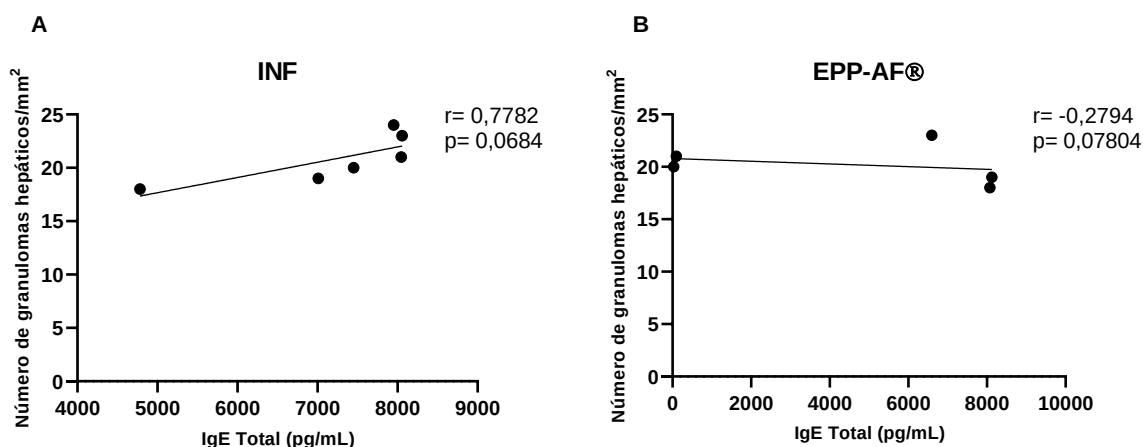
Quando avaliado as correlações entre o número de eosinófilo e com o número e área dos granulomas hepáticos, não foi identificado qualquer tipo de correlação (Figura 2).



**Figura 2: Correlações eosinófilo e número de granulomas hepáticos INF (A) EPP-AF® (B) e área de granuloma hepático INF (A) EPP-AF® (B) Análise de correlação de Pearson para todas as correlações. Os valores representam a média  $\pm$  desvio padrão de 6 animais por grupo  $p < 0.05$**

**Na fase crônica da infecção por *S. mansoni*, o número de granulomas hepáticos não apresentou correlações com a concentração de IgE**

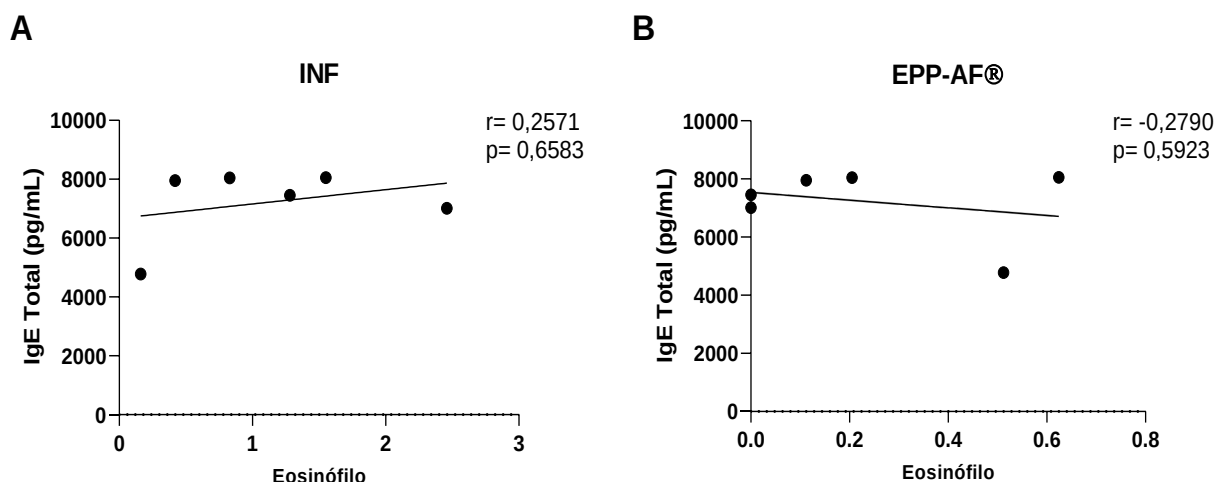
Ao se avaliar as correlações entre o número de granuloma com a IgE, não identificamos correlações nesta análise (Figura 3).



**Figura 3: Correlações entre o número de granulomas hepáticos e IgE total. INF (A) EPP-AF® (B). Análise de correlação de Pearson para todas as correlações. Os valores representam a média  $\pm$  desvio padrão de 6 animais por grupo  $p < 0.05$**

### Na fase crônica da infecção por *S. mansoni*, a concentração de IgE e o número de eosinófilos não apresentou correlações

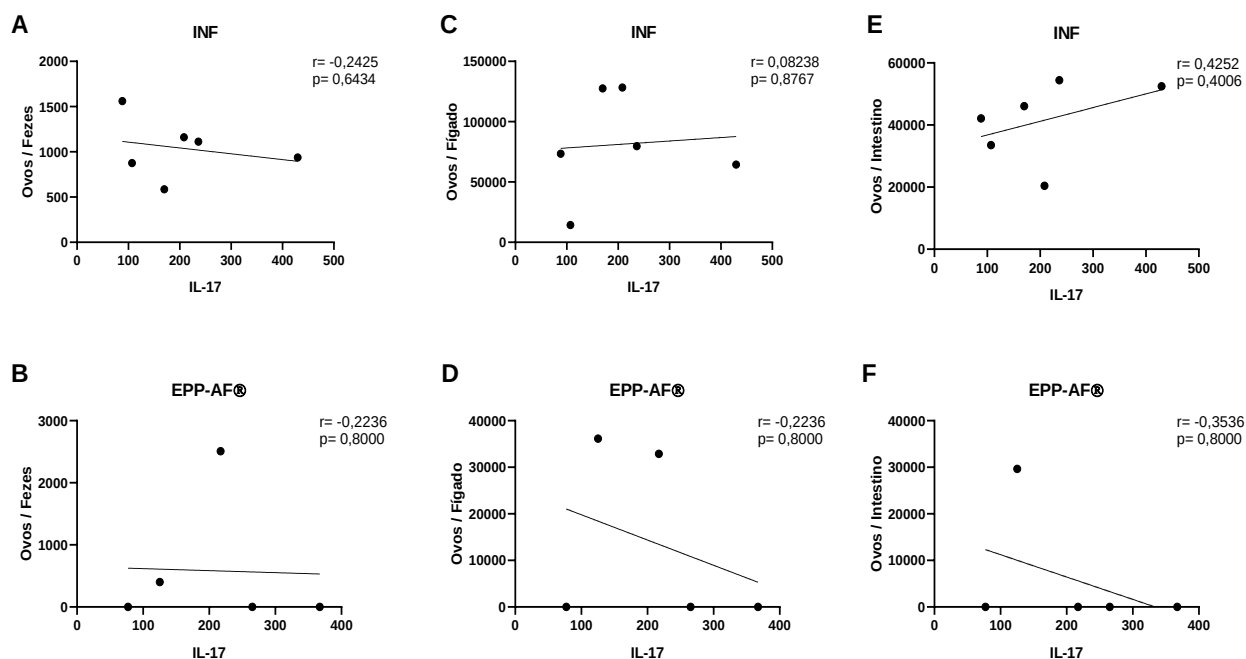
A análise de Pearson foi aplicada para avaliar possíveis correlações positivas ou negativas entre as variáveis IgE com relação a eosinófilo, entre as variáveis não apresentaram correlações (Figura 4)



**Figura 4: Correlações entre IgE total e eosinófilo. INF (A) EPP-AF® (B).** Análise de correlação de Pearson para todas as correlações. Os valores representam a média  $\pm$  desvio padrão de 6 animais por grupo  $p < 0.05$

### Correlação de citocinas do soro com o número de ovos nas fezes, fígado e intestino

A análise de Pearson foi aplicada a fim de observar correlação positiva e negativa entre as variáveis IL-17 - ovo fezes (Figura 5 A-B) Il-17 - ovo fígado (Figura 5 C-D) e IL-17 – ovo intestino (Figura 5 E-F). Após o cruzamento das variáveis não foram identificadas nenhuma correlação. Este mesmo achado foi identificado para as correlações de IL-10 com ovos fezes, fígado ou intestino, dados não apresentados.

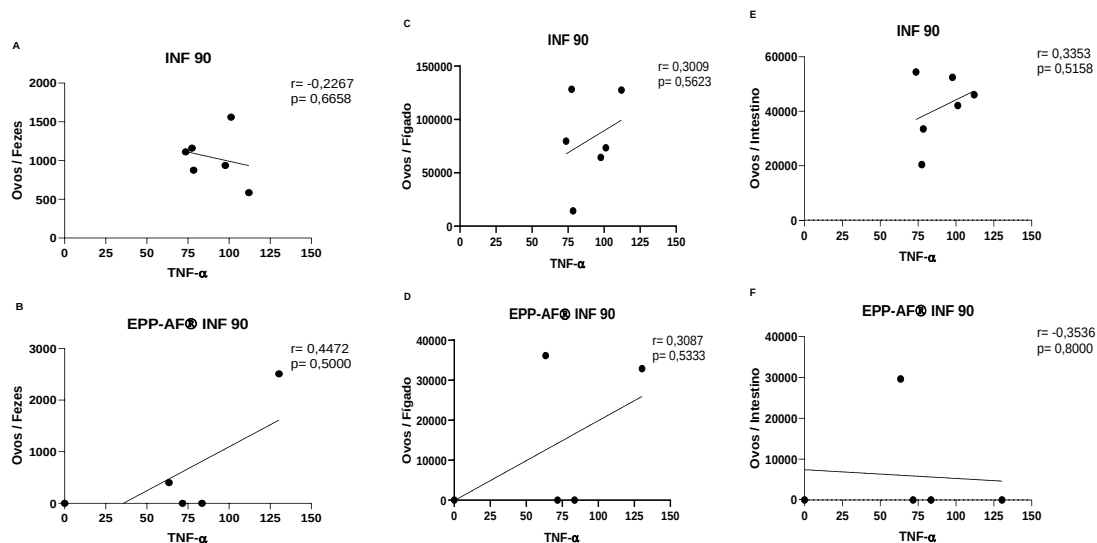


**Figura 5: Correlações IL-17 e ovos fezes INF (A) e EPP-AF® (B), correlações IL-17 e ovos fígado INF (C) e EPP-AF® (D), correlações IL-17 e ovos intestino INF (E) e EPP-AF® (F).** Análise de correlação de Pearson para todas as correlações. Os valores representam a média  $\pm$  desvio padrão de 6 animais por grupo  $p < 0,05$

### Correlações entre as citocinas avaliadas no baço com o número de ovos nas fezes, fígado e intestino

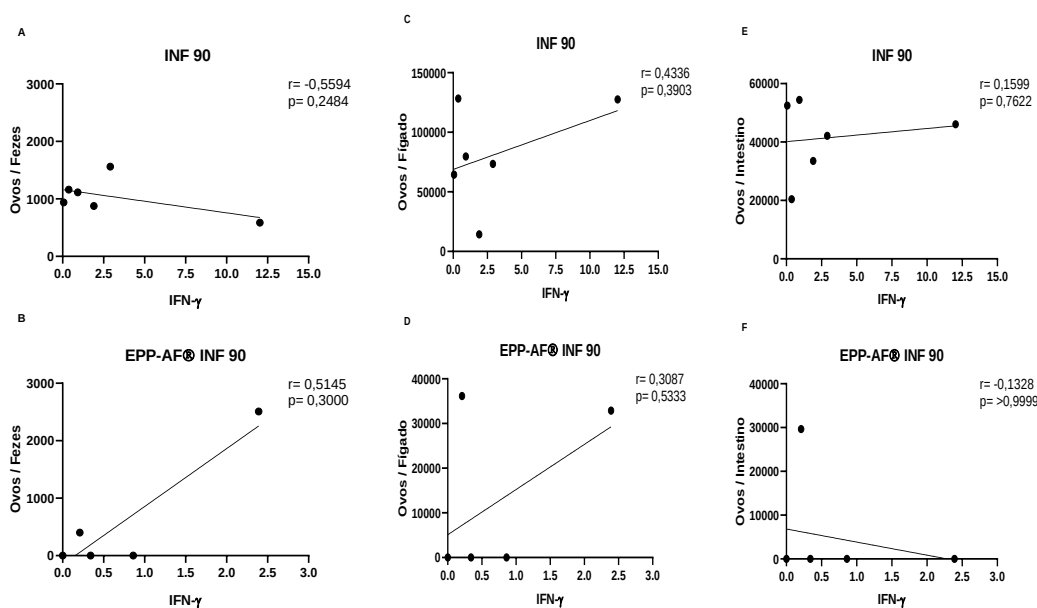
A análise de Pearson foi aplicada a fim de observar as possíveis correlações positiva e negativa entre as variáveis citocinas TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-6, IL-10, IL-4, IL-17 e MIP-1 com as variáveis ovo fezes, ovo fígado e ovo intestino. Estas correlações foram observadas para o grupo INF e EPP-AF® INF. Após o cruzamento das variáveis não foram identificadas nenhuma correlação. Gráficos das correlações entre IL-6, IL-10, IL-4, IL-17 e MIP-1 e ovos fezes, fígado e intestino não apresentados.

Correlações entre TNF- $\alpha$  e ovos nas fezes (Figura 6 A-B), TNF- $\alpha$  e ovos fígado (Figura 6 C-D) e TNF- $\alpha$  e ovos intestino (Figura 6 E-F).



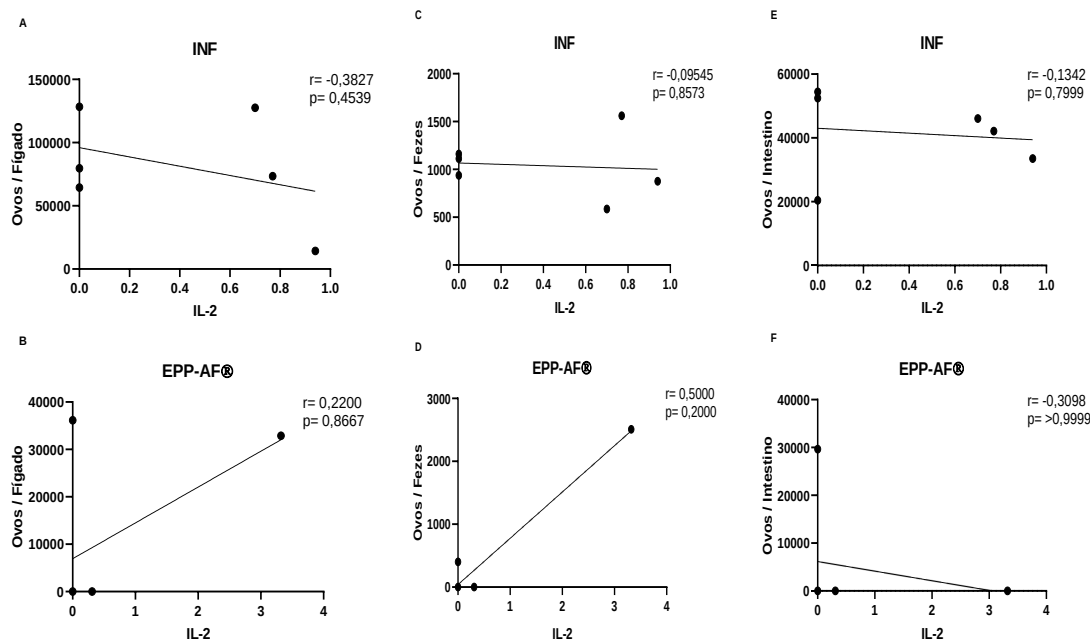
**Figura 6: Correlações TNF- $\alpha$  e ovos fezes INF (A) e EPP-AF® (B), correlações TNF- $\alpha$  e ovos fígado INF (C) e EPP-AF® (D), correlações TNF- $\alpha$  e ovos intestino INF (E) e EPP-AF® (F). Análise de correlação de Pearson para todas as correlações. Os valores representam a média  $\pm$  desvio padrão de 6 animais por grupo  $p < 0,05$**

Correlações entre IFN- $\gamma$  e ovos nas fezes (Figura 7 A-B), IFN- $\gamma$  e ovos fígado (Figura 7 C-D) e IFN- $\gamma$  e ovos intestino (Figura 7 E-F).



**Figura 7: Correlações IFN- $\gamma$  e ovos fezes INF (A) e EPP-AF® (B), correlações IFN- $\gamma$  e ovos fígado INF (C) e EPP-AF® (D), correlações IFN- $\gamma$  e ovos intestino INF (E) e EPP-AF® (F). Análise de correlação de Pearson para todas as correlações. Os valores representam a média  $\pm$  desvio padrão de 6 animais por grupo  $p < 0,05$**

Correlações entre IL-2 e ovos nas fezes (Figura 8 A-B), IL-2 e ovos fígado (Figura 8 C-D) e IL-2 e ovos intestino (Figura 8 E-F).

