



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

Mestrado

**EFEITO ESQUISTOSSOMICIDA E IMUNOMODULADOR DE
Dysphania ambrosioides (L.) MOSYAKIN & CLEMANTS NA INFECÇÃO
EXPERIMENTAL POR *Schistosoma mansoni* SAMBON, 1907**

JOÃO GUSTAVO MENDES RODRIGUES

São Luís
2019

JOÃO GUSTAVO MENDES RODRIGUES

**EFEITO ESQUISTOSSOMICIDA E IMUNOMODULADOR DE
Dysphania ambrosioides (L.) MOSYAKIN & CLEMANTS NA INFECÇÃO
EXPERIMENTAL POR *Schistosoma mansoni* SAMBON, 1907**

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

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Flávia Raquel F. do Nascimento.

Co-orientador: Prof. Dr. Nêuton Silva-Souza.

São Luís
2019

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

Mendes Rodrigues, João Gustavo.

EFEITO ESQUISTOSSOMICIDA E IMUNOMODULADOR DE *Dysphania ambrosioides* L. MOSYAKIN & CLEMANTS NA INFECÇÃO EXPERIMENTAL POR *Schistosoma mansoni* SAMBON, 1907 / João Gustavo Mendes Rodrigues. - 2019.

112 f.

Coorientador(a): Nêuton Silva-Souza.

Orientador(a): Flávia Raquel Fernandes do Nascimento.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde/ccbs, Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2019.

1. Esquistossomose. 2. Mastruz. 3. Tratamento. I. Nascimento, Flávia Raquel Fernandes do. II. Silva-Souza, Nêuton. III. Título.

JOÃO GUSTAVO MENDES RODRIGUES

**EFEITO ESQUISTOSSOMICIDA E IMUNOMODULADOR DE
Dysphania ambrosioides (L.) MOSYAKIN & CLEMANTS NA INFECCÃO
EXPERIMENTAL POR *Schistosoma mansoni* SAMBON, 1907**

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

Aprovada em ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Flávia Raquel Fernandes do Nascimento
Doutora em Imunologia
(Orientadora)

Prof^a. Dr^a. Valdenia Maria Oliveira de Souza
Doutora em Imunologia
(Examinadora)

Prof. Dr. Rafael Cardoso Carvalho
Doutor em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres
(Examinador)

Prof^a. Dr^a. Rosane Nassar Meireles Guerra
Doutora em Imunologia
(Examinadora)

*“Entrega o teu caminho ao Senhor; confia
Nele, e Ele tudo fará.”*

(Salmos 37:5)

*Aos meus pais, Kátia e Plácido, pelo amor, carinho,
apoio incondicional e pelos ensinamentos prestados...*

*À minha irmã, Ana Flávia, pelas confidências e
companheirismo sempre...*

*Aos meus amigos, companheiros fiéis de todos os
momentos...*

Dedico

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida e oportunidade de viver imensamente na busca dos meus sonhos com coragem e atitude, com tropeços e vitórias, permitindo-me caminhar até esse exato momento.

Aos meus pais pela excelente educação e incentivo desde pequeno, me priorizando e oferecendo sempre o melhor caminho a ser seguido, com apoio incondicional para superar os obstáculos, e por sempre sonharem os meus sonhos.

À minha orientadora, Prof^a Dr^a Flávia Raquel Fernandes do Nascimento, uma fonte de inspiração e exemplo de profissional altamente certificada e comprometida com suas atividades acadêmicas, que me recebeu de abraços abertos sem nenhuma restrição ou qualquer obstáculo, me deixando livre e confortável para trabalhar com aquilo que sempre gostei desde a graduação. Meu sentimento de gratidão é imensurável por tudo que tens me proporcionado durante esses dois anos. Sigo em frente de cabeça erguida e com a certeza de que não consegui apenas uma excelente orientadora, mas também uma grande amiga, que levarei comigo por toda a vida!

Ao meu coorientador, Prof. Dr. Nêuton Silva-Souza, a quem tenho grande apego e respeito, é meu pai científico desde a graduação que fez eu crescer e gostar dessa área belíssima que é a Parasitologia. Muito obrigado pelo voto de confiança e credibilidade durante todos esses anos de pesquisa, me incentivando e dando apoio na resolução dos projetos!

À Prof^a Dr^a Lucilene Silva, a qual chamo carinhosamente de “Profa Luh”, obrigado pelo imenso apoio e carinho desde o início do mestrado, ajudando-me na organização dos protocolos, preparação do extrato e nas análises histológicas.

À Prof^a Dr^a Rosane Guerra, a quem imensamente grato por me fazer enxergar a Imunologia com outros olhos. Muito obrigado por toda disponibilidade, afeição e incentivo na realização da pesquisa, e por todas as críticas construtivas que fizeram meu trabalho ficar melhor!

À Prof^a Dr^a Marcia Maciel, com quem tive o prazer de trabalhar e fazer parte do projeto sobre esquistossomose em algumas comunidades da Baixada Maranhense! Obrigado

pela oportunidade de trilhar esse prazeroso caminho, que com certeza fez a diferença na minha formação.

Aos Profs. Drs. Aramys Reis, Ana Paula e Paulo Vitor, por serem fonte de inspiração, incentivo e determinação, e por sempre estarem dispostos a ajudar e apoiar nas pesquisas!

Á todos que fazem parte da família do Laboratório de Imunofisiologia (LIF) pelo grande apoio sempre! Em especial a Liana, Lilian, Luana, Jefferson, Douglas, André, Sulayne, Arthur, Éder e Alex, pela parceria, pelos dias e noites em que me fizeram companhia nos experimentos e por toda dedicação me ajudando no que fosse preciso!

Á Andressa Godinho, minha parceira fiel de coleta do mastruz, a quem carinhosamente apelidei de “Santa”. Muito obrigado por sempre me dar forças a nunca desistir e acreditar que tudo ficaria bem!

Á Thiare Fortes, por ter me recebido de braços abertos no LIF, sendo incentivadora desde início do mestrado, e me ajudado bastante nos experimentos!

Aos meus queridos irmãos científicos, Paula Sibelly e Johnny Nascimento, por todos os momentos de alegrias, tristezas, angústias, ansiedades e confidências compartilhadas! Vocês foram essenciais para que tudo desse certo no fim, e tenho imensa gratidão por ambos.

Aos ICs Emanuel Veras, Jaiana Campos, Caroline Martins e Jaqueline Oliveira, por toda ajuda, determinação e vontade de aprender sempre!

A Prof^a Dr^a Claudia Rocha, pelo suporte no preparo e caracterização química do extrato e por toda a disponibilidade em sanar as dúvidas que surgiram ao longo das pesquisas.

A todos que fazem parte do Laboratório de Imunologia de Helminhos/UFMG, pela concessão dos caramujos e realização dos Elisás, em especial a Prof^a Dr^a Deborah Negrão-Corrêa, coordenadora do laboratório, por todo suporte, ajuda e receptividade durante minha estadia, e a Dr^a Michelle Rezende, pelo auxílio e desenvolvimento dos experimentos no laboratório. MUITÍSSIMO OBRIGADO!

Aos meus companheiros de turma, pelo incentivo, grande amizade, ajuda nos momentos difíceis, nos seminários e horas de estudos compartilhados, em especial a Mirtes, Tassio, João Victor, Elis, Írlla, Orlene, Rosinha, Antônio, Ana Serpa e Etiene!

Aos meus eternos e inesquecíveis amigos do COLUN, Thiago Vinicius, Rafaella Barbosa, Adriana Nunes, Nayara Leticia, Rayssa Sousa, Luís Gustavo, Brenda Safira, Ana Caroline e Sfeffi Castro, pelos 10 anos amizade, fidelidade e grande apoio!

Aos meus amigos Carlos Neves, Luana Araújo, Juliana Neres, Anderson Araújo, Anderson Brito, Jeane Ribeiro, Diego Araújo, Paulo James, Euzébio Rodrigues e Eudâmidas Junior, por todo amor, carinho e fidelidade, SEMPRE!!! O apoio de vocês é essencial para eu continuar.

Aos meus escudeiros fiéis e grandes amigos da UEMA, Maria Gabriela, Ranielly Nogueira, Gleycka Cristine, Lorrane Cantanhede, Fernanda Carvalho, Roberta Sabrine, Andrea Teles, Carla Fernanda, Raynara Fernanda e Davi Viegas, pelo grande apoio nas pesquisas e resoluções da mesma, e pela grande amizade!

À Guilherme Miranda, a quem compartilho de inúmeros momentos maravilhosos. Muito obrigado por sempre poder me ajudar, me abrilhantar com belíssimas e geniais ideias, pela enorme e gratificante amizade, e por compartilhar comigo a vida!

Aos meus irmãos de coração, Carlos Martins, Remy Cutrim, Áureo de Melo, Caio Vinicius e Manoel Fontinele, pelos melhores conselhos, melhores ouvidos, melhores brigas, melhores abraços e melhores momentos!

A David Coqueiro por ter sido um anjo e grande amigo nesses últimos meses, por ter escutado minhas angústias e medos, e por aguentado todo meu complexo de ansiedade! Obrigado por todas as palavras de incentivo e momento de apoio!

À CAPES e ao CNPq pela bolsa recebida e financiamento.