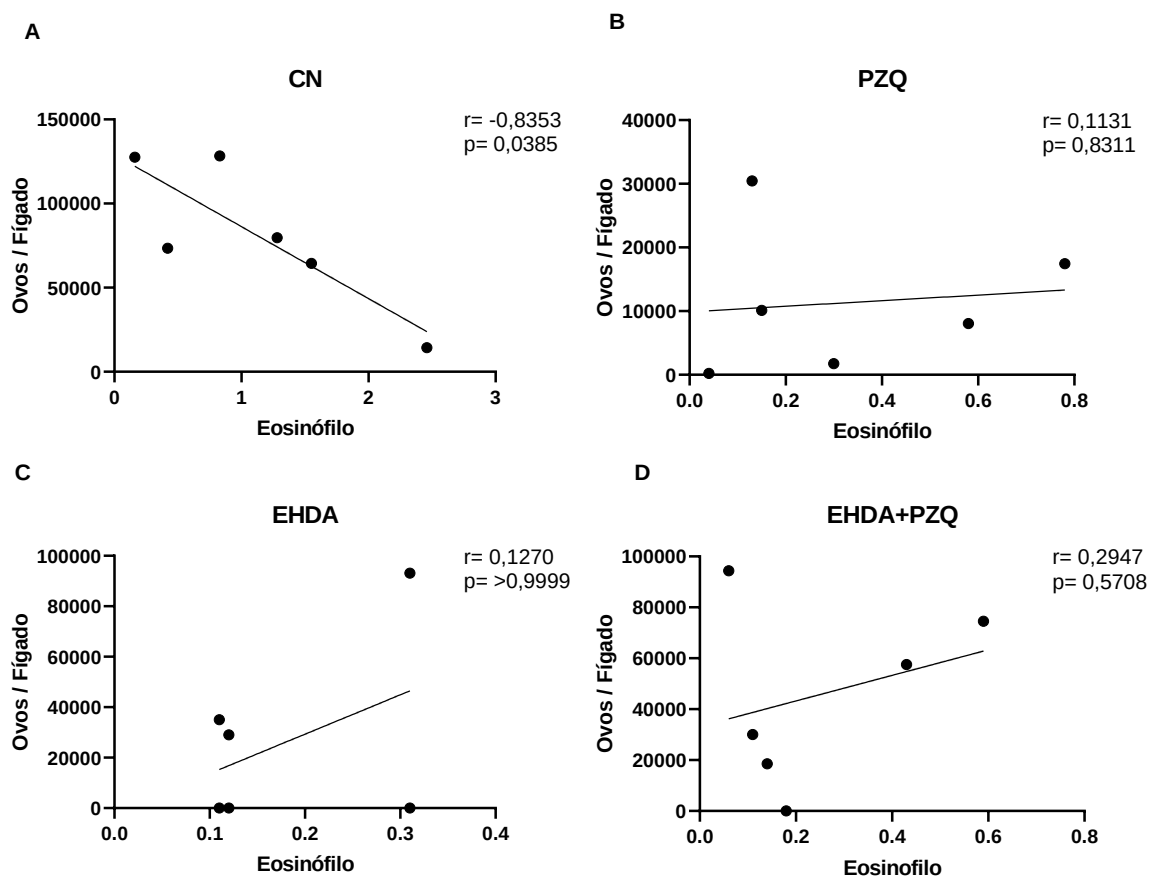


**Figura 8:** Correlações IL-2 e ovos fezes INF (A) e EPP-AF® (B), correlações IL-2 e ovos fígado INF (C) e EPP-AF® (D), correlações IL-2 e ovos intestino INF (E) e EPP-AF® (F). Análise de correlação de Pearson para todas as correlações. Os valores representam a média  $\pm$  desvio padrão de 6 animais por grupo  $p < 0.05$

### Correlações grupo infectado e os grupos EHDA e associação (EHDA+PZQ)

**Correlações de eosinófilos com a presença de ovos nas fezes, fígado e intestino do dia 90 em animais tratados com EHDA ou em associação com PZQ (EHDA+PZQ) e em animais infectados sem tratamento**

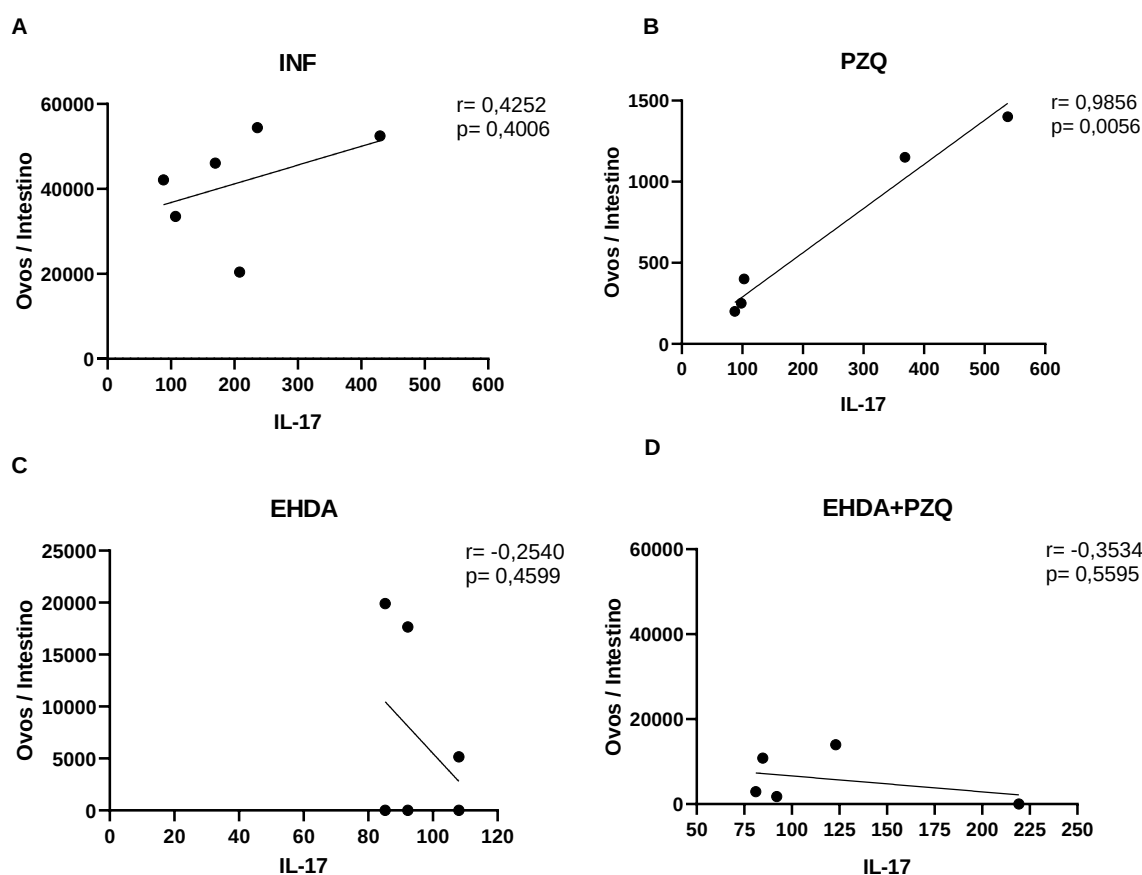
Quando avaliado as correlações, foi identificado apenas correlações entre o número de eosinófilo do sangue em relação ao número de ovos do fígado no grupo controle negativo, sendo uma correlação negativa (Figura 9). As demais correlações não apresentaram valor positivo ou negativo (Dados não apresentados).



**Figura 9: Correlações eosinófilo e ovos fígado CN (A), PZQ (B), EHDA (C) e EHDA+PZQ (D).** Análise de correlação de Pearson para todas as correlações. Os valores representam a média  $\pm$  desvio padrão de 6 animais por grupo  $p < 0.05$

**Correlações de citocinas do soro com a presença de ovos nas fezes, fígado e intestino do dia 90 em animais tratados com EHDA ou em associação com PZQ (EHDA+PZQ) e em animais infectados sem tratamento**

Quando avaliado as correlações, foi identificado apenas correlações entre a citocina IL-17 em relação ao número de ovos no intestino no grupo Praziquantel, sendo uma correlação negativa (Figura 10). As demais correlações não apresentaram valor positivo ou negativo (Dados não apresentados).



**Figura 10: Correlações citocina IL-17 e ovos intestino CN (A), PZQ (B), EHDA (C) e EHDA+PZQ (D).** Análise de correlação de Pearson para todas as correlações. Os valores representam a média  $\pm$  desvio padrão de 6 animais por grupo  $p < 0.05$

#### **Correlações de citocinas do baço com a presença de ovos nas fezes, fígado e intestino do dia 90 em animais tratados com EHDA ou em associação com PZQ (EHDA+PZQ) e em animais infectados sem tratamento**

Em relação as citocinas avaliadas do baço  $\text{TNF-}\alpha$ ,  $\text{IFN-}\gamma$ , IL-2, IL-6, IL-10, IL-4, IL-17 e MIP-1 e suas correlações com o número de ovos nas fezes, fígado e intestino, não foi identificado nenhuma correlação positiva ou negativa. (Gráficos não apresentados).

#### **4.3.3. Conclusão**

Estes resultados demonstram que não houve correlações positivas ou negativas entre os parâmetros avaliados dos grupos tratados. O que demonstra que não houve variações entre as respostas imunológicas e parasitológicas.

#### 4.3.2 Avaliação do EPP-AF® em camundongos saudáveis

### 1. OBJETIVOS

#### 1.1 Geral

Avaliar o efeito a curto e a longo prazo do uso do extrato padronizado de própolis de *Apis mellifera* (EPP-AF®) sobre a resposta imunológica em camundongos saudáveis

#### 1.2 Específicos

- Avaliar a toxicidade e os parâmetros fisiológicos (fezes, peso corporal e dos órgãos) no decorrer e após o uso do EPP-AF®;
- Avaliar as alterações histológicas no tecido pulmonar, hepático, intestinal e renal;
- Avaliar o efeito do EPP-AF® sobre a celularidade ao 30º e 90º dias;
- Caracterizar o perfil imunofenotípico de células de baço;
- Caracterizar o perfil de citocinas dos padrões Th1, Th2, Th17 no soro e nas culturas de células do baço.



## **O extrato padronizado de própolis de *Apis mellifera* (EPP-AF®) não promove danos teciduais e estimula a resposta imune a longo prazo**

### **RESUMO**

A própolis é considerada uma fonte farmacologicamente promissora por apresentar diversas propriedades biológicas. Recentemente, o uso de própolis como alimentar funcional, adjuvante imunológico e ingrediente natural tem ganhado grande atenção. Entretanto, muitos dos efeitos a curto ou a longo prazo da própolis ainda necessita ser elucidados. Dessa forma, o objetivo desse estudo foi investigar o efeito do extrato padronizado de própolis de *Apis Mellifera* (EPP-AF®) a curto e a longo prazo em camundongos saudáveis. Inicialmente, camundongos Swiss machos foram separados em dois grupos: CONTROLE (Utilizado como parâmetro fisiológico), EPP-AF® (Animais que receberam própolis por 30 dias na dose 4,5mg/Kg por vira oral). Foram avaliados os seguintes parâmetros: Sobrevida, fezes, peso corpóreo, peso e análise macroscópica dos órgãos, análises histológicas (Lesão tecidual, fibrose, necrose, infiltrado celular e congestão vascular) e ensaios imunológicos (Análise leucocitária no sangue, dosagem de mediadores inflamatórios e imunofenotipagem). Os resultados demonstram que o uso de EPP-AF® por 30 dias não ocasionou letalidade, alterações nas fezes e não influenciou no ganho ou perda de peso ponderal, mas estimulou o aumento do peso dos órgãos como fígado e baço, não sendo identificado danos macroscópicos. Na avaliação histológica, foi identificado que o uso de EPP-AF® não provocou danos no pulmão, fígado, intestino e rim. Aumento o número de linfócitos no sangue aos 30 e 90 dias, não alterou as concentrações séricas de IgE total, IL-10 e TNF- $\alpha$  no soro. A celularidade da medula óssea, peritônio não apresentou alteração. No baço, houve aumento da celularidade total, a caracterização fenotípica mostrou aumento de CD19<sup>+</sup>, F480<sup>+</sup>, LY6G<sup>+</sup> e CD170<sup>+</sup> seguido do aumento da citocina IL-10 e da quimiocina MIP-1, não sendo detectada a citocina IL-4. Em conclusão, nossos dados demosntram que o EPP-AF® pode estar associado aos efeitos anti-inflamatórios e imunomodulador, estimulando a resposta imunológica a curto e a longo e não provocando danos teciduais.

**Palavras-chave:** Anti-inflamatório, Própolis, IL-10, imunoestimulador,

## 1. Introdução

A própolis é um material resinoso que apresenta composição química complexa, em sua maioria, é composta por 50% de resina, 30% de cera, 10% de óleos essenciais, 5% de pólen e outras 5 % de substâncias que incluem minerais e ácidos fenólicos (cinâmico e o cafeíco), ou seus estéres, flavonoides, terpenóides, esteroides, açúcares e aminoácidos (BANKOVA, 2005; SUN et al., 2015; BONAMIGO et al., 2017).

Diversas propriedades biológicas da própolis já foram comprovadas cientificamente, incluído as propriedades antimicrobiana (FARNESI et al., 2009; CAPOCI et al., 2015); antiparasitária (SIHERI et al., 2019; ARRUDA et al., 2020; SILVA et al., 2021); antiviral (GEKKER et al., 2005; KWON et al., 2020; HARISNA et al., 2021; DEWI et al., 2021; FIORINE et al., 2021); anticancerígena (KABALA-DZIK et al., 2017; ZINGUE et al., 2020), anti-inflamatória (MACHADO et al., 2012; BUENO-SILVA et al., 2016), antioxidante (BONAMIGO et al., 2017; MUJICA et al., 2017) e imunomoduladora (SY et al., 2006; BACHIEGA et al., 2012; CONTI et al., 2016).

Nos últimos anos, a própolis tem sido um dos produtos naturais que tem ganhado grande evidência. O mercado global de própolis aponta que a taxa de crescimento anual registre aumento de 5,48% entre o período de 2021-2026 (MAIS A, 2023). O aumento na procura da própolis apresenta uma relação direta com a pandemia de COVID-19, visto que, estudos demonstraram o efeito da suplementação com própolis em pacientes com COVID-19 (MIRYAN et al., 2020; BARRETA et al., 2020; SILVEIRA et al., 2021; KARAOGLU et al., 2023; KUMAR et al., 2023).

Recentemente, estudos evidenciaram resultados promissores da própolis como suplemento alimentar, adjuvante imunológico e ingrediente natural (AFSHARPOUR et al., 2019; MIRYAN et al., 2020; TASCA et al., 2023; MOJARAB et al., 2020; PAHLAVANI et al., 2022; ASHRY et al., 2012; RODRIGUES et al., 2021).

Acredita-se que o efeito benéfico do uso de própolis pode estar associado ao seu potencial efeito anti-inflamatório (MACHADO et al., 2012; BUENO-SILVA et al., 2016; DA et al., 2019; PIÑEROS et al., 2020; BOUFADI et al., 2021; SILVEIRA et al., 2022) e antioxidante (BONAMIGO et al., 2017; MUJICA et al., 2017; GALEOTTI et al., 2018; KUREK-GÓRECKA et al., 2022; KARAGECILI et al., 2023).

Entretanto, considerando que, muitos dos mecanismos de ação da própolis durante ou após seu uso em organismos saudáveis ainda necessitam ser elucidados. Dessa forma, nosso

estudo objetivou investigar o efeito do EPP-AF® a curto e a longo prazo em camundongos saudáveis.

## 2. Matérias e métodos

### 2.1 Extrato de Própolis Padronizado - EPP-AF®

Neste estudo, foi utilizado o extrato padronizado de própolis de *Apis mellifera* (EPP-AF®), fornecido pela empresa Apis Flora em parceria com o laboratório de Imunofisiologia da Universidade Federal do Maranhão. O EPP-AF® é um produto comercial padronizado, composto por própolis verde, álcool neutro e água purificada, com uma concentração mínima de 16% p/v de extrato seco (Lote: 251400119LP).

### 2.2 Delineamento experimental

Camundongos Swiss machos com 2 meses de idade (~35g), foram fornecidos do Biotério Central da Universidade Federal do Maranhão (UFMA). Todos os procedimentos foram previamente aprovados pela Comissão de Ética para o Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Maranhão, sob o número 23115.002254/2020-18.

Os camundongos Swiss foram divididos em 2 grupos de 6 animais cada, sendo um grupo controle e um grupo que recebeu EPP-AF®. Grupo Controle: Camundongos que foram utilizados como parâmetro fisiológico. Grupo EPP-AF®, camundongos que receberam própolis na dose de 4,5mg/Kg.

O uso de EPP-AF® foi realizado diariamente, por via oral, durante 30 dias. Após o 30º dia, ocorreu uma pausa do uso da própolis (Figura 1). Nos intervalos entre os dias 0, 7, 14, 21, 28, 35, 49, 56, 63, 70, 77, 83 e 90 foram realizadas avaliações da sobrevida, análise morfológica e microscópica das fezes, mensuração do peso ponderal, peso dos órgãos e análise macroscópica dos órgãos. No 30º dia, em ambos os grupos foi realizada análise leucocitária no sangue. Aos 90º dias, os dois grupos foram eutanasiados e realizada a obtenção de sangue, soro, medula óssea, lavado peritoneal, pulmão, fígado, intestino, baço e rim para posteriores análises.