E a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a construção desta dissertação.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 REFERENCIAL TEÓRICO	3
2.1 <i>Schistosoma mansoni</i>	3
2.1.1 Ecoepidemiologia	3
2.1.2 Ciclo biológico	6
2.1.3 Resposta imunológica	9
2.2 Diagnóstico e Controle da esquistossomose	12
2.3 <i>Dysphania ambrosioides</i> (L.) Mosyakin & Clemants	13
3 OBJETIVOS	17
3.1 Objetivo Geral	17
3.2 Objetivo Específicos	17
4 MATERIAL E MÉTODOS	18
4.1 Extrato de <i>Dysphania ambrosioides</i> (EDA)	18
4.1.1 Coleta da planta	18
4.1.2 Obtenção do extrato hidroalcoólico	18
4.2 Caramujos <i>Biomphalaria glabrata</i>	18
4.2.1 Obtenção e manutenção	18
4.2.2 Obtenção das cercárias	19
4.3 Avaliação da atividade cercaricida <i>in vitro</i>	19
4.4 Avaliação da atividade esquistossomicida <i>in vitro</i>	19
4.4.1 Critérios de avaliação esquistossomicida e cálculo de IC ₅₀	20
4.5 Avaliação do efeito esquistossomicida <i>in vivo</i>	20
4.5.1 Animais	20
4.5.2 Infecção dos camundongos	21
4.5.3 Caracterização dos grupos e tratamento	21
4.5.4 Eutanásia dos camundongos	22

4.5.5	Quantificação de ovos eliminados nas fezes.....	23
4.5.6	Quantificação de ovos de <i>S. mansoni</i> retidos nos tecidos	23
4.6	Avaliação do tratamento com EDA sobre a resposta imune	24
4.6.1	Avaliação de leucograma.....	24
4.6.2	Dosagem de IgE Total	25
4.6.3	Obtenção e contagem das células dos órgãos linfóides e peritônio	25
4.6.4	Contagem diferencial das células do peritônio	26
4.6.5	Preparação das culturas do baço e peritônio	26
4.6.6	Avaliação da produção de peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂)	26
4.6.7	Determinação da produção de óxido nítrico	27
4.6.8	Fenotipagem das células do baço e peritônio	27
4.7	Avaliação histopatológica e histomorfométrica do tecido hepático	28
4.8	Análise estatística	29
5	RESULTADOS.....	30
5.1	Extrato de <i>D. ambrosioides</i> (EDA) apresenta efeito cercaricida <i>in vitro</i>	30
5.2	O EDA apresenta atividade esquistossomicida <i>in vitro</i>	32
5.3	Efeito esquistossomicida <i>in vivo</i> do EDA	34
5.3.1	O tratamento com EDA reduz ovos nas fezes e nos tecidos	34
5.4	Efeito de EDA sobre a resposta imune camundongos infectados.....	36
5.4.1	O tratamento com EDA altera parâmetros leucométricos de camundongos infectados por <i>S. mansoni</i>	36
5.4.2	O tratamento com EDA aumenta celularidade da medula óssea de camundongos infectados por <i>S. mansoni</i>	37
5.4.3	O tratamento com EDA reduz níveis de IgE total no soro de camundongos infectados por <i>S. mansoni</i>	38
5.4.4	O tratamento com EDA aumenta número de linfócitos T, linfócitos B e macrófagos no baço de camundongos infectados por <i>S. mansoni</i>	39

5.4.5 O tratamento com EDA aumenta número de linfócitos T auxiliares e citotóxicos no baço de camundongos infectados por <i>S. mansoni</i>	41
5.4.6 O tratamento com EDA não altera celularidade da cavidade peritoneal de camundongos infectados por <i>S. mansoni</i>	43
5.4.7 O tratamento com EDA não altera os percentuais de macrófagos e expressão de iNOS em células da cavidade peritoneal de camundongos infectados por <i>S. mansoni</i>	44
5.4.8 O tratamento com EDA reduz produção peróxido de hidrogênio em células da cavidade peritoneal de camundongos infectados por <i>S. mansoni</i>	46
5.5 Avaliação histopatológica e histomorfométrica do tecido hepático	47
5.5.1 O tratamento com EDA reduz infiltrado, necrose, lesão tecidual e presença de granuloma em tecido hepático de camundongos infectados por <i>S. mansoni</i>	47
5.5.2 O tratamento com EDA reduz área e número dos granulomas no tecido hepático de camundongos infectados por <i>S. mansoni</i>	48
6 DISCUSSÃO	52
7 CONCLUSÕES	63
REFERÊNCIAS.....	64
APÊNDICES.....	85
ANEXOS	90

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

- BSA:** Albumina bovina, do inglês *Bovine Serum Albumin*
- CAA:** Antígenos Anódicos Circulantes
- CBA:** do inglês *Cytometric Bead Array*
- CCA:** Antígenos Catódicos Circulantes
- CD:** do inglês *Cluster of differentiation*
- CEUA:** Comitê de Ética para o Uso de Animais
- CO₂:** Dióxido de carbono
- DHR:** Dihydrorhodamine 123
- EDA:** Extrato de *Dysphania ambrosioides*
- EDA1:** Grupo tratado com EDA durante a fase cutânea
- EDA14:** Grupo tratado com EDA durante a fase pulmonar
- EDA28:** Grupo tratado com EDA durante a fase vermes imaturos
- EDA45:** Grupo tratado com EDA durante a fase vermes maduros
- ELISA** - Ensaio de Imunoabsorção Enzimática, do inglês *Enzyme Linked Immunoborbent Assay*
- GBD:** Carga Global de Doenças, do inglês *Global Burden of Disease*
- GIDE:** Grupo Interdepartamental de Estudos sobre a Esquistossomose
- H₂O₂:** Peróxido de hidrogênio
- H₂SO₄:** Ácido sulfúrico
- HPJ:** Método de sedimentação espontânea
- IC₅₀:** 50% de concentração inibitória máxima
- IFN:** Interferon
- IgE:** Imunoglobulina E
- IL:** Interleucina
- iNOS:** Óxido nítrico sintase induzível
- KOH:** Hidróxido de potássio
- LPH:** Laboratório de Parasitologia Humana
- M1:** Macrófagos do tipo 1/ Classicamente Ativado
- M2:** Macrófagos do tipo 2/ Alternativamente Ativado
- MAR:** Herbário do Maranhão
- MFI:** Média de Intensidade de Fluorescência, do inglês *Average Fluorescence Intensity*

MIFC: Método de Centrífugo-sedimentação

NaCl: Cloreto de sódio

NO: Óxido nítrico

OPG: Ovos por Grama de Fezes

PBS: Salina Tamponada com Fosfato, do inglês *Phosphate Buffered Saline*

PBS: Tampão fosfato de Sódio

pH: Potencial hidrogeniônico

PMA: Acetato de forbol miristato

PZQ: Praziquantel

RENISUS: Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS

RPMI: Meio de Cultura desenvolvido pelo Roswell Park Memorial Institute

SBCAL: Sociedade Brasileira de Ciências em Animais de Laboratório

TGF: Fator transformador de crescimento

Th: Linfócitos T *helper*

TNF- α : Fator de necrose tumoral alfa

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

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1.	Distribuição mundial de algumas espécies de <i>Schistosoma</i> capazes de infectar humanos.....	3
Figura 2.	Distribuição da esquistossomose mansoni no Brasil, destacando as áreas de maior concentração de casos de acordo com o percentual da faixa positividade.....	5
Figura 3.	Ciclo biológico de <i>S. mansoni</i>	7
Figura 4.	Indução da resposta imune durante infecção por <i>S. mansoni</i>	10
Figura 5.	Distribuição de <i>Dysphania ambrosioides</i> pelo Brasil.....	14
Figura 6.	Delineamento experimental ao longo da etapa de infecção dos camundongos e das etapas de tratamento dos diferentes grupos	22
Figura 7.	Organograma experimental dos ensaios realizados após eutanásia dos camundongos.....	22
Figura 8.	Sobrevivência de cercárias de <i>S. mansoni</i> (Cepa LE – Belo Horizonte/MG) durante 180 minutos de exposição ao extrato hidroalcoólico de <i>D. ambrosioides</i>	31
Figura 9.	Viabilidade de vermes machos adultos de <i>S. mansoni</i> (Cepa LE – Belo Horizonte/MG) durante 24 horas de exposição ao extrato hidroalcoólico de <i>D. ambrosioides</i>	33
Figura 10.	Efeito do tratamento com extrato hidroalcoólico de <i>D. ambrosioides</i> sobre o número de ovos presentes nas fezes (A) e retidos no fígado (B) de camundongos infectados por <i>S. mansoni</i>	35
Figura 11.	Concentrações séricas de IgE total de camundongos infectados ou não por <i>S. mansoni</i> , e tratados ou não com extrato hidroalcoólico de <i>D. ambrosioides</i>	38
Figura 12.	Celularidade total (A) e caracterização fenotípica dos linfócitos T (B), linfócitos B (C) e macrófagos (D) do baço de camundongos infectados ou não por <i>S. mansoni</i> , e tratados ou não com extrato hidroalcoólico de <i>D. ambrosioides</i>	40