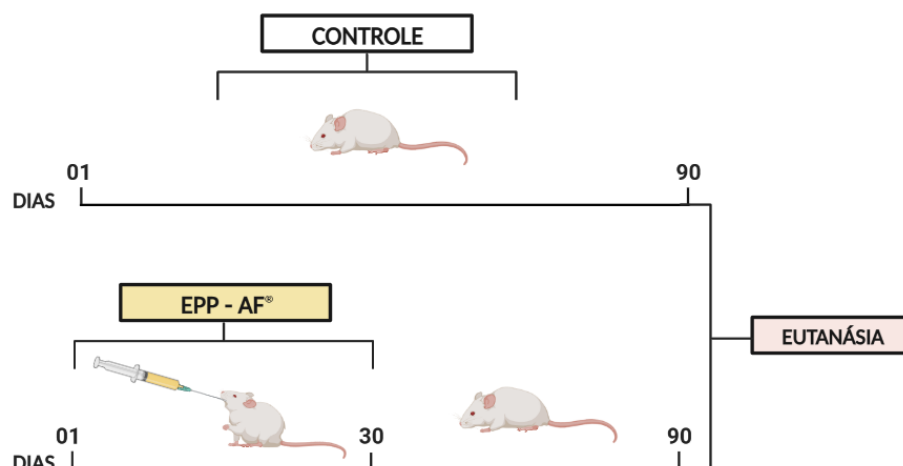


Figura 1. Delineamento experimental da suplementação com EPP-AF® por 30 dias. Criado com BioRender.com

### 2.3 Avaliação histológica do pulmão, fígado, intestino e rim

Amostras do pulmão, fígado, intestino e rim de cada animal foram armazenados em formaldeído a 10% por 48 h. após fixação, todas as amostras foram lavadas e alocadas em álcool 70%. Posteriormente as amostras foram desidratadas em séries crescentes de álcool, clarificado em xilol, e embebido em parafina, para posterior preparação das lâminas histológicas, que foram coradas com hematoxilina e eosina (HE) (Luna, 1968). Os parâmetros histopatológicos foram avaliados por microscopia de luz óptica. Os parâmetros histopatológicos analisados nas amostras foram: lesão tecidual, fibrose, necrose, infiltrado celular e congestão vascular. A avaliação destes parâmetros se deu através da classificação de pontuações como, ausente (0), leve (1), moderado (2) ou intenso (3) (Liberio et al., 2011).

### 2.4 Análise leucocitária aos 30° e 90° dia

Ao 30° dia, foi realizada uma incisão na ponta da cauda dos camundongos e coletado alíquotas de 10µL de sangue. Ao final do 90° dia, também foi coletado alíquotas de 10µL de sangue. Em ambas as amostras individuais de cada animal, foi realizado o preparado de esfregaço sanguíneo para contagem diferencial dos leucócitos. Os esfregaços foram corados com um kit panóptico rápido (Laborclin, Brasil) (Maciel et al., 2014).

## 2.5 Quantificação de citocinas, quimiocina e IgE no soro

A quantificação de IL-10, IL-17, TNF- $\alpha$ , IgE no soro e MIP-1 no sobrenadante da cultura de baço foi quantificado pelo ensaio ELISA, usando kits disponíveis comercialmente e seguindo as instruções fornecidas pelo fabricante (Bender MedSystems GmbH, Campus Vienna Biocenter 2, 1030 Viena Áustria). As informações disponíveis pelo fabricante das concentrações de proteínas de combinação foram utilizadas para gerar a curva padrão, esta curva foi usada para converter as leituras de absorção das amostras em concentrações de proteína (em pg/mL).

## 2.6 Análise da celularidade da medula óssea, baço e peritônio

Para análise das células do lavado peritoneal, as amostras foram obtidas e em seguida centrifugadas com auxílio da centrífuga CitoSpin, após centrifugação as lâminas foram coradas com kit panóptico rápido (Laborclin, Brasil), a contagem foi realizada com auxílio de microscópio óptico de luz (Oliveira et al., 2019).

Para análise das células da medula óssea, inicialmente o fêmur foi obtido, em seguida foi perfundido com 1mL de solução salina tamponada com fosfato (PBS). Para obtenção dos esplênocitos, o baço foi moído, as amostras foram filtradas e ressuspensas em 3mL de PBS. Após isto, as suspensões celulares foram fixadas e coradas com cristal violeta de cristal na proporção de 9:1, com auxílio da câmara de Neubauer e microscópio óptico de luz as amostras foram avaliadas (Cruz et al., 2007).

## 2.7 Avaliação da celularidade do baço por citometria de fluxo

Células do baço ( $1 \times 10^6$ ) foram incubadas junto com anticorpos monoclonais conjugados a fluorocromos respectivamente: anti-CD3 conjugado a FITC; anti-CD19 a FITC; anti-F4/80 a FITC; anti-CD170 a FITC e anti-LY6G a PERCP, seguindo as recomendações do fabricante (BD Biosciences Pharmingen). As amostras foram analisadas no citometro de fluxo guava, os resultados foram analisados pelo software Flow Jow<sup>®</sup>.

## 2.8 Cultura e quantificação de citocinas pela técnica CBA no baço

As células do baço (após hemólise) foram cultivadas em placas de 96 poços ( $2 \times 10^5$  por poço) em meio RPMI 1640 completo (Sigma, EUA) suplementado com 2 mM de L-glutamina, 23 mM de L-asparagina, 0,1 mM de pirúvico ácido, ácido fólico 1 mM, estreptomicina a 1% (100 µg/mL), penicilina G (100 U/mL) e 2% de soro fetal bovino. As células foram incubadas por 48 horas a 37 °C e 5% CO<sub>2</sub> (Yang et al., 2011).

A expressão de TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-6, IL-2, IL-10, IL-4 e IL-17 foram quantificadas no sobrenadante da cultura celular do baço através do kit Th1/Th2/Th17 usando a técnica de microesferas (beads) CBA (Cytometric Bead Array), seguindo as informações do fabricante (BD Biosciences). Os resultados foram adquiridos por citometria de fluxo com FACScalibur (BD Biosciences) e após a leitura, os dados foram analisados com auxílio do software Flow Jow®. Os valores serão expressos em pg/mL para cada uma das citocinas, a partir das curvas padrão.

## 2.9 Análise estatística

A análise estatística foi realizada com auxílio do Software GraphPad Prism, versão 8.0 (Prism Software, Irvine, Califórnia, EUA). Os dados foram inicialmente avaliados pelo teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov e os resultados foram apresentados como média  $\pm$  desvio padrão (S.D). Além disso, o teste *t* de Student foi aplicado. No estudo, foi considerado resultados significativos quando  $p < 0,05$ .

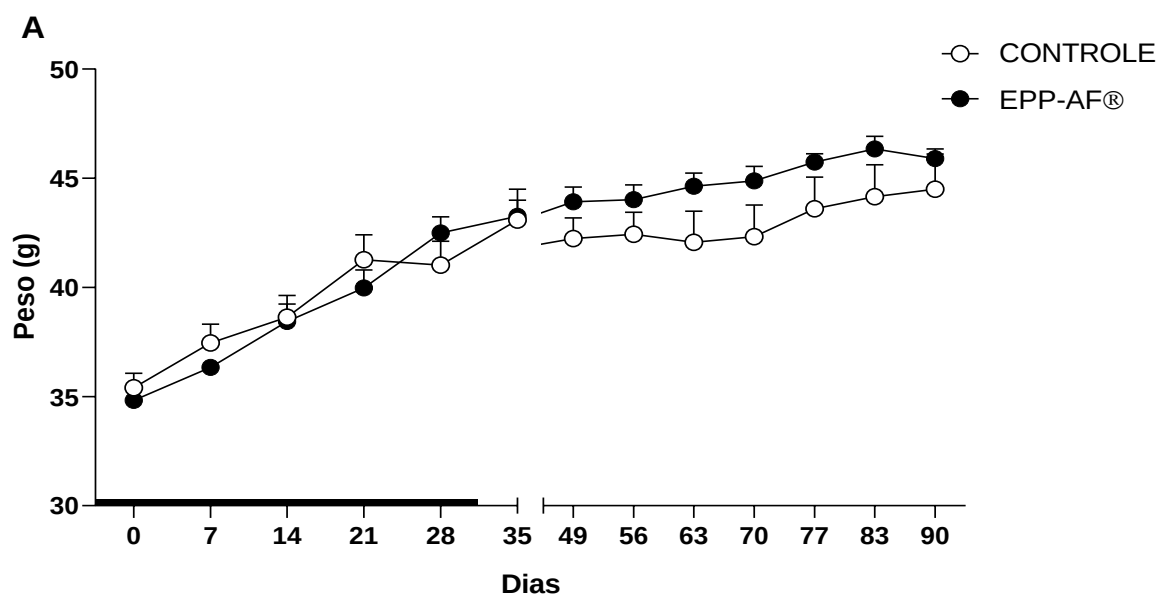
### 3. Resultados

#### 3.1 A O uso de EPP-AF® por 30 dias não ocasionou letalidade e alterações nas fezes

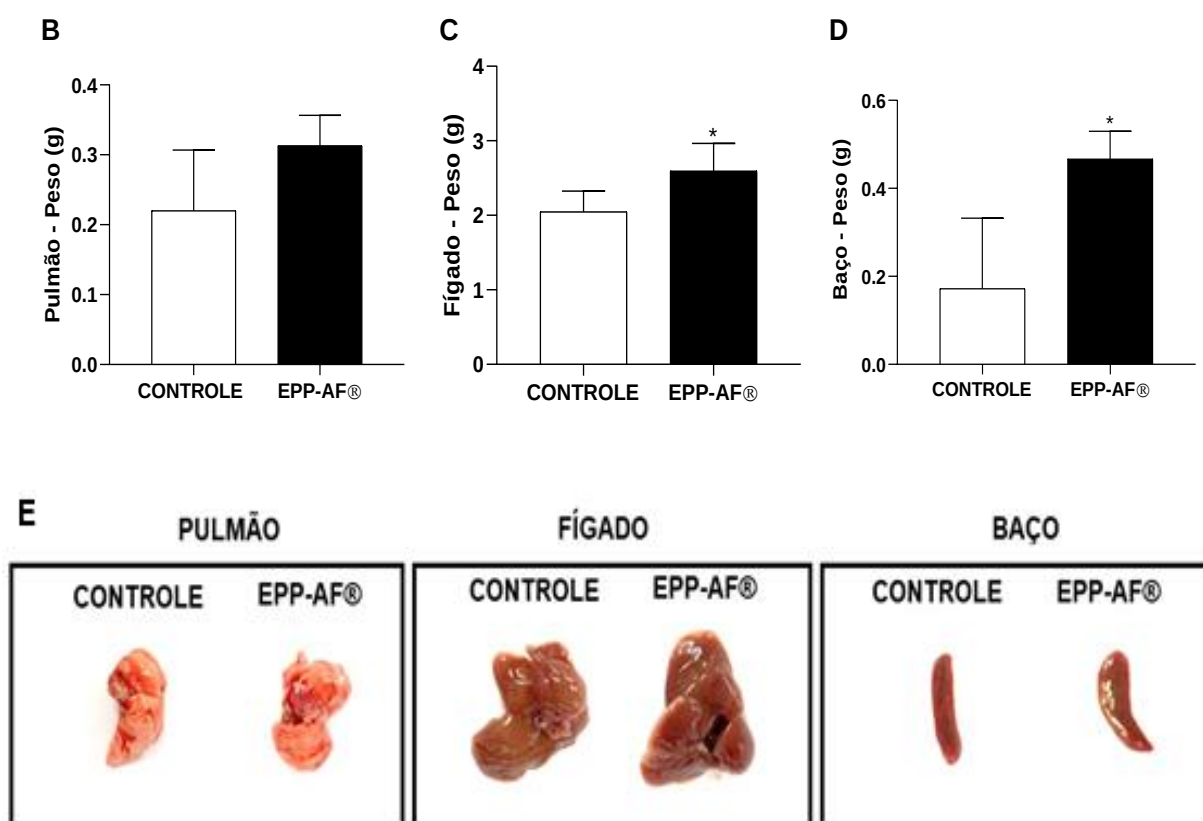
O EPP-AF® não promoveu letalidade durante e após o uso. Nas fezes, o uso do extrato não induziu alteração na cor, textura e indução de secreções, assim como, não foram encontradas alterações microscopicamente.

#### 3.2 O uso de EPP-AF® por 30 dias não alterou o peso ponderal, mas aumentou o peso dos órgãos fígado e baço com ausência de danos teciduais macroscópicos

Com relação ao peso ponderal (Figura 2A), o EPP-AF® não reduziu o peso ponderal, entretanto a partir do 42º dia, animais que receberam EPP-AF® apresentaram um breve aumento do peso. Ao final do 90º dia, identificamos que a própolis não alterou o peso do pulmão em relação ao controle (Figura 2B), entretanto, aumentou o peso do fígado (Figura 2C) e baço (Figura 2D). Nossos dados demonstram que não o EPP-AF® não promoveu danos teciduais macroscopicamente (Figura 2E).



**Figura 1:** Valiação do peso. Peso ponderal (A). A mensuração do peso dos animais ocorreu no intervalo do dia 0 ao dia 90. Os valores representam a média  $\pm$  erro padrão de 6 animais por grupo. (\*)  $p < 0.05$  em comparação ao controle negativo controle.



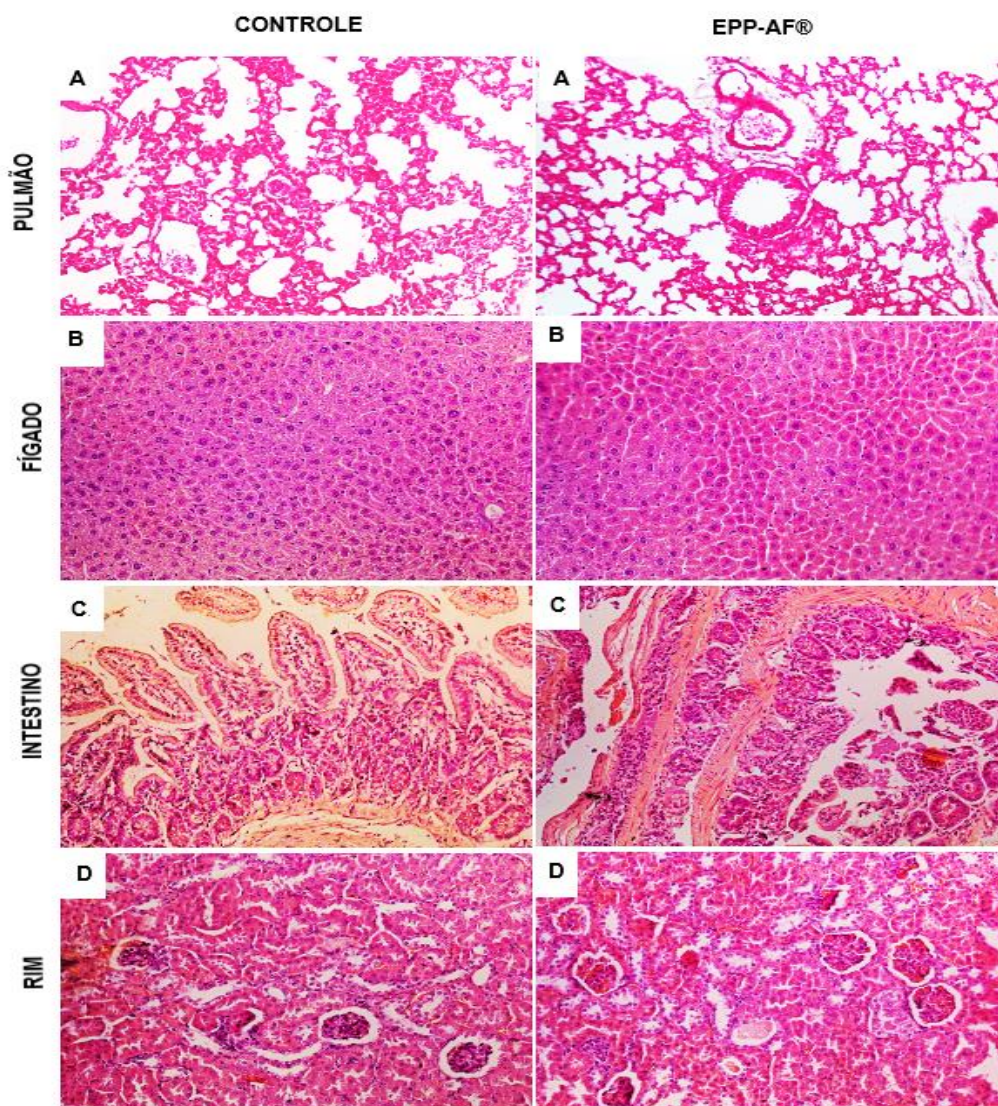
**Figura 2: Peso dos órgãos e análise macroscópica dos órgãos.** Peso pulmão (B), peso fígado (C) e peso do baço (D). Análise macroscópica dos órgãos, pulmão, fígado e baço (E). A mensuração do peso dos órgãos assim como a análise macroscópica ocorreu ao final de 90 dias, quando todos os animais foram eutanasiados. Os valores representam a média  $\pm$  erro padrão de 6 animais por grupo. (\*)  $p < 0.05$  em comparação ao controle negativo controle.

### 3.3 Análise histológica e fotomicrografia do tecido pulmonar, hepático, intestinal e renal

#### 3.3.1 O uso de EPP-AF® não ocasionou danos teciduais no pulmão, fígado, intestino e rim

Dados histológicos do tecido pulmonar, hepático, intestinal e renal demonstram que o EPP-AF® não provocou lesão tecidual, fibrose, necrose, infiltrado celular e congestão vascular, resultados semelhantes ao grupo controle (Figura 3).





**Figura 3. Fotomicrografias de cortes histológicos do grupo controle e EPP-AF®.** Pulmão (A), fígado (B), intestino (C) e rim (D) de camundongos que receberam ou não EPP-AF®, corados com HE (40x).

3.4 O EPP-AF® aumentou o número de linfócitos no sangue e não alterou as concentrações de IgE total, IL-10 e TNF- $\alpha$  no soro

Nossos achados demonstram que o EPP-AF® estimulou linfócitos ao 30° e 90° dia em comparação ao controle, não sendo alterada as demais populações celulares. Ao avaliarmos a celularidade do grupo EPP-AF® ao 30° dia e EPP-AF® ao 90° dia, o número de linfócitos se manteve estimulado (Tabela 1). Quando avaliado as concentrações séricas de IgE total, IL-10 e TNF- $\alpha$  no soro, não foi detectado nenhum destes mediadores imunológicos em ambos os grupos (gráficos não apresentados).

**Tabela 1:** Análise da contagem celular com 30 e 90 dias no sangue

| Celularidade Percentual (%) | 30 dias   |            | 90 dias   |            |
|-----------------------------|-----------|------------|-----------|------------|
|                             | Controle  | EPP-AF®    | Controle  | EPP-AF®    |
| <b>Leucócitos</b>           | 100       | 100        | 100       | 100        |
| <b>Neutrófilos</b>          | 26.8 ±3.4 | 22 ±8.3    | 30.6 ±5.4 | 23.4 ±6.8  |
| <b>Linfócitos</b>           | 60.0 ±5.6 | 70.8 ±7.4* | 58.2 ±2.5 | 69.0 ±5.2* |
| <b>Monócitos</b>            | 11 ±1.2   | 11.2 ±2.6  | 11.8 ±0.8 | 10.4 ±1.8  |
| <b>Eosinófilos</b>          | 1.4 ±1.1  | 1.0 ±1.0@  | 0.2±0.4   | 1.0 ±1.2   |

O EPP-AF® foi aplicado de forma oral na dose de 4,5mg/Kg. Aos 30 e 90 dias foi avaliado a contagem celular no sangue. Os valores representam a média ± erro padrão de 6 animais por grupo. (\*) p<0.05 em comparação ao controle.

### 3.5 O EPP-AF® não alterou a celularidade da medula óssea e peritônio

Em relação a celularidade da medula óssea e peritônio, ambos os grupos não apresentaram diferença (Tabela 2).

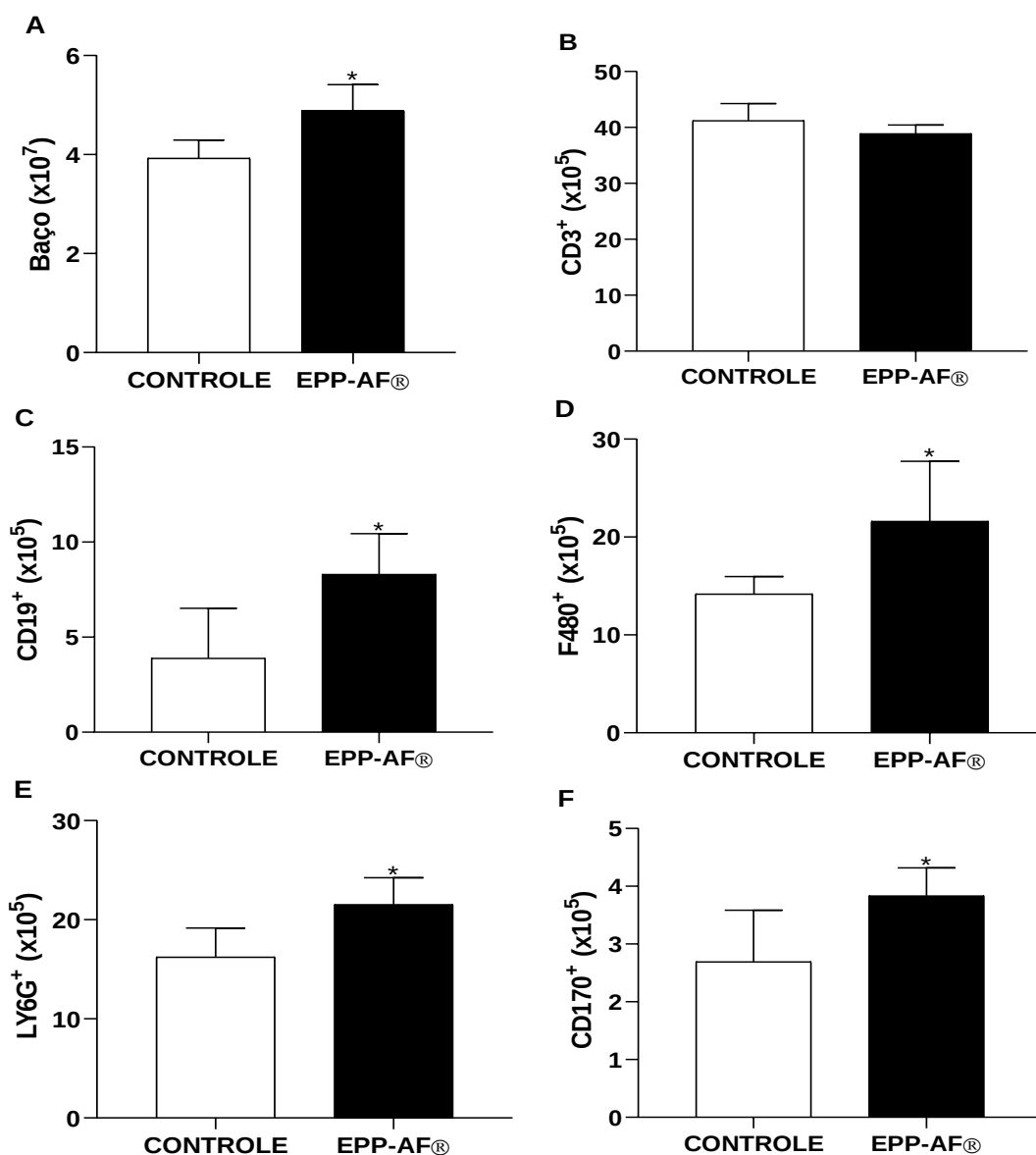
**Tabela 2.** Contagem global de leucócitos da medula óssea e peritônio de camundongos após o uso de EPP-AF®

| Órgãos                              | Grupos   |          |
|-------------------------------------|----------|----------|
|                                     | Controle | EPP-AF®  |
| Medula óssea (x10 <sup>6</sup> /mL) | 1,1 ±0,2 | 1,4 ±0,3 |
| Peritônio (x10 <sup>6</sup> /mL)    | 2,8 ±0,2 | 3,5 ±0,0 |

O EPP-AF® foi aplicado de forma oral na dose de 4,5mg/Kg. Após 30 e 90 dias foram avaliadas a contagem celular da medula óssea e peritônio. Os valores representam a média ± erro padrão de 6 animais por grupo. (\*) p<0.05 em comparação ao controle negativo controle.

### 3.6 Uso de EPP-AF® aumentou o número esplenócitos

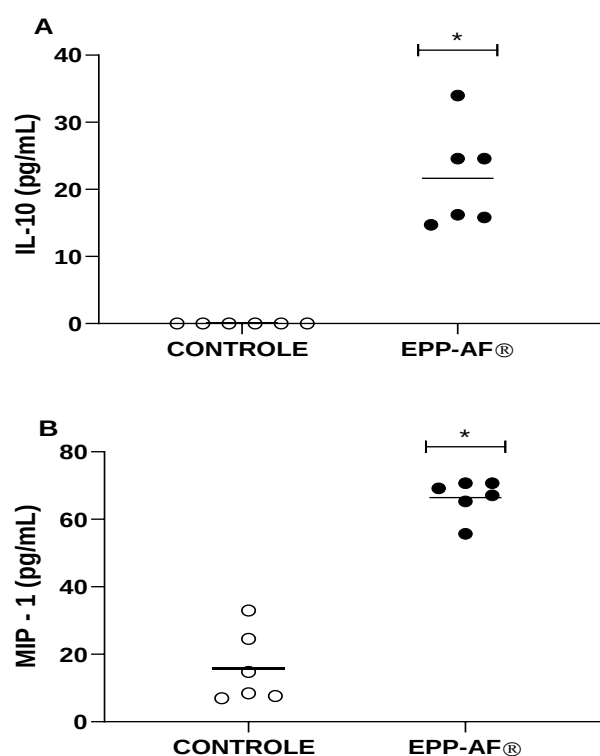
O uso de EPP-AF® aumentou a celularidade do baço (Figura 4A). Não alterando o número de linfócitos (Figura 4B), entretanto, estimulou linfócitos B (Figura 4C), macrófagos (Figura 4D), neutrófilos (Figura 4E) e eosinófilos (Figura 4F).



**Figura 4. Celularidade e caracterização fenotípica do baço de camundongos que receberam ou não EPP-AF®.** Celularidade do baço (A), linfócitos (B), linfócitos B (C), macrófagos (D) neutrófilo (E) e eosinófilo (F). As células do baço foram obtidas após o final de 90 dias. Foram avaliados os seguintes grupos: Grupo controle, animais não tratados. Grupo EPP-AF®: Animais que receberam própolis. Os valores representam a média  $\pm$  desvio padrão de 6 animais por grupo. (\*)  $p < 0.05$  em comparação ao controle.

### 3.7 O uso de EPP-AF® aumentou o nível de IL-10 no baço

Em relação aos níveis séricos da citocina IL-10 (Figura 5A) e da quimiocina MIP-1 (Figura 5B), ambos mediadores imunológicos apresentaram níveis elevados no grupo que recebeu EPP-AF® em relação ao controle. Em relação a citocina a IL-4, não foi detectada em nenhum dos grupos (Gráfico não apresentado).



**Figura 5: Efeito do EPP-AF® sobre os níveis de citocina e quimiocina em sobrenadante de cultura de células do baço de camundongos. IL-10 (A), MIP-1 (B).** Os valores representam a média ± desvio padrão de 6 animais por grupo. \*  $p < 0.05$  em comparação ao controle.

## 4. Discussão

Ainda a uma escassez de informações de como os mecanismos de ação da própolis a curto e longo prazo estão envolvidos após o seu uso no organismo saudável, nossos resultados demonstram que o EPP-AF® apresentou efeito em estimular o sistema imunológico a longo prazo e não provocou dados teciduais.

Tasca et al., (2023), avaliaram a influência da própolis em PVHA assintomáticos e com carga viral suprimida, os autores identificaram que a ingestão de própolis por 90 dias foi capaz

de atenuar a inflamação e os danos oxidativos nestes pacientes. Chermut et al., (2023), investigando o efeito da própolis em pacientes submetidos a hemodiálise, observaram que a própolis atenuou a inflamação, reduzindo os níveis de  $\text{TNF}\alpha$  e  $\text{MIP-1}\beta$

Pahlavani et al., (2022), ao avaliarem a própolis em pacientes com Pneumosepsis primária, demonstraram que a combinação de própolis e melatonina reduziram os níveis de IL-6, proteína C reativa e apresentou efeito na melhora de alguns dos desfechos clínicos. No estudo de Afsharpour et al., (2019), foi demonstrado que o uso de própolis em pacientes com diabetes tipo 2, exibiu redução da glicemia de jejum, glicemia pós-prandial de duas horas, insulina, resistência à insulina, hemoglobina A<sub>c</sub> e aumentou os níveis da capacidade antioxidante total, glutathione peroxidase e superóxido dismutase.

Tendo em vista a escassez de relatos na literatura da própolis em indivíduos saudáveis, buscamos investigar os mecanismos da própolis envolvidos durante e após o seu uso em camundongos saudáveis. Inicialmente, identificamos que o extrato de própolis utilizado não provocou efeitos tóxicos aos animais. Estes resultados estão de acordo com o estudo de Nie et al., (2017), que avaliaram a própolis por 35 dias em animais diabéticos, e não observaram efeitos tóxicos e comportamentos anormais nos camundongos. Corroborando também com o estudo de Türkez et al., 2011; Freitas et al., 2022, que demonstraram que a própolis não apresentou efeitos tóxicos.

Durante e após o uso do EPP-AF®, observamos que não houve alterações nas fezes, tais como: mudança de cor, textura e indução de secreções, demonstrando o efeito gastrotetor do EPP-AF®. Diversos modelos experimentais gastrointestinais investigando o efeito da própolis tem relatado sua ação gastrotetora. Xue et al., (2019), demonstraram que ratos diabéticos após o uso de própolis apresentaram aumento dos níveis de metabólitos AGCC, melhora na tolerância a glicose, modulação da microbiota e melhora na função da barreira da mucosa intestinal. El-Ghazaly et al., (2011), ao avaliarem o efeito gastrotetor da própolis em animais expostos a radiação, identificaram a proteção contra o desenvolvimento de úlceras gástricas e aumento na secreção de mucina e dos níveis de prostaglandina E(2) da mucosa ( $\text{PGE}(2)$ ) e supressão de citocinas pró-inflamatórias  $\text{TNF-}\alpha$  e  $\text{IL-1}\beta$ .

Um dos principais fatores de risco para a saúde é o sobrepeso e a obesidade, estes fatores podem induzir doenças cardiovasculares, diabetes e até mesmo câncer (WHO, 2023). A busca por produtos naturais que apresentem ação na regulação do peso corporal pode ser uma alternativa promissora para indivíduos que sofrem com sobrepeso, obesidade e deficiência

nutricional, além de ser uma alternativa como alimento funcional, promovendo melhora no desempenho físico. Em nosso estudo, ao avaliarmos a influência do EPP-AF® sobre o peso corporal de camundongos saudáveis, identificamos que seu uso não alterou o peso dos animais, resultado semelhante ao controle.

Nie et al., (2017), demonstraram que camundongos diabéticos tratados com própolis na dose de 15 mg/kg e 30 mg/kg por 35 dias, apresentaram redução do peso corporal em comparação ao grupo diabético sem tratamento, em relação ao grupo controle os grupos tratados com própolis não apresentaram diferença. Não foram observadas alterações no peso do fígado e do peso muscular entre os grupos. No estudo de Koya-Miyata et al., (2009), ao investigarem a obesidade induzida e pré-existente em camundongos, identificaram que a própolis reduziu o ganho de peso corporal, peso do tecido adiposo visceral, níveis de triglicerídeos séricos e hepáticos, colesterol e ácidos graxos não esterificados. Ao avaliarem a obesidade pré-existente, identificaram que a própolis inibiu o aumento do ganho de peso corporal, assim como, reduziu os níveis séricos de ácidos graxos, triglicerídeos hepáticos, glicose sérica e os níveis de insulina.

Em seres humanos, Soleimani et al., (2021), mostraram que o uso da própolis por quatro semanas na dose de 450 mg duas vezes ao dia em indivíduos saudáveis, não afetou o peso corporal dos indivíduos. Zakerkish et al., (2019), demonstraram que o tratamento com própolis em pacientes diabéticos por três meses na dose diária de 1.000 mg/dia, não apresentou efeitos sobre o peso corporal. Em pacientes com tuberculose pulmonar, a própolis na dose de 30%, aumentou o peso corporal, o que segundo os autores, esse aumento pode estar correlacionado a efetividade da própolis em reduzir os efeitos hepatotóxicos do medicamento utilizado pelos pacientes, uma vez que, o medicamento provoca efeitos colaterais e consequentemente está associado a perda de peso corporal (Mahani et al., 2018).

Os nossos resultados histológicos demonstram que o EPP-AF® não ocasionou danos fibróticos, lesão tecidual, necrose, infiltrado celular e congestão vascular ao tecido pulmonar, hepático, intestinal e renal. Estes resultados confirmam os dados iniciais da análise patológica macroscópica, onde não foi encontrado alterações teciduais. Análises de fotomicrografias dos tecidos do grupo EPP-AF® mostram semelhanças ao grupo controle.

Os nossos achados corroboram aos resultados descritos na literatura que demonstram o efeito protetor tecidual que a própolis apresenta. Barroso et al., (2017), investigando a o efeito própolis em modelo de enfisema em camundongos, comprovaram melhora da histoarquitetura pulmonar seguida da recuperação dos espaços alveolares, septos alveolares, fibras elásticas e

aumento da MMP-2 e diminuição da expressão de MMP-12. Assim como, aumento de leucócitos totais, constituído do aumento de macrófagos e linfócitos. No tecido pulmonar, os autores identificaram que a própolis induziu macrófagos alternativamente ativados (M2), aumento dos níveis de IL-10, sem alteração da via Nrf2 e uma reversão da via IGF1 pelo uso de própolis. O que segundo os autores, os dados em conjunto demonstram a ação da própolis relacionada ao efeito anti-inflamatório favorecendo o reparo tecidual pulmonar (Barroso et al., 2017).

No fígado, Bard et al., (2019), demonstraram o efeito hepatoprotetor ao avaliarem os mecanismos da própolis sobre a lesão hepática mediada por CCl<sub>4</sub>, demonstrando que a própolis induziu a diminuição das fibras colágenas, expressão de  $\alpha$ -SMA e colágeno tipo I, reduziu os sinais pró-inflamatórios como a expressão de HSP70 e os níveis de IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$ . Melhorou o estresse oxidativo crônico por meio do aumento dos níveis da enzima antioxidante GSH e diminuição dos níveis de ERO. Em humanos, o uso de própolis na dose de 30% em pacientes com tuberculose pulmonar apresentou ação na proteção do fígado contra os efeitos tóxicos do fármaco antituberculose (Mahani et al., 2018). Soleimani et al., (2021), demonstraram que a própolis em pacientes com doença hepática gordurosa não alcoólica, apresentaram melhora da esteatose hepática, redução da rigidez hepática e dos níveis de proteína C reativa.

Ao avaliarmos os efeitos imunomodulatórios do EPP-AF® a curto (30 dias) e a longo prazo (90 dias), identificamos aumento de linfócitos em relação ao controle. Estudos tem demonstrado os efeitos da própolis em suprimir a inflamação e estimular linfócitos, Kashiwakura et al., (2020), demonstraram que a própolis suprimiu as citocinas IL-4, IL-6 e IL-13 induzida por IgE/antígeno em basófilos e a inibição em basófilos da fosforilação das moléculas sinalizadoras de Fc $\epsilon$ RI Lyn, Akt e ERK. A própolis não afetou a população de basófilos nos camundongos tratados, inibiu a IgE-CAI, na anafilaxia intestinal provocada por ovalbumina, a resposta mediada por basófilos e IL-4 derivada de basófilos, foi atenuada com o uso de própolis. Nie et al., (2017) ao avaliarem as citocinas pró-inflamatórias no soro de camundongos diabéticos tratados com própolis por 35 dias, identificaram que os níveis de e IL-6, TNF-y e MCP-1 apresentavam-se reduzidos em comparação ao grupo diabético. Sendo semelhantes ao controle.