Figura 13.	Caracterização fenotípica dos linfócitos T auxiliares (A e B) e linfócitos T citotóxicos (C e D) do baço de camundongos infectados ou não por <i>S. mansoni</i> , e tratados ou não com extrato hidroalcoólico de <i>D. ambrosioides</i>	42
Figura 14.	Percentual da análise fenotípica de macrófagos (A), expressão de iNOS (B) e produção peróxido de hidrogênio (C) em células da cavidade peritoneal de camundongos infectados ou não por <i>S. mansoni</i> , e tratados ou não com extrato hidroalcoólico de <i>D. ambrosioides</i>	45
Figura 15.	Avaliação da produção de peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂) em camundongos infectados ou não por <i>S. mansoni</i> , e tratados ou não com extrato hidroalcoólico de <i>D. ambrosioides</i>	46
Figura 16.	Análise morfolométrica da área (A) e número (B) de granulomas no tecido hepático de camundongos infectados ou não por <i>S. mansoni</i> , e tratados ou não com extrato hidroalcoólico de <i>D. ambrosioides</i>	49
Figura 17.	Fotomicrografia de cortes histológicos hepáticos de camundongos infectados ou não por <i>S. mansoni</i> , e tratados ou não com extrato hidroalcoólico de <i>D. ambrosioides</i> corados com HE (40x).....	50
Figura 18.	Fotomicrografia de cortes histológicos hepáticos de camundongos infectados ou não por <i>S. mansoni</i> , e tratados ou não com extrato hidroalcoólico de <i>D. ambrosioides</i> corados com HE (100x).....	51
Figura 19.	Estratégia de análise para identificação de linfócitos T, linfócitos B e macrófagos do baço dos animais.....	87
Figura 20.	Estratégia de análise para identificação de linfócitos T auxiliares e T citotóxicos do baço dos animais.....	88
Figura 21.	Estratégia de análise para identificação de macrófagos e expressão da iNOS em células peritoneais dos animais.....	89

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Quadro 1.	Caracterização e descrição dos grupos controles e testes, e os seus respectivos tratamentos.....	21
Quadro 2.	Painéis para marcação das células do baço	28
Quadro 3.	Painel para marcação das células do peritônio	28
Tabela 1.	Valores das concentrações do extrato hidroalcoólico de <i>D. ambrosioides</i> capazes de inibir 50% de viabilidade dos vermes machos de <i>S. mansoni</i> em diferentes horas.....	34
Tabela 2.	Contagem global e diferencial de leucócitos do sangue de camundongos infectados ou não por <i>S. mansoni</i> , e tratados ou não com extrato hidroalcoólico de <i>D. ambrosioides</i>	36
Tabela 3.	Percentual total e diferencial de leucócitos do sangue de camundongos infectados ou não por <i>S. mansoni</i> , e tratados ou não com extrato hidroalcoólico de <i>D. ambrosioides</i>	37
Tabela 4.	Celularidade da medula óssea de camundongos infectados ou não por <i>S. mansoni</i> , e tratados ou não com extrato hidroalcoólico de <i>D. ambrosioides</i>	38
Tabela 5.	Contagem total e diferencial de células peritoneais de camundongos infectados ou não por <i>S. mansoni</i> , e tratados ou não com extrato hidroalcoólico de <i>D. ambrosioides</i>	43
Tabela 6.	Análise histopatológica do tecido hepático de camundongos infectados ou não por <i>S. mansoni</i> , e tratados ou não com extrato hidroalcoólico de <i>D. ambrosioides</i>	47
Tabela 7.	Composição química do extrato hidroalcoólico de <i>Dysphania ambrosioides</i>	86

RESUMO

A esquistossomose causada pelo parasito *Schistosoma mansoni*, é uma doença que decorre da resposta inflamatória granulomatosa em torno dos ovos viáveis do parasito que ficam retidos nos tecidos do hospedeiro. Os quimioterápicos atuais são eficazes somente contra vermes adultos e não revertem as lesões inflamatórias ocasionadas nos órgãos do sistema porta-hepático pelo processo parasitário. Desta forma é necessário a busca de novos tratamentos. Assim, este estudo avaliou o efeito esquistossomicida e imunomodulador do extrato hidroalcólico das folhas de *Dysphania ambrosioides* (EDA) frente a infecção experimental por *S. mansoni* em camundongos Swiss. Inicialmente, realizou-se ensaios *in vitro*, com cercárias e vermes adultos expostos a diferentes concentrações do extrato. Em seguida, foi realizada a avaliação *in vivo*, onde camundongos foram infectados com 50 cercárias de *S. mansoni* no dia 0 e eutanasiados 60 dias após infecção. Para esse ensaio, utilizamos os seguintes grupos: controle positivo (animais infectados com tratamento padrão), controle negativo (animais infectados sem tratamento), controle limpo (animais não infectados e nem tratados); e grupos testes: infectados e tratados com EDA em diferentes fases de desenvolvimento de *S. mansoni*, como fase cutânea (EDA1), fase pulmonar (EDA14), vermes imaturos (EDA28) e vermes maduros (EDA45). *In vitro*, o EDA apresentou atividade cercaricida e esquistossomicida; *In vivo*, o EDA apresentou, nos parâmetros parasitológicos, redução do número de ovos de *S. mansoni* no tecido hepático e nas fezes; nos parâmetros imunológicos, aumentou o número de linfócitos, e induziu a redução de eosinófilos no sangue, reduziu concentrações séricas de IgE Total, aumentou a celularidade da medula óssea e do baço, com significativo aumento de linfócitos T auxiliares, T citotóxicos, linfócitos B e macrófagos, aumento do número de neutrófilos e reduziu o número de mastócitos na cavidade peritoneal, e não reduziu a produção de peróxido de hidrogênio nas células peritoneais; e nos parâmetros histopatológicos, reduziu área e a quantidade de granulomas sobre o tecido hepático. Esses resultados demonstram o EDA com ação antiparasitária e imunomoduladora sobre as diferentes fases da esquistossomose, nos dando a perspectiva em prosseguir com investigações dos efeitos e mecanismos de ação dos compostos isolados presentes no EDA sobre as diferentes fases de *S. mansoni*.