Conte et al., (2021) ao avaliarem o uso de própolis por 3 meses em pacientes PVHA em uso de TARV assintomáticos, demonstraram que, os níveis de citocinas plasmáticas TNF-y, IL-

2, IL-4, IL-6, IL-10 e IL-17 assim como por PBMC IFN- $\gamma$ , IL-5, IL-17, IL-10, IL-1 $\gamma$ , IL-18 e IL-33 não apresentou diferenças significativas. Entretanto, identificaram aumento da expressão de Foxp3 e proliferação de linfócitos, o que segundo os autores, o consumo diário de própolis pode provocar melhora da resposta imunológica e diminuição da resposta inflamatória em PVHA assintomáticos sob TARV.

A fim de investigar os efeitos da própolis no baço de camundongos saudáveis e que receberam própolis por 30 dias, tendo em vista que, o baço é o maior órgão linfoide interposto entre a circulação sistêmica e a portal (Tischendorf, 1985), camundongos tiveram ao final de 90 dias, a celularidade total, caracterização fenotípica, expressão de citocinas e quimiocina investigadas.

Nossos dados mostram que o EPP-AF® aumentou a celularidade do baço, estimulando linfócitos B, macrófagos, neutrófilos e eosinófilos, esse aumento da celularidade foi acompanhada por um aumento da citocina IL-10 e da quimiocina MIP-1. Tsuruta et al., (2022), ao avaliarem os efeitos da própolis verde brasileira e de seu componente artepilina C na produção de citocinas em células do baço estimuladas por anticorpo anti-CD3, os autores identificaram que a artepilina C aumentou os níveis de IL-2, não afetando os níveis de IL-4 e IL-10, por outro lado, foram identificados níveis reduzidos de IFN- $\gamma$ , IL-6 e IL-17 após estímulo e tratamento com própolis. Soleimani et al., (2021), ao avaliarem o efeito da própolis em seres humanos saudáveis, identificaram redução na concentração de IL-6 e a relação de IL-6/IL-10 no plasma.

Shang et al., (2020), ao realizarem uma revisão sistemática e metanálise de ensaios clínicos, evidenciaram que a própolis, ocasionou redução significativa nas concentrações de IL-6, TNF- $\alpha$  e proteína C-reativa de alta sensibilidade (PCR-as), entretanto, a própolis não teve efeito significativo sobre a IL-1. Franchin et al., (2018), ao avaliarem estudos com própolis em modelos experimentais *in vitro* e *in vivo*, evidenciaram que a própolis assim como seus compostos isolados, apresentam ação em atenuar a expressão de mediadores inflamatórios e o recrutamento de leucócitos, estes mecanismos de ação estão envolvidos através da inibição de citocinas (TNF- $\alpha$ ), quimiocinas (CXCL1/KC e CXCL2/MIP2); fosforilação de I $\kappa$ B $\alpha$ , ERK1/2, JNK e p38MAPK, bloqueio da ativação de NF- $\kappa$ B, ação em inibir adesão e transmigração de neutrófilos e supressão da expressão de ICAM-1, VCAM-1 e E-selectina. Em conjunto, o uso de própolis pode ser uma alternativa promissora para o tratamento de patologias devido seu potencial efeito anti-inflamatório (Soleimani et al., 2021).



Os resultados do estudo demonstram que o uso de própolis promoveu a curto e longo prazo estímulo da resposta imunológica com ausência de dano nos órgãos. Estes efeitos observados no estudo estão associados a atividade anti-inflamatória, imunoestimulante e antioxidante que a própolis apresenta. Este estudo é um dos pioneiros em tentar elucidar alguns dos mecanismos da própolis após ser consumida por um longo período por um organismo saudável. Abrindo novas perspectivas para futuros estudos sobre o efeito da própolis a longo prazo em organismos saudáveis.

## 5. Conclusão

Os resultados do estudo mostram que o uso de EPP-AF® por 30 dias promoveu estimulação do sistema imunológico a curto e a longo prazo, não promovendo dados fisiológicos e danos teciduais. Estes resultados indicam o efeito anti-inflamatório e imunoestimulante do EPP-AF®, ocasionando efeitos benéficos para o organismo saudável.

## 5. Conclusão geral e perspectivas

Nossos resultados demonstram que os produtos naturais imunomoduladores apresentaram resultados promissores. O extrato das folhas de *D. ambrosioides* e de sua associação ao Praziquantel assim como o extrato padronizado de própolis de *Apis Melífera* apresentaram atividade anti-esquistossomótica. Os tratamentos foram capazes de reduzir o número de ovos nas fezes, fígado e intestino demonstrando inicialmente o efeito antiparasitário, assim como reduziram a eosinofilia sanguínea, mediadores pró-inflamatórios e estímulo de mediadores anti-inflamatório, demonstrando seu potencial efeito sobre o mecanismo imunológico em animais infectados, este efeito esteve associado a redução da inflamação granulomatosa em diversos órgãos, com redução de número e diâmetro médio dos granulomas. Apesar de ambos tratamentos não impedirem o desenvolvimento do parasito, nossos resultados indicam que os produtos promoveram efeito benéfico no organismo, melhorando a resposta imunológica e o quadro patológico. Ao avaliarmos as correlações, nossos dados demonstram que os mediadores imunológicos não apresentaram variações com os parâmetros parasitológicos avaliados.

Em nosso estudo demonstramos também que, o extrato padronizado de própolis de *Apis Melífera* (EPP-AF®) quando utilizado de forma suplementar em camundongos saudáveis por

30 dias, promoveu proteção macroscópica e microscópica aos órgãos e estímulo da resposta imunológica a curto e longo prazo. Demonstrando que o uso da própolis por um longo período é benéfico para o organismo a curto e longo prazo.

A partir destes resultados foi possível demonstrar cientificamente que o uso de produtos naturais com efeito, anti-inflamatório, imunomodulador, antioxidante, imunoestimulador podem ser uma alternativa promissora para fins terapêuticos na infecção por *S. mansoni* assim como em organismos saudáveis. Apesar de não promover a cura, estes produtos auxiliam na melhora do quadro patológico, promovendo uma melhor perspectiva de vida. Além disso, pode nos ajudar a propor novos métodos para controle de doenças parasitárias, não promovendo efeitos adversos no organismo.

## Referencias

AFROUZAN H, ZAKERI S, ABOUIE MEHRIZI A, MOLASALEHI S, TAHGHIGHI A, SHOKRGOZAR MA, ES-HAGHI A, DINPARAST DJADID N. Anti-Plasmodial Assessment of Four Different Iranian Propolis Extracts. Arch Iran Med., 20(5):270-281; 2017.

AFSHARPOUR F, JAVADI M, HASHEMOPOUR S, KOUSHAN Y, HAGHIGHIN HK. Propolis supplementation improves glycemic and antioxidant status in patients with type 2 diabetes: A randomized, double-blind, placebo-controlled study. Complement Ther Med, 43:283-288; 2019.

AIN QU, DAVID M, SHAH Q, AHMAD M, JAHAN S. Antifertility effect of methanolic leaf extract of *Chenopodium ambrosioides* Hook. in male Sprague Dawley rats. *Andrologia*. 50(10): e13129; 2018.

ALGABBANI Q, MANSOUR L, ELNAKADY YA, AL-QURASHY S, ALOMAR S, AL-SHAEBI EM, ABDEL-BAKI AS. *In vivo* assessment of the antimalarial and spleen-protective activities of the saudi propolis methanolic extract. Parasitol Res.,116(2):539-547; 2017.

ALONSO D, MUNÕZ J, GASCÓN J, VALLS ME, CORACHAN M. Failure of standard treatment with praziquantel in two returned travelers with *Schistosoma haematobium* infection. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. v. 74, p. 342–344; 2006.

ALVIM MC. Schistosomiasis in Maranhão. Belém: Hiléia méd. 1980.

ANGELUCCI F, BASSO A, BELLELI A, BRUNORI M, PICA MATTOCCIA L, VALLE C. The anti-schistosomal drug praziquantel is an adenosine antagonist. Parasitology, 134, 1215; 2007.

ARAUJO AKL. Morphological aspects of the healing process induced by *Ouratea* sp. Dissertation (Postgraduate Program in Veterinary Sciences) – State University of Ceara, Faculty of Argentina, S.C. et al. Medicinal plants: popular culture versus science. Experiences. 51-60; 2010.

ARRUDA C, RIBEIRO VP, MEJÍA JAA, ALMEIDA MO, GOULART MO, CANDIDO ACBB, SANTOS RA, MAGALHÃES LG, MARTINS CHG, BASTOS JK. Green Propolis: Cytotoxic and Leishmanicidal Activities of Artepillin C, p-Coumaric Acid, and Their Degradation Products. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 30(2), 169–176; 2020.

ASHRY EL SH, AHMAD TA. The use of propolis as vaccine's adjuvant. *Vaccine*, 31(1):31–39; 2012.

ASSAIDI A, DIB I, TITS M, ANGENOT L, BELLAHCEN S, BOUNANI N & FREDERICH M. *Chenopodium ambrosioides* induces an endothelium-dependent relaxation of rat isolated aorta. *J Integr Med*. 17(2):115-124; 2019.

ASSAIDI A, LEGSSYER A, BERRICHI A, AZIZ M, MEKHFI H, BNOUHAM M & ZIYYAT A. Hypotensive property of *Chenopodium ambrosioides* in anesthetized normotensive rats. *J Complement Integr Med*. 11(1):1-7; 2014.

AVILA-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. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2014:930208; 2014.

BACHIEGA TF, ORSATTI CL, PAGLIARONE AC, SFORCIN JM. The effects of propolis and its isolated compounds on cytokine production by murine macrophages. *Phytother Res*, 26(9):1308-13; 2012.

BRUSH M. Immunity is everything: As the pandemic brings attention to the immune system, many question the attitudes and assumptions about it. *Nutr. Bus. J*; 6–9, 2020.

BRUSH M. Don't talk about vaccines: Supplement brands wary to wade into the fray, for two big reasons. *Nutr. Bus. J*. 1–7, 2021.

BARD G, SAYED EA, WALY H, HASSAN KA, MAHMOUD MH, SELAMOGLU Z. The Therapeutic Mechanisms of Propolis Against CCl<sub>4</sub>-Mediated Liver Injury by Mediating Apoptosis of Activated Hepatic Stellate Cells and Improving the Hepatic Architecture through PI3K/AKT/mTOR, TGF- $\beta$ /Smad2, Bcl2/BAX/P53 and iNOS Signaling Pathways. *Cell Physiol Biochem*. 53(2):301-322; 2019.

BANKOVA V. Chemical diversity of propolis and the problem of standardization. *Journal of ethnopharmacology*, 100: 114–117; 2005.

BARAKAT AM, FADALY HAME, GAREH A, ABD EL-RAZIK KA, ALI FAZ, SALEH AA, SADEK SAS, DAHRAN N, EL-GENDY AEG, EL-KHADRAGY MF, ELMAHALLAWY EK. Wheat Germ Oil and Propolis Decrease Parasite Burden and Restore Marked Histopathological Changes in Liver and Lung in Mice with Chronic Toxoplasmosis. *Animals (Basel)*, 8;12(22):3069; 2022.

BARROSO MV, CATTANI-CAVALIERI I, DE BRITO-GITIRANA L, FAUTREL A, LAGENTE V, SCHMIDT M, PORTO LC, ROMANA-SOUZA B, VALENÇA SS, LANZETTI M. Propolis reversed cigarette smoke-induced emphysema through macrophage alternative activation independent of Nrf2. *Bioorg Med Chem*, 15;25(20):5557-5568; 2017.

BENINI EB, SARTORI MAB, BUSCH GC, REMPEL C, SCHULTZ G & STROHSCHOEN AAG. Valuation of native flora in terms of its phytotherapeutic potential. 2010. *Academic highlights magazine*, v. 2, n. 3, 2011.

BERGQUIST R, UTZINGER J & KEISER J. Controlling schistosomiasis with praziquantel: how much longer without a viable alternative? *Infect. Dis. Poverty* 6, 74; 2017.

BEZERRA JL, COSTA GC, LOPES TC, CARVALHO ICDS, PATRICIO FJ, SOUSA SM, AMARAL FMM, REBELO JMM, GUERRA RNM, RIBEIRO MNS, NASCIMENTO FRF. Evaluation of leishmanicidal activity in vitro of medicinal plants. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 16: 631–637; 2006.

BONAMIGO T, CAMPOS JF, ALFREDO TM, BALESTIERI JB, CARDOSO CA, PAREDES-GAMERO EJ, DE PICOLI SOUZA K, DOS SANTOS EL. Antioxidant, Cytotoxic, and Toxic Activities of Propolis from Two Native Bees in Brazil: *Scaptotrigona depilis* and *Melipona quadrifasciata anthidioides*. *Oxid Med Cell Longev*. 2017:1038153, 2017.

BOTROS S, SAYED H, AMER N, EL-GHANNAM M, BENNET JL. Current status of sensitivity to praziquantel in a focus of potential drug resistance in Egypt. *International Journal for Parasitology*, v. 35, n. 7, p. 787–791; 2005.

BOUFADI MY, SOUBHVE J, VAN ANTWERPEN P. Anti-inflammatory, antioxidant effects, and bioaccessibility of Tizirt propolis. *Journal of Food Biochemistry*, 45(4); 2021.

BOUFADI Y, SOUBHYE J, RIAZI A, ROUSSEAU A, VANHAEVERBEEK M, NÈVE J, VAN ANTWERPEN P. Characterization and Antioxidant Properties of Six Algerian Propolis Extracts: Ethyl Acetate Extracts Inhibit Myeloperoxidase Activity. *International Journal of Molecular Sciences*, 15(2), 2327–2345; 2014.

BRANDÃO MGL, PIGNAL M, ROMANIUC S, GRAEL CFF, FAGG CW. Useful Brazilian plants listed in the field books of the French naturalist Auguste de Saint-Hilaire (1779-1853). *Journal Ethnopharmacology*, 143 (2), 488-500; 2012.

BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Vigilância da Esquistossomose Mansonii: Diretrizes Técnicas. 4ª edição. Brasília: Ministério da Saúde. 2014.

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.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Guia de vigilância epidemiológica. Brasília: Ministério da Saúde, 2010.

BUENO-SILVA B, FRANCHIN M, ALVES CF, DENNY C, COLÓN DF, CUNHA TM, ALENCAR SM, NAPIMOGA MH, ROSALEN PL. Main pathways of action of Brazilian red propolis on the modulation of neutrophils migration in the inflammatory process. *Fitomedicina*, 1;23(13):1583-1590; 2016.

BURKE, M. L.; JONES, M. K.; GOBERT, G. N.; LI, Y. S.; ELLIS, M. K.; McMANUS, D. P. Immunopathogenesis of human schistosomiasis. *Parasite Immunology*, vol. 31, n. 4, p. 163 176, 2009.

BUTROUS G. Schistosome infection and its effect on pulmonary circulation. *Global cardiology science & practice*. 2019.

CALADO GP, LOPES AJO, JUNIOR LMC, LIMA FDCA, SILVA LA, PEREIRA WS & NASCIMENTO FR. *Chenopodium ambrosioides* L. Reduces synovial inflammation and pain in experimental Osteoarthritis. *PloS one*, 10: 11; 2015.

CALASANS TAS, SOUZA GTR, MELO CM, MADI RR, JERALDO VLS. Socioenvironmental factors associated with *Schistosoma mansoni* infection and intermediate hosts in an urban area of northeastern Brazil. *PLoS One*, 2;13(5):e0195519; 2018.

CANTANHEDE SPD, FERNANDEZ MA, MATTOS ACD, MONTRESOR LC, SILVA SN & 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*. 79-85; 2014.

CAPOCI IRG, BONFIM-MENDONÇA P DE S, ARITA GS, PEREIRA RR DE A, CONSOLARO MEL, BRUSCHI ML, NEGRI M, SVIDZINSKI TIE. Propolis is an efficient fungicide and inhibitor of biofilm production by vaginal *Candida albicans*. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2015:287693; 2015.

CARVALHO A, MARTINS FILHO A, OLIVEIRA RA. Immune response in the chronic form of *schistosomiasis mansoni*. In: CARVALHO, O.; COELHO, P.; LENZI, H. (Eds.). *Schistosoma mansoni* and schistosomiasis: a multidisciplinary view. 20 ed. Rio de Janeiro: Oswaldo Cruz Foundation, 670–716; 2008.

CARVALHO, ACB; NUNES, DSG; BARATELLI, TG; MAHMUD, NS; SHUQAIR, SAQ; NETTO, EM. Aspects of legislation in the control of herbal medicines. *T&C Amazônia*, Year V, N: 11; 2007.

CARVALHO OS, SCHOLTE RGC, GUIMARÃES RJPS, FREITAS CC, DRUMMOND SC, AMARAL RS, DUTRA LV, OLIVEIRA G, MASSARA CL, ENK MJ. The Estrada Real Project and endemic diseases: The case of Schistosomiasis, geoprocessing and tourism. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 532-536; 2010.

CATALANO, S.; SÈNE, M.; DIOUF, N. D.; FALL, C. B.; BORLASE, A.; LÉGER, E.; BÂ, K.; WEBSTER, J. P. Rodents as natural hosts of zoonotic *Schistosoma* species and hybrids: an epidemiological and evolutionary perspective from West Africa. *The Journal of Infectious Diseases*, vol. 218, n. 3, p. 429-433, 2018.

CHERMUT TR, FONSECA L, FIGUEIREDO N, DE OLIVEIRA LEAL V, BORGES NA, CARDOZO LF, CORREA LEITE PE, ALCARENGA L, REGIS B, DELGADO A, BERRETTA AA, RIBEIRO-ALVES M, MAFRA D. Effects of propolis on inflammation markers in patients undergoing hemodialysis: A randomized, double-blind controlled clinical trial. *Complement Ther Clin Pract*, 51:101732; 2023.

CHEVALLIER A. The encyclopedia of medicinal plants. New York: A D K Publishing Book. 1996.

CHE CT, ZHANG H. Plant Natural Products for Human Health. *Int J Mol Sci*. 2019 Feb 15;20(4):830.

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.

COLLEY DG, BUSTINDUY AL, SECOR WE, KING CH. This authoritative review concerns all aspects of human schistosomiasis, including diagnosis, epidemiology, immunology, mapping and surveillance, pathogenesis, morbidity and comorbidities, treatment, control and elimination. *Human schistosomiasis. Lancet* 383, 2253-2264; 2014.

CONTE FL, TASCA KI, SANTIAGO KB, DE OLIVEIRA CARDOSO E, ROMAGNOLI GG, DE ASSIS GOLIM M, BRAZ AMM, BERRETTA AA, DO ROSÁRIO DE SOUZA L, SFORCIN JM. Propolis increases Foxp3 expression and lymphocyte proliferation in HIV-infected people: A randomized, double blind, parallel-group and placebo-controlled study. *Biomed Pharmacother*, 142:111984; 2021.

CONTI BJ, SANTIAGO KB, BÚFALO MC, HERRERA YF, ALDAY E, VELAZQUEZ C, SFORCIN JM. Modulatory effects of propolis samples from Latin America (Brazil, Cuba and Mexico) on cytokine production by human monocytes. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 67(10), 1431–1438; 2015.

CONTI BJ, SANTIAGO KB, CARDOSO EO, FREIRE PP, CARVAHO RF, GOLIM MA, SFORCIN JM. Propolis modulates miRNAs involved in TLR-4 pathway, NF- $\kappa$ B activation, cytokine production and in the bactericidal activity of human dendritic cells. *J Pharm Pharmacol*, 68(12):1604-1612; 2016.

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

CRUZ GVB, PEREIRA PVS, PATRÍCIO FJ, COSTA GC, SOUSA SM, FRAZÃO JB, ARAGÃO-FILHO WC, MACIEL MCG, SILVA LA, AMARAL FMM, BARROQUEIRO ESB, GUERRA RNM, NASCIMENTO FRF. Increase of cellular recruitment, phagocytosis ability and nitric oxide production induced by hydroalcoholic extract from *Chenopodium ambrosioides* leaves. *Journal of Ethnopharmacology*, 148–154; 2007.

CUPIT PM, CUNNINGHAM C. What is the mechanism of action of praziquantel and how might resistance strike? *Future Med Chem*, 7(6):701-5; 2015.

CUTRIM RMN. Clinical and epidemiological aspects of schistosomiasis mansoni in three locations in Baixada Oeste Maranhense (1981-1993). Thesis (Doctorate in Tropical Medicine). Oswaldo Cruz Institute, 1995.

CYSNE DN, FORTES TS, REIS AS, DE PAULO RIBEIRO B, DOS SANTOS FERREIRA A, DO AMARAL FMM & NASCIMENTO FRF. Antimalarial potential of leaves of *Chenopodium ambrosioides* L. *Parasitology research*, 4327-4334; 2016.

DA SILVA DLF, BRAGA FILHO JAF, DOS SANTOS SAK, FORTES T, DO AMARAL FMM, SILVA LA & NASCIMENTO FRF. Anti-inflammatory potential of *Chenopodium ambrosioides* L. leaves in the hemorrhagic cystitis model in mice. *Health Sciences Magazine*, 25-32; 2015.

DA SILVA SS, MIZOKAMI SS, FANTI JR, MIRANDA MM, KAWAKAMI NY, TEIXEIRA FH, ARAÚJO EJ, PANIS C, WATANABE MA, SFORIN JM, PAVANELLI WR, VERRI WA Jr, FELIPE I, CONCHON-COSTA I. Propolis reduces *Leishmania amazonensis*-induced inflammation in the liver of BALB/c mice. *Parasitology Research*, 115(4):1557-66; 2015.

DE MORAES J, NASCIMENTO C, YAMAGUCHI LF, KATO MJ, NAKANO E. *Schistosoma mansoni*: in vitro schistosomicidal activity and tegumental alterations induced by pipartine on schistosomula. *Experimental Parasitology*. 132(2):222–227; 2012.

DENLOVE A, MAKANJUOLA W, TESLIM O, ALAFIA O, KASALI A, ESHILOKUM A. Toxicity of *Chenopodium ambrosioides* L. (Chenopodiaceae) products from Nigeria against three storage insects. *J Plant Prot Res*, 50(3):379–384; 2010.

DEWI LK, SAHLAN M, PRATAMI DK, AGUS A, AGUSSALIM SABIR A. Identifying propolis compounds potential to be covid-19 therapies by targeting sars-cov-2 main protease. *Int. J. Appl. Pharm*, 13:103–110; 2021.

DOENHOFF MJ, CIOLI D, UTZINGER J. Praziquantel: mechanisms of action, resistance and new derivatives for schistosomiasis. *Current opinion in infectious diseases*, 659-667; 2008.

EKPO UF, HURLIMANN E, SCHUR N, OLUWOLE AS, ABE EM, MAFE MA, POOPOLA TO. Mapping and prediction of schistosomiasis in Nigeria using compiled survey data and

Bayesian geospatial modelling. *Geospatial health: health applications in geospatial science*, 7, 355-366; 2013.

EL-GHAZALY MA, RASHED RR, KHAYYAL MT. Anti-ulcerogenic effect of aqueous propolis extract and the influence of radiation exposure. *Int J Radiat Biol*, 87(10):1045-51; 2011.

EL-SISI A, AWARA W, EL-MASRY T, EL-KOWRANY S, EL-GHARBAWY R. Effects and mechanism of action of immunomodulating agents against schistosomiasis-induced hepatic inflammation and fibrosis in mice. *Research in Pharmaceutical Biotechnology*, 3(4), 32-4; 2011.

ETHUR LZ, JOBIM JC, RITTER JG, OLIVEIRA G, TRINDADE BS. Formal trade and profile of consumers of medicinal plants and herbal medicines in the municipality of Itaqui - RS. *Rev. Bras Pl Med*, 1218; 2011.

FAIRFAX K, NASCIMENTO M, HUANG SC, EVERTS B, PEARCE EJ. Th2 responses in schistosomiasis. *Semin Immunopathol*, 34:863–71; 2012.

FARNESI AP, AQUINO-FERREIRA R, JONG D DE, BASTOS JK, SOARES AEE. Effects of stingless bee and honey bee propolis on four species of bacteria. *Genetics and Molecular Research*, 8: 635–640; 2009.

FENWICK A. Praziquantel: do we need another antischistosome treatment?. *Future Med. Chem.*, 7, 677-80; 2015.

FIORINI AC, SCORZA CA, DE ALMEIDA ACG, FONSECA M, FINSTERER J, FONSECA FL, SCORZA FA. Antiviral activity of brazilian green propolis extract against sars-cov-2 (Severe acute respiratory syndrome-coronavirus 2) infection: Case report and review. *Clinics*, 76; 2021.

FISCHER G, CLEFF MB, DUMMER LA, PAULINO N, PAULINO AS, VILELA C. DE O, VIDOR T. Adjuvant effect of green propolis on humoral immune response of bovines immunized with bovine herpesvirus type 5. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 116(1-2), 79–84; 2007.

FOUAD EA, TOALEB NI, HASSAN SE, EL SHANAWANY EE, KESHTA HG, ABDEL-RAHMAN EH, HEGAZI AG. Evaluation of the therapeutic effect of propolis on *Fasciola gigantica* and *Clostridium novyi* type B infections in sheep. *Trop Biomed.*, 1;38(2):102-110; 2021.

FRANCHIN M, FREIRES IA, LAZARINI JG, NANI BD, DA CUNHA MG, COLÓN DF, DE ALENCAR SM, ROSALEN PL. The use of Brazilian propolis for discovery and development of novel anti-inflammatory drugs. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 153, 49–55; 2018.

FREITAS KR, DOMINGOS DA SILVA LH, SQUARISI IA, DE SOUZA OLIVEIRA LT, RIBEIRO AB, ALVEZ BS, ESPERANDIM TR, DE MELO MRS, OZELIN SD, LEMES DC,



BASTOS JK, VENEZIANI RCS, TAVARES DC. Red propolis exhibits chemopreventive effect associated with antiproliferative and anti-inflammatory activities, *Toxicology Research*, 11: 750-757; 2022.

FUENTES-BAZAN S, UOTILA P, BORSCH T. A novel phylogeny-based generic classification for *Chenopodium sensu lato*, and a tribal rearrangement of *Chenopodioideae* (Chenopodiaceae). *Willdenowia*, Berlin, 5-24; 2012.

GALEOTTI F, MACCARI F, FACHINI A, VOLPINI. Chemical Composition and Antioxidant Activity of Propolis Prepared in Different Forms and in Different Solvents Useful for Finished Products. *Foods*, 19;7(3):41; 2018.

GBD (Global Burden of Disease). Mortality and Causes of Death Collaborators. Global, regional, and national under-5 mortality, adult mortality, age-specific mortality, and life expectancy, 1970–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet*, 390 (10100): 1151–1210; 2017.

GEKKER G, HU S, SPIVAK M, LOKENGGARD JR, PETERSON PK. Anti-HIV-1 activity of propolis in CD4+ lymphocyte and microglial cell cultures. *J. Ethnopharmacol.* 102:158–163; 2005.

GENTILE R, COSTA-NETO SF, D'ANDREA PS. A review on the participation of the water rat *nectomys squamipes* in the transmission dynamics of *schistosomiasis mansoni*: a long-term multidisciplinary study in an endemic area. *Oecologia Australis*, 14: 711-725; 2010.

GNANASEKAR M, SALUNKHE AM, MALLIA AK, HE YX & KALYVASUNDARAM R. Praziquantel affects the regulatory myosin light chain of *Schistosoma mansoni*. *Antimicrob. Agents Chemother*, 53, 1054–1060; 2008.

GRASSI TL, MALHEIROS A, SILVA MC, DA SILVA, BZ, MONGUILHOTT ED, FRODE TS, SOUSA MM. From popular use to pharmacological validation: a study of the antiinflammatory, anti-nociceptive and healing effects of *Chenopodium ambrosioides* extract. *Journal of Ethnopharmacology*, 127-138; 2013.

GRAY DJ, ROSS AG, LIYS & MC MANUS DP. Diagnosis and management of schistosomiasis. *BMJ* 342, d 2651; 2011.

GREENAWAY W, SCAYSBROOK T, WHATELY FR. The composition and plant origin of propolis: an oxford work report. *World of Bees*.1990; 71(3):107-118; 1990.

GRYSEELS B, POLMAN K, CLERINX J, KESTENS L. Human schistosomiasis. *The Lancet*, 368, 1106-1118; 2006.

GRYSEELS B. Schistosomiasis. *Infectus Disisease Clinics of North America*, 383-397; 2012.

GUILHERMINO JF. et al. Challenges and Complexity for Innovation based on Brazilian Biodiversity. *Pharmaceutical Research and Innovation Magazine*, 18-30; 2015.

HAMS, E.; AVIELLO, G.; FALLON, P. G. The *Schistosoma* granuloma: friend or foe? *Frontiers in Immunology*, vol. 4, n. 89, p. 1-8, 2013.

HARISMA AH, NURDIANSYAH R, SYAIFIE PH, NUGROHO DW, SAPUTRO KE, FIRDAYANI PRAKOSO CD, ROCHMAN NT, MAULANA NN, NOVIYANTO A, MARDLIYATI E. In silico investigation of potential inhibitors to main protease and spike protein of SARS-CoV-2 in propolis. *Biochem Biophys Reports*, 26: 100969; 2021.

HERBERT DR, HOLSCHER C, MORS M, ARENDSE B, SCHWEGNANN A, RADWANSKA M, LEETO M, KIRSCH R, HALL P, MOSSMANN H, CLAUSSEN B, FORSTER I, BROMBACHER F. Alternative macrophage activation is essential for survival during schistosomiasis and downmodulates T helper 1 responses and immunopathology. *Immunity*. 20(5):623-35. 2004.

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

HORI JI, ZAMBONI DS, CARRÃO DB, GOLDMAN GH, BERRETTA AA. The Inhibition of Inflammasome by Brazilian Propolis (EPP-AF). *Evid Based Complement Alternat Med*, 2013:418508; 2013.

HOTEZ PJ, ALVARO M, BASÁNEZ MG, BOLLGER I, BOURNE R, BOUSSINEG M, BROOKER SJ, BROWN AS, BUKLE G, BUDKE CM, CARABIN H, COFFENG LE, FEVRE EM, NAGHAVI M. The Global Burden of Disease Study 2010: Interpretation and Implications for the Neglected Tropical Diseases. *PLoS Negl Trop Dis.*, 8 (7): e2865; 2014.

HSIEH CY, LI LH, RAO YK, JU TC, NAI YS, CHEN YW, HUA KF. Mechanistic insight into the attenuation of gouty inflammation by Taiwanese green propolis through inhibition of the NLRP3 inflammasome. *J Cell Physiol*, 234(4):4081-4094; 2018.

HU F, HEPBURN HR, LI Y, CHEN M, RADLOFF SE, DAYA S. Effects of ethanol and water extracts of propolis (bee glue) on acute inflammatory animal models. *Journal of Ethnopharmacology*, 100(3), 276–283; 2005.

INSUNA V, ABALLAY E, MACAYA J. Nematicidal activity of aqueous plant extracts on *Xiphinema index*. *Nematologia Mediterranea*, 29(1): 35-40; 2001.

JABBAR A, ZAMAN MA, IQBAL Z, YASSEN M, Shamim A. Anthelmintic activity of *Chenopodium album* (L.) and *Caesalpinia crista* (L.) against trichostrongylid nematodes of sheep. *Journal of Ethnopharmacology*, 114(1):86–91; 2007.

JARDIM CM, JHAM GN, DHINGRA OD, FREIRE MM. Composition and antifungal activity of the essential oil of the brazilian *Chenopodium ambrosioides* L. *Journal of Chemical Ecology*. 34(9):1213–1218; 2008.

JENKINS SJ & ALLEN JE. Similarity and diversity in macrophage activation by nematodes, trematodes, and cestodes. *J. Biomed. Biotechnol.* 262–609; 2010.

KABALA-DZIK A, RZEPECKA-STOJKO A, KUBINA R, JASTRZEBSKA-STOJKO Z, STOJKO R, WOJTYCZKA RD, STOJKO J. Comparison of Two Components of Propolis: Caffeic Acid (CA) and Caffeic Acid Phenethyl Ester (CAPE) Induce Apoptosis and Cell Cycle Arrest of Breast Cancer Cells MDA-MB-231. *Molecules*, 15:22(9); 2017.

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.

KARAGECILI H, YILMAZ MA, ERTURK A, KIZILTAS H, GUVEN L, ALWASEL SH, GULIN İ. Comprehensive Metabolite Profiling of Berdav Propolis Using LC-MS/MS: Determination of Antioxidant, Anticholinergic, Antiglaucoma, and Antidiabetic Effects. *Molecules*, 11;28(4):1739; 2023.

KARAOGLU Ö, SERHATHL M, PELVAN E, KARADENİZ B, DEMIRTAS I, ÇAKIRCA G, SIPAHİX H, ÖZHAN Y, KARAPINAR G, CHAREHSAZ M, AYDIN A, YESİLADA E, ALASALVAR C. Chewable tablet with herbal extracts and propolis arrests Wuhan and Omicron variants of SARS-CoV-2 virus. *J Funct Foods*, 105:105544; 2023.

KASHIWAKURA JI, YOSHIHARA M, SAINTOH K, KAGOHASHI K, SASAKI Y, KOBAYASHI F, INAGAKI I, KITAI Y, MUMOROTO R, MATSUDA T. Propolis suppresses cytokine production in activated basophils and basophil-mediated skin and intestinal allergic inflammation in mice. *Allergol Int.* 70(3):360-367, 2020.

KATZ N, ALMEIDA K. Esquistossomose, xistosa, barriga d'água. *Ciência e Cultura*, 55 (1):38-43; 2003.

KIMOTO T, ARAI S, KOHGUCHI M, AGA M, NOMURA Y, MICALLEF MJ, KURIMOTO M, MITO K. Apoptosis and suppression of tumor growth by artepillin C extracted from Brazilian propolis. *Prev Cancer Detection*, 22(6):506-15; 1998.

KNOPP S, BECKER SL, INGRAM KJ, KEISER J & UTZINGER J. Diagnosis and treatment of schistosomiasis in children in the era of intensified control. Expert review of anti-infective therapy, 11(11), 1237-1258; 2013.

KOYA-MIYATA S, ARAI N, MIZOTE A, TANIGUCHI Y, USHIO S, IWAKI K, FUKUDA S. Propolis prevents diet-induced hyperlipidemia and mitigates weight gain in diet-induced obesity in mice. *Biol Pharm Bull*, 32(12):2022-8; 2009.

KUMAR V, SARI AN, MEIDINNA HN, KAUL A, BASU B, ISHIDA Y, TERAOKA K, KAUL SC, VRATI S, SUNDAR D, WADHWA R. Computational and experimental evidence of the anti-COVID-19 potential of honeybee propolis ingredients, caffeic acid phenethyl ester and artepillin c. *Phytother Res*, 37(9):3651-3654; 2023.

KUREK-GÓRECKA A, KESKIN Ş, BOBIS O, FELITTI R, GÓRECKI M, OTREBA M, STOLKO J, OLCZYK P, KOLAYLI S, RZEPECKA-STOLKO A. Comparison of the Antioxidant Activity of Propolis Samples from Different Geographical Regions. *Plants (Basel)*, 29;11(9):1203; 2022.

KURUP R & HUNJAN GS. Epidemiology and control of Schistosomiasis and other intestinal parasitic infections among school children in three rural villages of south Saint Lucia. *Journal of Vector Borne Diseases*, 47(4), 228; 2010.