Palavras-chave: Esquistossomose; Tratamento; Mastruz; Resposta Imune.

ABSTRACT

Schistosomiasis caused by the parasite *Schistosoma mansoni*, is a disease that arises from the granulomatous inflammatory response around the viable eggs of the parasite that are retained in the tissues of the host. Current chemotherapeutic agents are effective only against adult worms and do not reverse the inflammatory lesions caused by the parasitic process in the portal-hepatic system. In this way it is necessary to search for new treatments. Thus, this study evaluated the schistosomicidal and immunomodulatory effect of the hydroalcoholic extract of the leaves of *Dysphania ambrosioides* (EDA) against experimental infection by *S. mansoni* in Swiss mice. Initially, in vitro tests were performed with cercariae and adult worms exposed to different concentrations of the extract. Next, the in vivo evaluation was carried out, where mice were infected with 50 cercariae of *S. mansoni* at day 0 and euthanized 60 days after infection. For this assay, we used the following groups: positive control (infected animals with standard treatment), negative control (infected animals without treatment), clean control (uninfected or treated animals); (EDA1), pulmonary phase (EDA14), immature worms (EDA28), and mature worms (EDA45) were studied in the different stages of development of *S. mansoni*. In vitro, the EDA presented cercaricidal and schistosomicidal activity; In vivo, EDA presented, in the parasitological parameters, a reduction in the number of *S. mansoni* eggs in hepatic tissue and faeces; in immunological parameters, increased the number of lymphocytes, and induced reduction of eosinophils in the blood, reduced total IgE serum concentrations, increased cellularity of bone marrow and spleen, with significant increase in T helper, cytotoxic T, B lymphocytes and macrophages, increased numbers of neutrophils and reduced the number of mast cells in the peritoneal cavity, and did not reduce the production of hydrogen peroxide in the peritoneal cells; and in the histopathological parameters, reduced area and the amount of granulomas on the hepatic tissue. These results demonstrate EDA with antiparasitic and immunomodulatory action on the different stages of schistosomiasis, giving us the perspective to proceed with investigations of the effects and mechanisms of action of the isolated compounds present in the EDA on the different phases of *S. mansoni*.

Keywords: Schistosomiasis; Treatment; Mastruz; Immune response.

1 INTRODUÇÃO

O helminto trematódeo *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907 atua como agente etiológico da doença infecciosa e parasitária denominada esquistossomose (SCHOLTE et al., 2014). Essa parasitose tem alto grau de morbidade em populações humanas, com chances elevadas de se sobrepor a outras doenças em suas áreas de ocorrência (CARVALHO et al., 2008; WHO, 2015).

Para o seu desenvolvimento, o verme *S. mansoni* necessita de um hospedeiro definitivo, onde ocorre a fase sexuada do ciclo de vida do parasito, que incluem humanos (MODENA et al. 2008) e outros mamíferos vertebrados (MIRANDA et al., 2015), e de um hospedeiro intermediário, como algumas espécies de moluscos de gênero *Biomphalaria* (PARAENSE, 1975; GRYSEELS et al., 2006).

A esquistossomose resulta da resposta inflamatória granulomatosa que ocorre em torno dos ovos viáveis do parasito, os quais invés de serem eliminados nas fezes, se depositam nos tecidos. O indivíduo parasitado apresenta diversos sintomas como: dermatite cercariana, complicações pulmonares, febre, emagrecimento, diarreia, cólicas, hepatoesplenomegalia, hipertensão portal, varizes abdominais e ascite. Entretanto, a gravidade da doença depende da carga parasitária, do estado nutricional do hospedeiro, do tempo de parasitismo (NEVES et al., 2016) e, do tipo e intensidade da resposta imunológica do hospedeiro à infecção (DE JESUS et al., 2002; ABATH et al., 2006).