KWON MJ, SHIN HM, PERUMALSAMY H, WANG X, AHN YJ. Antiviral effects and possible mechanisms of action of Brazilian propolis constituents and related compounds. *J. Apic. Res*, 59:413–425; 2020.

LEAL NETO OB, GOMES EC, OLIVEIRA JUNIOR FJ, ANDRADE R, REIS DL, SOUZA-SSANTOS R, BOCANEGRA S, BARBOSA CS. Biological and environmental factors associated with risk of *schistosomiasis mansoni* transmission in Porto de Galinhas, Pernambuco State, Brazil. *Cad Public Health*, 29(2):357-67; 2013.

LIBERIO SA, PEREIRA AL, DUTRA RP, REIS AS, ARAÚJO MJ, MATTAR NS, SILVA LA, RIBEIRO MN, NASCIMENTO FR, GUERRA RN, MONTEIRO-NETO V. Antimicrobial activity against oral pathogens and immunomodulatory effects and toxicity of geopropolis produced by the stingless bee *Melipona fasciculata* Smith. *BMC Compl. Alternative Med*. 11 (1), 108; 2011.

LIMA JLS, FURTADO DA, PEREIRA JPG, BARACUTHY JGV, XAVIER HS. Plantas medicinais de uso comum no Nordeste do Brasil, Campina Grande, 2006.

LIMA JUNIOR JÁ, COSTA GC, REIS AS, BEZERRA JL, PATRÍCIO FJB, SILVA LA, AMARAL FMM, NASCIMENTO FR. Inhibition of in vitro infection of macrophages by *Leishmania amazonensis* by extract and fractions of *Chenopodium ambrosioides* L. *Revista Ciências da Saúde*, 16 (1): 46-53; 2014.

LIMA LF, DATIANE DE M OLIVEIRA-TINTINO C, MATOS YMLS, MORAIS-BRAGA MFB, MENEZES IRA, BALBINO VQ, COUTINHO HDM, SIQUEIRA-JÚNIOR JP, ALMEIDA JRGS, TINTINO SR. Inhibition of the TetK efflux-pump by the essential oil of *Chenopodium ambrosioides* L. and  $\alpha$ -terpinene against *Staphylococcus aureus* IS58. *Food and Chemical Toxicology*, 1: 1-5; 2017.

LIRA MGS, NOGUEIRA RA, LICÁ ICL, FRAZÃO GCCG, DOS SANTOS VAF, MENDES ACC, RODRIGUES JGM, MIRANDA GS, SILVA LA, GUERRA RNM, CARVALHO RC, NASCIMENTO FRF. Immunomodulating and Anti-parasitary Mechanisms of Plant Products in the Treatment of Schistosomiasis. *BRAZILIAN JOURNAL OF PHARMACOGNOSY*, v. 33, p. 1-16, 2023.

LICÁ ICL, FRAZÃO GCCG, NOGUEIRA RA, LIRA MGS, DOS SANTOS VA, RODRIGUES JGM, MIRANDA GS, CARVALHO RC, SILVA LA, GUERRA RNM,

NASCIMENTO FRF. Immunological mechanisms involved in macrophage activation and polarization in schistosomiasis. *Parasitol* 150:401–415; 2023.

LoVERDE PT. Schistosomiasis. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 1154, 45–70; 2019.

MACHADO JL, ASSUNÇÃO AKM, DA SILVA MCP, REIS AS DOS, COSTA GC, ARRUDA D DE S, ROCHA BA, VAZ MM DE OLL, PAES AM DE A, GUERRA RNM. Brazilian green propolis: anti-inflammatory property by an immunomodulatory activity. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2012:2012:157652; 2012.

MACHÍN L, TAMARGO B, PIÑÓN A, ATÍES RC, SCULL R, SETZER WN & MONZOTE L. *Bixa orellana* L. (Bixaceae) and *Dysphania ambrosioides* (L.) Mosyakin & Clemants (Amaranthaceae) Essential Oils Formulated in Nanocochleates against *Leishmania amazonensis*. *Molecules*. 24(23):4222; 2019.

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.

MAHANI M, SULAEMAN A, FAISAL A, MUHAMMAD RMD, HARDINSYAH H, PLOEGER A. Efficacy of Propolis Supplementation to Accelerate Healing Process and Body Weight Recovery of Pulmonary Tuberculosis Patients. *J. Gizi Pangan*, 13(1):1-10; 2018.

MOMTAZI-BOROJENI AA, KATSIKI N, PIRRO M, BANACH M, RASADI KA, SAHEBKAR A. Dietary natural products as emerging lipoprotein(a)-lowering agents. *J Cell Physiol*; 234(8):12581-12594; 2019.

MAZIGO HD, NUWAHA F, KINUNGI SM, MORONA D, PINOT DE MOREIRA A, WILSON S, HEUKELBACH J, DUNNE DW. Epidemiology and control of human schistosomiasis in Tanzania. *Parasit Vectors*, 28;5:274; 2012.

McMANUS DP, DUNNE DW, SACKO M, UTZINGER J, VENNERVALD BJ. ZHOU XN. Schistosomiasis. *Nature Reviews Disease primers*, vol. 4, n. 1, p. 13, 2018.

MEBIUS MM, VAN GENDEREN PJ, URBANUS RT, TIELENS AG, DE GROOT PG & VAN HELLEMOND JJ. Interference with the host haemostatic system by schistosomes. *PLoS pathogens*, v. 9, n. 12; 2013.

MENDES L., MAIA FILHO, A. L. M., NASCIMENTO, L. R. S., COSTA, C. L. S., SERVIO, E. M. L., SANTOS, I. M. S. P., ARAUJO, K. S. Cicatrização de feridas com a utilização do extrato de *Chenopodium ambrosioides* (mastruz) e cobertura secundária estéril de gaze em ratos. *Com Scientiae Saúde*, 2011.

MENDES RJA. Temporal and spatial analysis of schistosomiasis mansoni in the state of Maranhão from 2007 to 2016. Dissertation (Master's) – Postgraduate program in Health and Environment /CCBS, Federal University of Maranhão, São Luís, MA, 2019.

MESSIAS MCTB, MENEGATTO MF, PRADO ACC, SANTOS BR, GUIMARÃES MFM. Popular use of medicinal plants and socioeconomic profile of users: a study in an urban area in Ouro Preto, MG, Brazil. *Brazilian Journal of Medicinal Plants*, 17 (1): 76-104; 2015.

MIRANDA GS, MIRANDA BS, RODRIGUES JGM, LIRA MGS, NOGUEIRA RA, VIEGAS-MELO D, SILVA-SOUZA N. Research Note. The wild water-rats and their relevance in the context of *schistosomiasis mansoni* in Brazil: what we know and recommendations for further research. *Helminthologia*, vol. 54, n. 2, p. 165-169, 2017.

MIRYAN M, SOLEIMANI D, DEGHANI L, SOHRABI K, KHORVASH F, BAGHERNIYA M, SAYEDI SM, ASKARI G. The effect of propolis supplementation on clinical symptoms in patients with coronavirus (COVID-19): A structured summary of a study protocol for a randomised controlled trial. *Trials*, 3;21(1):996; 2020.

MOHAMED AM, METWALLY NM, MAHMOUD SS. Sativa seeds against *Schistosoma mansoni* differet satages. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 74: 257 264; 2005.

MOHAMED AH, HASSAB El-Nabi SE, BAYOMI AE, ABDELAAL AA. Effect of bee venom or propolis on molecular and parasitological aspects of *Schistosoma mansoni* infected mice. *Journal of parasitic diseases : official organ of the Indian Society for Parasitology*, 40(2), 390–400; 2016.

MOJARAB S, SHAHBAZZADEH D, MOGHBELI M, ESHRAGHI Y, BAGHERI KP, RAHIMI R, SAVOJI MA, MAHDAVI M. Immune responses to HIV-1 polytope vaccine candidate formulated in aqueous and alcoholic extracts of Propolis: Comparable immune responses to Alum and Freund adjuvants. *Microb Pathog*, 140:103932; 2020.

MONTEIRO GKM, PIMENTEL GRS, CARVALHO HBS, SILVA JAM, SILVA JES, NASCIMENTO CEC. PERFIL DA MORTALIDADE POR ESQUISTOSSOMOSE NO MARANHÃO. *Anais da XXVI Jornada de Parasitologia e Medicina Tropical do Maranhão/ VI Congresso Maranhense de História da Medicina*. UFMA, SÃO LUÍS/MA, 2018.

MONZOTE L, PASTOR J, SCULL R, GILLE L. Antileishmanial activity of essential oil from *Chenopodium ambrosioides* and its main components against experimental cutaneous leishmaniasis in BALB/c mice. *Phytomedicine*, v. 21, n. 8-9, p. 1048-1052; 2014.

MUJICA V, ORREGO R, PÉREZ J, ROMERO P, OVALLE P, ZÚNIGA-HERNÁNDEZ J, ARREDONDO M, LEIVA E. The Role of Propolis in Oxidative Stress and Lipid Metabolism: A Randomized Controlled Trial. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2017:4272940; 2017.

MUTH S, SAYASONE S, ODERMATT-BIAYS S, PHOMPIDA S, DUAONG S, ODERMATT P. *Schistosoma mekongi* in Cambodia and the Lao People's Democratic Republic. *Adv. Parasitol.* 72, 179-203; 2010.

NASCIMENTO FRF, CRUZ GV, PEREIRA PVS, MACIEL MC, SILVA AL, AZEVEDO APS, GUERRA RN. Ascitic and solid Ehrlich tumor inhibition by *Chenopodium ambrosioides* L. treatment. Life Science, v. 78, n. 22, p. 2650–2653; 2006.

NEIVA VA, RIBEIRO MNS, CARTÁGENES MSS, MORAES-COUTINHO DF, NASCIMENTO FRF, REIS AS, AMARAL FMM. Pre-clinical studies of the giardicidal activity of *Chenopodium ambrosioides* L. and the standardization of extracts in the research and development of herbal medicines. Health Sciences Magazine, 13 (2); 2011.

NEVES DP, MELO AL, LINARDI PM, VITOR RWA. Parasitologia Humana. 13ª ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 616; 2016.

NEWMAN DJ, CRAGG GM. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. Journal of natural products, 75 (3): 311-335; 2016.

NIE J, CHANG Y, LI Y, ZHOU Y, QIN J, SUN Z, LI H. Caffeic Acid Phenethyl Ester (Propolis Extract) Ameliorates Insulin Resistance by Inhibiting JNK and NF- $\kappa$ B Inflammatory Pathways in Diabetic Mice and HepG2 Cell Models. J Agric Food Chem, 18;65(41):9041-9053; 2017.

NOBREGA DE SOUSA T, MENEZES NA, ALVES BCF. “Omics” in the Elsevier B.V, 19, 258–73; 2013.

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

NOGUEIRA RA, LIRA MGS, LICÁ ICL, FRAZÃO GCCG, DOS SANOTOS VAF, FILHO ACCM, RODRIGUES JGM, MIRANDA GS, CARVALHO RC, NASCIMENTO FRF. Praziquantel: An update on the mechanism of its action against schistosomiasis and new therapeutic perspectives. Mol Biochem Parasitol, 252:111531; 2022.

NUNES GS, MENDES RJ, FRANÇA CRC, PEREIRA FILHO AA, TAVARES CP & ROSA IG. Malacological investigation to identify the expansion cell of *schistosomiasis mansoni* in Vila Embratel, a neighborhood on the outskirts of São Luís do Maranhão. Research Notebooks. 2013.

OLIVEIRA AS, NASCIMENTO JR, TROVÃO LO, ALVES PCS, MACIEL MCG, SILVA LDM, MARQUES AA, SSANTOS APSA, SILVA LA, NASCIMENTO FRF, GUERRA RNM. The anti-inflammatory activity of *Anacardium occidentale* L. increases the lifespan of diabetic mice with lethal sepsis. J. Ethnopharmacol. 236, 345–353/ 2019.

OLIVEIRA TFF, COSTA DD, MENDINÇA AF, DOS SANTOS JUNIOR GR, DE SOUSA AMB. EPIDEMIOLOGICAL PROFILE OF SCHISTOSOMIASIS IN THE STATE OF MARANHÃO BETWEEN THE YEARS OF 2018 TO 2022. Multidisciplinary Health Journal, V. 4, Nº 1, 2023.

ORSATTI CL, MISSIMA F, PAGLIARONE AC, BACHIEGA TF, BÚFALO MC, ARAÚJO JP Jr, SFORCIN JM. Propolis immunomodulatory action in vivo on Toll-like receptors 2 and 4

expression and on pro-inflammatory cytokines production in mice. *Phytother Res*, 24(8):1141-6; 2010.

PAHLAVANI N, MALEKAHMADI M, SEDAGHAT A, ROSTAMI A, ALKADIR OKA, TAIFI A, RANJBAR G, SAHEBKAR A, ABDELBASSET WK, BEIGMOHAMMADI MT, MIR M, BAGHERI MOGHADDAM A, TABESH H, SADEGHI O, GHOLIZADEH NAVASHENAQ J, FIROUZI S, FATHI NAJAFI M, SAFARIAN M, GHAYOUR-MOVARHAN M. Effects of Melatonin and Propolis Supplementation on Inflammation, Oxidative Stress, and Clinical Outcomes in Patients with Primary Pneumosepsis: A Randomized Controlled Clinical Trial. *Complement Med Res*, 29(4):275-285; 2022.

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

PARK YK, ALENCAR SM, AGUIAR CL. Botanical origin and chemical composition of Brazilian propolis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 50, n. 9, p. 2502–2506; 2002.

PAUL W, ZHU J. How are  $T_H2$ -type immune responses initiated and amplified? *Nat Rev Immunol*, 10, 225–235; 2010.

PAVELA R, MAGGI F, LUPIDI G, MBUNTCHA H, WOGUEM V, WOMENI HM & BENELLI G. *Clausena anisata* and *Dysphania ambrosioides* essential oils: from ethno-medicine to modern uses as effective insecticides. *Environ Sci Pollut Res Int*. 25(11):10493-10503; 2018.

PEARCE EJ, MacDONALD AS. The immunobiology of schistosomiasis. *Nat Rev Immunol*, 2:499–511; 2002.

PENHA ESD, LACERDA-SANTOS R, CARVALHO MGF, OLIVEIRA PT. Effect of *Chenopodium ambrosioides* on the healing process of the in vivo bone tissue. *Microsc Res Tech*. 80(11):1167-1173; 2017.

PEREIRA WS, DA SILVA GP, VIGLIANO MV. Anti-arthritis properties of crude extract from *Chenopodium ambrosioides* L. leaves. *J Pharm Pharmacol*. 70(8):1078-1091; 2018.

PEREIRA WS, RIBEIRO BP, SOUSA AI, SERRA IC, MATTAR NS, FORTES TS & NASCIMENTO FR. Evaluation of the subchronic toxicity of oral treatment with *Chenopodium ambrosioides* in mice. *Journal of ethnopharmacology*, 127(3), 602-605; 2010.

RONDANELLI M, FALIVA MA, BARRILE GC, CAVIONI A, MANSUETO F, MAZZOLA G, OBERTO L, PATELLI Z, PIROLA M, TARTARA A, RIVA A, Petrangolini G, Peroni G. Nutrition, Physical Activity, and Dietary Supplementation to Prevent Bone Mineral Density Loss: A Food Pyramid. *Nutrients*; 24;14(1):74; 2021.

PIÑEROS AR, DE LIMA MHF, RODRIGUES T, GEMBRE AF, BERTOLINI TB, FONSECA MD, BERRETTA AA, RAMALHO LNZ, CUNHA FQ, HORI JI. Green propolis increases myeloid suppressor cells and CD4<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> cells and reduces Th2 inflammation in the lungs after allergen exposure. *Journal of ethnopharmacology*, 252: 112496; 2020.



PINHEIRO NETO VF, RIBEIRO RM, MORAIS CS, CAMPOS MB, VIEIRA DA, GUERRA PC, ABREU-SILVA AL, SILVA JUNIOR JR, NASCIMENTO F, BORGES M & BORGES A. *Chenopodium ambrosioides* as a bone graft substitute in rabbits radius fracture. *BMC complementary and alternative medicine*, 17(1), 350; 2017.

RAMOS CM. Ocorrência e positividade de *Biomphalaria glabrata* por *Schistosoma mansoni* no bairro da Vila Embratel e sua relação como ambiente. 2007. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) – Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2007.

REDHNO D, PURWANTO B, WASITA B, INDARTO D, SETYA AADJI R, KUSUMAWARDANI A, CILMIATY R. The effect of Ethanolic extract of Indonesian propolis on endothelial dysfunction and Multi Organ dysfunction syndrome in anthrax animal model. *Saudi J Biol Sci*, 29(2):1118-1124; 2022.

RODRIGUES JGM, ALBURQUERQUE 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*. 264: 113287; 2021.

ROLLINSON D, KNOPP S, LEVITZ S, STOTHARD JR, TCHUEBTÉ LAT, GARBA A & UTZINGER J. Time to set the agenda for schistosomiasis elimination. *Acta tropica*, 128(2): 423-440; 2013.

ROSS AGBP, SLEIGH AC, OLDS GR, LI Y, WILLIAMS GM, MCMANUS DP. Esquistossomose. *N. Engl. J. Med*. 346, 1212-1220; 2002.

SALATINO A, TEIXEIRA ÉW, NEGRI G, MESSAGE D. Origin and Chemical Variation of Brazilian Propolis. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2: 33–38; 2005.

SANTOS AM, MELO ACF. L. Schistosomiasis prevalence in Tutóia village, Maranhão, Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 44(1): 97-99; 2011.

SCHWARTZ C, FALLON PG. *Schistosoma* "Eggs-Itting" the Host: Granuloma Formation and Egg Excretion. *Frontiers in Immunology*, 29(9) 2492; 2018.

SENNA, L. 2015. Dysphania in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/FichaPublicaTaxonUC/FichaPublicaTaxonUC.do?id=FB139759>

SETO EY W, WONG BK, LU D, ZHONG B. Human schistosomiasis resistance to praziquantel in China: Should we be worried?. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 85(1) 74-82; 2011.

SFORCIN JM, FERNANDES JÚNIOR A, LOPES CAM, FUNARI SRC, BANKOVA V. Seasonal effect of Brazilian propolis on *Candida albicans* and *Candida tropicalis*. *Journal of Venomous Animals and Toxins*, 7: 139–144; 2001.

SHANG H, SRIKANTH BHAGAVATHULA A, ALI ALDHALEEI W, RAHMANI J, KARAM G, RINALDI G, CLARK C, SALAHISAHLABADI A, YUAN Q. Effect of propolis supplementation on C-reactive protein levels and other inflammatory factors: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Journal of King Saud University-Science*, 32(2), 1694–1701; 2020.

SHIMIZU Y, SUZUKI T. Brazilian propolis extract reduces intestinal barrier defects and inflammation in a colitic mouse model. *Nutr Res*, 69 :30-41; 2019.

SIHERI W, EBILOMA GU, IGOLI JO, GRAY AI, BIDDAU M, AKRACHALANONT P, ALENEZI S, ALWASHIH MA, EDRADA-EBEL R, MULLER S, LAWRENCE CE, FEARNLEY J, WATSON DG, De KONING HP. Isolation of a Novel Flavanonol and an Alkylresorcinol with Highly Potent Anti-Trypanosomal Activity from Libyan propolis. *Molecules*, 15;24(6):1041; 2019.

SILVA AGS. Avaliação do efeito do extrato hidroalcoólico das folhas de *Chenopodium ambrosioides* L. sobre *Schistosoma mansoni* SAMBON, 1907. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade Federal do Maranhão, 2012.

SILVA MP, SILVA TM, MENGARDA AC, SALVADORI MC, TEIXEIRA FS, ALENCAR SM, LUZ FILHO GC, BUENO-SILVA B, DE 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*, 10;264:113387; 2021.

SILVEIRA MAD, DE JONG D, BERRETTA AA, GALVÃO EBDS, RIBEIRO JC, CERQUEIRA-SILVA T, AMORIM TC, CONCEIÇÃO LFMRD, GOMES MMD, TEIXEIRA MB, SOUZA SP, SANTOS MHCAD, SAN MARTIN RLA, SILVA MO, LÍRIO M, MORENO L, SSAMPAIO JCM, MENDONÇA R, ULTCCHAK SS, AMORIM FS, RAMOS JGR, BATISTA PBP, GUARDA SNFD, MENDES AVA, PASSOS RDH; BeeCovid Team. Efficacy of Brazilian green propolis (EPP-AF®) as an adjunct treatment for hospitalized COVID-19 patients: A randomized, controlled clinical trial. *Biomed Pharmacother*, 38:111526; 2021.

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*, 8(3):151-169; 2018.

SOARES CD, CARVALHO MG, CARVALHO RAD, TRINDADE SRP, RÊGO ACMD, ARAÚJO-FILHO I & MARQUES MM. *Chenopodium ambrosioides* L. extract prevents bone loss. *Acta Cir Bras*. 30(12):812-818; 2015.

SOARES MH, DIAS HJ, VIEIRA TM, DE SOUZA MG, CRUZ AF, BADOCO FR & TAVARES DC. Chemical Composition, Antibacterial, Schistosomicidal, and Cytotoxic

Activities of the Essential Oil of *Dysphania ambrosioides* (L.) Mosyakin & Clemants (Chenopodiaceae). *Chem Biodivers.* 14(8):10; 2017.

SOLEIMANI D, MIRYAN M, HADI V, GHOLIZADEH NAVASHENAG J, MOLUDI J, SAYEDI SM, BAGHERNIYA M, ASKARI G, NACHVAK SM, SADEGHIE, RASHIDI AA, HADI S. Effect of propolis supplementation on athletic performance, body composition, inflammation, and oxidative stress following intense exercise: A triple-blind randomized clinical trial. *Food Sci Nutr*, 8;9(7):3631-3640; 2021.

SONG MY, LEE DY, KIM EH. Anti-inflammatory and anti-oxidative effect of Korean propolis on *Helicobacter pylori*-induced gastric damage in vitro. *J Microbiol*, 58(10):878-885; 2020.

SOUSA MP, MATOS FDA., MATOS MEO, CRAVEIRO AA. Constituintes químicos ativos e propriedades biológicas de plantas medicinais brasileiras. Fortaleza: Editora UFC, 448p. 2004.

SOUZA FPC, VITORINO RR, COSTA AP, JÚNIOR FCF, SANTANA LA, GOMES AP. *Schistosomiasis mansoni*: general aspects, immunology, pathogenesis and natural history. *Journal of the Brazilian Society of Clinical Medicine*. 9 (4): 300-7; 2011.

STANDLEY, C. J.; MUGISHA, L.; VERWEIJ, J. J.; ADRIKO, M.; ARINAITWE, M.; ROWELL, C.; ATUHAIRE, A.; BETSON, M.; HOBBS, E.; VAN TULLEKEN, C. R.; KANE, R. A.; VAN LIESHOUT, L.; AJAROVA, L.; KABATEREINE, N. B.; RUSSELL STOTHARD, R. J. Confirmed infection with intestinal schistosomiasis in semi-captive wild-born chimpanzees on Ngamba Island, Uganda. *Vector Borne and Zoonotic Diseases*, vol. 11, n. 2, p. 169–176; 2011.

STEINMANN P, KEISER J, BOS R, TANNER M, UTZINGER J. Schistosomiasis and water resources development: systematic review, meta-analysis, and estimates of people at risk. *Lancet Infectious Diseases* 6, 411–425; 2006.

STOTHARD JR, SOUSA-FIGUEIREDO JC, BETSON M, BUTSTINDUY A, REINHARD-RUPP J. Schistosomiasis in African infants and preschool children: let them now be treated! *Trends in parasitology*, 29(4) 197-205; 2013.

SUN C, WU Z, WANG Z, ZHANG H. Effect of Ethanol/Water Solvents on Phenolic Profiles and Antioxidant Properties of Beijing Propolis Extracts. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2015:595393, 2015.

TAO Y, WANG D, HU Y, HUANG Y, YU Y, WANG D. The Immunological Enhancement Activity of Propolis Flavonoids Liposome In Vitro and In Vivo. *Alternative Medicine*, 2014:483513; 2014.

TASCA KI, CONTE FL, CORREA CR, SANTIAGO KB, CARDOSO EO, MANFIO VM, GARCIA JL, BERRETTA AA, SARTORI AA, HONORIO MDS, SOUZA LDR, SFORCIN JM. Propolis consumption by asymptomatic HIV-individuals: Better redox state? A prospective, randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Biomed Pharmacother*, 162:114626; 2023.

TCHUEM TCHUNTÉ LA, SOUTHGATE VR, JOURDANE J, WEBSTER BL & VERCRUYSSSE J. *Schistosoma intercalatum*: an endangered species in Cameroon? *Tendências Parasitol.* 19, 389-393; 2003.

TISCHENDORF, F. On the evolution of the spleen. *Experientia*, 41: 145-152; 1985.

TORETI VC, SATO HH, PASTORE GM, PARK YK. Recent progress of propolis for its biological and chemical compositions and its botanical origin. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2013:697390; 2013.

TSURUTA H, MIZUNO-KAMIYA M, TAKAHASHI M, ANDO M, IKENO K, UENO K, TAKAYAMA E, KAWAKI H, NAKAMURA G, NIKAIDO T, FUJITA H, KONDOH N. Enhanced production of IL-2 from anti-CD3 antibody-stimulated mouse spleen cells by artemisinin C, a major component of Brazilian green propolis. *J Oral Biosci*, 64(3):366-375; 2022.

TURKEZ H, YOUSEF MI, GEYIKOGLU F. Propolis protects against 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-induced toxicity in rat hepatocytes. *Food and Chemical Toxicology*, 50(6):2142-8; 2011.

TURNER JD, JENKINS GR, HOGG KG, AYNSLEY SA, PAVELEY RA, COOL PC, MOUNTGORD AP. CD4+ CD25+ regulatory cells contribute to the regulation of colonic Th2 granulomatous pathology caused by schistosome infection. *PLoS Negl Trop Dis*, 5(8):1269; 2011.

UTZINGER J, KEISER J, SHUHUA X, TANNER M, SINGER BH. Combination chemotherapy of schistosomiasis in laboratory studies and clinical trials. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47: 1487-1495; 2003.

VALE N. GOUVEIA MJ, RINALDI G, BRINDLEY PJ, GARTNER F & DA COSTA JMC Praziquantel for schistosomiasis: single-drug metabolism revisited, mode of action, and resistance. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, v. 61, n. 5, p. e02582-16, 2017.

VALÉCIO M. Fitoterápicos ganham espaço: guia da farmácia. São Paulo, 2016. Disponível em: <<http://www.guiadafarmacia.com.br/suplementos-especiais/fito/fito-2016/10793-fitoterapicos-ganham-espaco>>. Acesso em: 02 mar. 2020.

VASCONCELOS DA, LIMA MMO, ALCOFORADO GG. Plantas medicinais de uso caseiro: conhecimento popular na região do centro do município de Floriano/PI. V Congresso Norte e Nordeste de Pesquisa e Inovação, Maceió, 2010. *Anais CONNEPI 2010*, 2010.

VERJEE MA. Schistosomiasis: still a cause of significant morbidity and mortality. *Research and Reports in Tropical Medicine* 10, 153–163; 2019.

VERLOOVE FA. New combination in Oxybasis (Amaranthaceae). *New Journal of Botany*, 3 (1): 59-60; 2013.

WAGH VD. Propolis: A wonder bees product and its pharmacological potentials. *Adv. Pharmacol. Sci.* 2013;308249; 2013.

WANG Q, DA'DARA AA & SKELLY PJ. The human blood parasite *Schistosoma mansoni* expresses extracellular tegumental calpains that cleave the blood clotting protein fibronectin. *Sci Rep* 7, 12912, 2017.

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

WANG X, YU D, LI C, ZHAN T, ZHANG T, MA H, XU J, XIA C. In vitro and in vivo activities of DW-3-15, a commercial praziquantel derivative, against *Schistosoma japonicum*. *Parasit Vectors*, 3;12(1):199; 2019.

WEERAKOON KGAD, GOBERT GN, CAI P, MCMANUS DP. Advances in the Diagnosis of Human Schistosomiasis. *Clinical Microbiology Reviews*, 28 (4): 939– 967, 2015.

WEI Y, HUANG N, CHEN S, CHEN D, LI X, XU J, YANG Z. The diagnosis and treatment introspection of the first imported case of atypical cerebral schistosomiasis in Guangzhou city. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 12, e0006171; 2018.

WHO – WORLD HEALTH ORGANIZATION. Schistosomiasis: Fact sheet. 2018. [https://www.who.int/health-topics/schistosomiasis#tab=tab\\_1](https://www.who.int/health-topics/schistosomiasis#tab=tab_1) > Acesso em 06 de maio de 2020.

WHO, 2023. World Health Organization. Obesity. [https://www.who.int/health-topics/obesity/#tab=tab\\_1](https://www.who.int/health-topics/obesity/#tab=tab_1). Accessed May 23, 2023.

XUE M, LIU Y, XU H, ZHOU Z, MA Y, SUN T, LIU M, ZHANG H, LIANG H. Propolis modulates the gut microbiota and improves the intestinal mucosal barrier function in diabetic rats. *Biomed Pharmacother*, 118:109393; 2019.

YANG Q, WANG B, YU H, ZHU Y, WANG X, JIANG H, WANG C, PENG J, HOU M. TLR7 promotes Th1 polarization in immune thrombocytopenia. *Thromb. Res.* 128 (3), 237– 242; 2011.

ZAGO PMW, DOS SANTOS CBSJ, DE ALBUQUERQUE BFL. Anti-biofilm Action of *Chenopodium ambrosioides* Extract, Cytotoxic Potential and Effects on Acrylic Denture Surface. *Front Microbiol.* 2019; 10:1724; 2019.

ZAKERKISH M, JENABI M, ZAEEMZADEH N, HEMMATI AA, NEISI N. The Effect of Iranian Propolis on Glucose Metabolism, Lipid Profile, Insulin Resistance, Renal Function and

Inflammatory Biomarkers in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus: A Randomized Double-Blind Clinical Trial. *Sci Rep.* 13;9(1):7289; 2019.

ZAMILPA A, GARCÍA-ALANÍS C, LÓPEZ-ARELLANO ME, HERNÁNDEZVELÁZQUEZ VM, VALLADARES-CISNEROS MG, SALINAS-SÁNCHEZ DO, MENDOZA-DE GIVES P. In vitro nematicidal effect of *Chenopodium ambrosioides* and *Castela tortuosa* n-hexane extracts against *Haemonchus contortus* (Nematoda) and their anthelmintic effect in gerbils. *Journal of Helminthology*, 1–6; 2018.

ZINGUE S, MAXEINER S, RUTZ J, NDINTEH DT, CHUN FK, FOHOUE FT, NJAMEN D, BLAHETA RA. Ethanol-extracted Cameroonian propolis: Antiproliferative effects and potential mechanism of action in prostate cancer. *Andrologia*, 52(9):e13698; 2020.

ZWANG J & OLLIARO PL. Clinical efficacy and tolerability of praziquantel for intestinal and urinary schistosomiasis-a meta-analysis of comparative and non-comparative clinical trials. *PLoS Negl Trop Dis.* 8.11; 2014.

## APÊNDICES

### APÊNDICE A. Produção científica durante o doutorado (2021–2024)

#### Artigos como colaborador:

NOGUEIRA RA, LIRA MGS, LICÁ ICL, FRAZÃO GCCG, DOS SANTOS VAF, FILHO ACCM, RODRIGUES JGM, MIRANDA GS, CARVALHO RC, NASCIMENTO FRF. Praziquantel: An update on the mechanism of its action against schistosomiasis and new therapeutic perspectives. *MOLECULAR AND BIOCHEMICAL PARASITOLOGY*, v. 252, p. 111531, 2022.

LICÁ ICL, FRAZÃO GCCG, NOGUEIRA RA, LIRA MGS, DOS SANTOS VAF, RODRIGUES JGM, MIRANDA GS, CARVALHO RC, SILVA LA, GUERRA RNM, NASCIMENTO FRF. Immunological mechanisms involved in macrophage activation and polarization in schistosomiasis. *PARASITOLOGY*, v. 5, p. 1-66, 2023.

LIRA MGS, NOGUEIRA RA, LICÁ ICL, FRAZÃO GCCG, DOS SANTOS VAF, MENDES ACC, RODRIGUES JGM, MIRANDA GS, SILVA LA, GUERRA RNM, CARVALHO RC, NASCIMENTO FRF. Immunomodulating and Anti-parasitary Mechanisms of Plant Products in the Treatment of Schistosomiasis. *BRAZILIAN JOURNAL OF PHARMACOGNOSY*, v. 33, p. 1-16, 2023.

**ANEXO A**  
**ANEXO A. Certificado do Comitê de Ética no Uso de Animais**  
**(CEUA) - UFMA**

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |                                                                                                                            |                                                                                     |                                     |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------|
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | <b>UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO</b><br><b>COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA</b><br><b>CIAEP: 02.0341.2019</b> |  | Comissão de Ética no Uso de Animais |
| <b><u>CERTIFICADO</u></b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |                                                                                                                            | <b>*09/2020*</b>                                                                    |                                     |
| <p>Certificamos que a proposta intitulada: "INVESTIGAÇÃO PARASITOLÓGICA E IMUNOLÓGICA EM CAMUNDONGOS INFECTADOS POR <i>Schistosoma mansoni</i> 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 <b>APROVADO</b> pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA - UFMA) da Universidade Federal do Maranhão, na reunião realizada em 21/02/2020.</p> <p>We certify that the proposal: "PARASITOLOGICAL AND IMMUNOLOGICAL INVESTIGATION IN INFECTED MICE BY <i>Schistosoma mansoni</i> 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 <b>APPROVED</b> by the Ethics Committee on Animals Use of the Federal University of Maranhão (CEUA - UFMA), in meeting of 02/21/2020.</p> |                                                                                                                            |                                                                                     |                                     |
| <b>Finalidade da Proposta:</b> Pesquisa                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |                                                                                                                            | <b>Área:</b> Ciências da Saúde                                                      |                                     |
| <b>Vigência da Proposta:</b> 01/08/2020 à 01/08/2024.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |                                                                                                                            |                                                                                     |                                     |
| <b>Origem</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | Biotério Central da Universidade Federal do Maranhão                                                                       |                                                                                     |                                     |
| <b>Espécie</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | Camundongos<br><i>Mus musculus</i>                                                                                         | <b>Sexo</b>                                                                         | Macho                               |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |                                                                                                                            | <b>Idade</b>                                                                        | 60 a 90 dias                        |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |                                                                                                                            | <b>Peso</b>                                                                         | 20-25g                              |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |                                                                                                                            | <b>Amostra</b>                                                                      | 316                                 |
| <b>Linhagem/Raça:</b> Swiss                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |                                                                                                                            |                                                                                     |                                     |
| <b>Local do experimento:</b> Biotério Setorial da Pós-Graduação do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde - CCBS/UFMA.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |                                                                                                                            |                                                                                     |                                     |
| São Luís, 28 de abril de 2020.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |                                                                                                                            |                                                                                     |                                     |
| <br>Prof. Dr. Rafael Cardoso Carvalho<br>Presidente da Comissão de Ética no uso de Animais - CEUA/UFMA                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |                                                                                                                            |                                                                                     |                                     |