A resposta imunológica a infecção por *S. mansoni*, durante a fase aguda pré-postural, é principalmente direcionada aos antígenos secretados por vermes jovens e adultos, que estimulam a produção de citocinas inflamatórias, predominantemente associadas ao perfil Th1 (PEARCE; MACDONALD, 2002; DE JESUS et al., 2002; WYNN et al., 2004; WILSON et al., 2007). Com o aparecimento dos ovos, novos antígenos são secretados induzindo a maturação de células dendríticas e alterando o perfil das citocinas para o tipo Th2. Esse tipo de resposta imune é determinante na formação dos granulomas, na eliminação dos ovos, na remodelação dos tecidos lesados e na contenção da ação lesiva dos antígenos do parasito aos tecidos, entretanto, gera fibrose residual e contribui para evolução dos casos graves da doença (FINKELMAN et al., 1991; PEARCE et al., 1991; PEARCE; MACDONALD, 2002).

A quimioterapia é uma estratégia geral para o controle da esquistossomose, entretanto, o fármaco utilizado para esse fim, o Praziquantel® (PZQ), é eficaz somente

para vermes adultos de *S. mansoni*, e não é capaz de reverter as lesões histopatológicas geradas, as quais podem deixar sequelas irreversíveis (UTZINGER et al., 2003; MORAES, 2011). Desse modo, há necessidade em desenvolver novos tratamentos que apresentem tanto atividade esquistossomicida, quanto efeitos sobre a modulação e regulação da resposta imune a favor do hospedeiro vertebrado, evitando a evolução e as formas graves da doença.

Dentre as 71 espécies presentes na Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS – RENISUS, amostra-se a espécie *Dysphania ambrosioides* Syn: *Chenopodium ambrosioides*, usualmente conhecida como mastruz, e que já vem sendo utilizada pela população brasileira, como analgésica, anti-inflamatória, antisséptica, cicatrizante (GRASSI, 2011; SOUSA et al., 2012) e anti-helmíntica (FILIPOV, 1994). Além disso, o grupo de pesquisa do Laboratório de Imunofisiologia – UFMA demonstrou em estudos pré-clínicos, resultados promissores de efeitos importantes no reparo ósseo (PINHEIRO NETO et al., 2017), ação antitumoral (NASCIMENTO et al., 2006), potencial antileishmania (PATRICIO et al., 2008), ação imunoestimuladora e imunomoduladora (CRUZ et al., 2007; PERREIRA et al., 2010). Dessa forma, *D. ambrosioides* foi a espécie alvo para avaliarmos o efeito esquistossomicida e a sua ação imunomoduladora frente à infecção por *S. mansoni*.

Este estudo se baseou na hipótese que o extrato hidroalcoólico das folhas de *D. ambrosioides* apresenta ação anti-esquistossomótica e é capaz de modular a resposta imune a favor do hospedeiro vertebrado, regulando o processo inflamatório granulomatoso ocasionado pela infecção por *S. mansoni*.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 *Schistosoma mansoni*

2.1.1 Ecoepidemiologia

A esquistossomose é uma doença endêmica, infecciosa e parasitária de grande relevância mundial, causada por espécies que pertencem, taxonomicamente, ao filo Platyhelminthes Gegenbauer 1859, classe Trematoda Rudolphi 1808, subclasse Digenea Carus 1863, ordem Strigeiforme La Rue 1926, Superfamília Schistosomatoidea Stiles & Hassal 1898, família Schistosomatidae Stiles & Hassal 1898, e gênero *Schistosoma* Weiland 1858. Ao todo, seis espécies apresentam importância e interesse médico, devido sua capacidade de infectar o ser humano: *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907, característico das Américas, África, Oriente Médio e Índias Ocidentais; *S. japonicum* Katsurada, 1904, encontrado na China, Indonésia e Filipinas; *S. haematobium* Bilhartz 1852, mais comum na África e Oriente Médio, causador da infecção genitourinária; *S. mekongi* Vogt, Brickner & Bruce 1978, encontrado no Sudeste da África e rio Mekong; e *S. intercalatum* Fischer 1934, encontrado na África Ocidental e Central, possuindo menor impacto na saúde humana (GRYSEELS, 2012; COLLEY et al., 2014; WHO, 2015; WEERAKOON et al., 2015) (Figura 1).

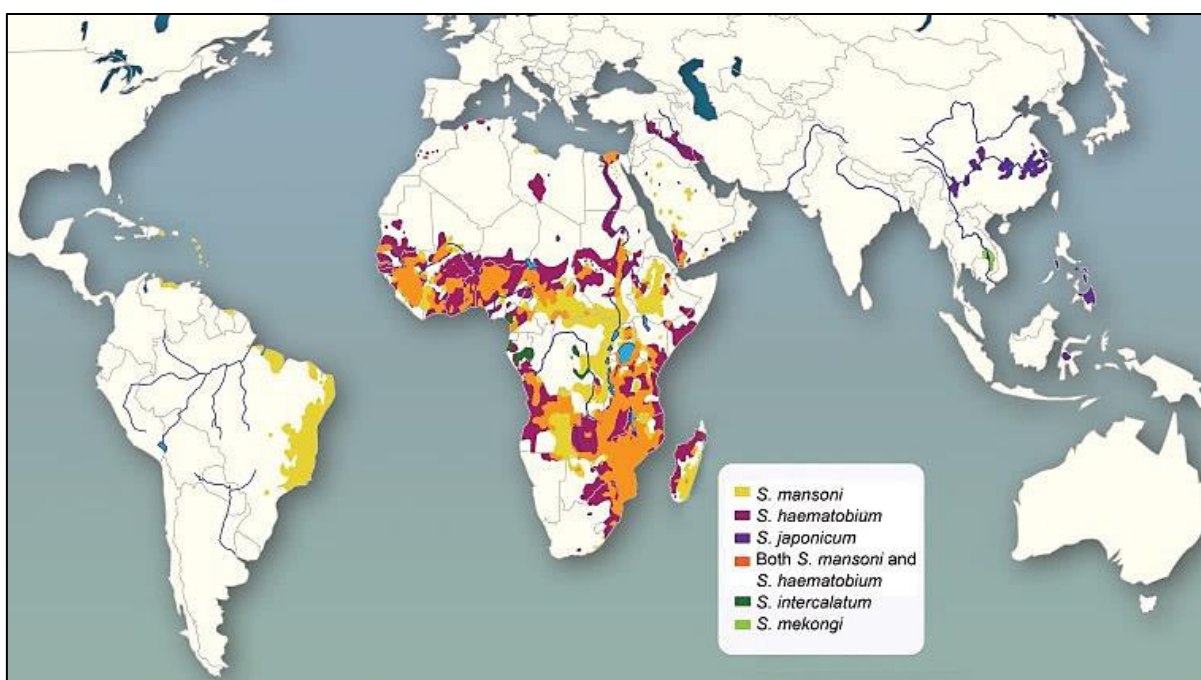


Figura 1. Distribuição mundial de algumas espécies de *Schistosoma* capazes de infectar humanos. Fonte: WEERAKOON et al. 2015.

Apesar da esquistossomose ter sido erradicada no Japão e a sua transmissão diminuída nas Antilhas e Tunísia, e possuir baixa transmissão no Marrocos, Filipinas, Arábia Saudita e Venezuela (WHO, 2009), estima-se que aproximadamente 240 milhões de pessoas estejam contaminadas *Schistosoma* spp., e 700-800 milhões permaneçam em risco iminente de contrair a doença, pois residem em áreas endêmicas situadas principalmente nos países em desenvolvimento localizados na África, Ásia e América Latina (STEINMANN et al., 2006; GRYSEELS et al., 2012; WHO, 2015; WEERAKOON et al., 2015).

As infecções ocasionadas pelos trematódeos do gênero *Schistosoma* já foram notificadas em 78 países, sendo que em 19 países não tem ocorrido notificações de casos nos últimos cinco anos, o que pode indicar a interrupção da doença, e em 52 países tem ocorrido transmissão moderada a alta, com necessidade de quimioterapia preventiva com Praziquantel (PZQ) (WEERAKOON et al., 2015; GBD, 2017; WHO, 2017).

Estima-se que cerca de 4,4 a 200 mil mortes por ano estão associadas à doença (WHO, 2015; GBD, 2016), devido ao parasitismo e suas complicações, fazendo com que essa parasitose continue sendo de extrema importância para a saúde pública (VAN DER WERF et al., 2003). A esquistossomose perde apenas para a malária como a principal causadora de morbidade entre as demais doenças parasitárias (CHOI; YU, 2015).

O helminto da espécie *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 (SCHOLTE et al., 2014). Há indícios de que a introdução deste parasito no país ocorreu, provavelmente, a partir do século XVI, durante o período de colonização, devido ao intenso movimento migratório de pessoas provenientes da África (GENTILE et al., 2010), possivelmente, infectadas com *S. mansoni* e *S. haematobium*, sendo que somente *S. mansoni* se estabeleceu no país, possivelmente, devido as condições ambientais favoráveis e hospedeiro intermediário adequado (KATZ; ALMEIDA, 2003). Estima-se, que aproximadamente 1,5 milhão de pessoas estejam infectadas com esquistossomose no país (BRASIL, 2017), sendo que 25 milhões estão sob o risco de serem infectadas (CARDIM et al., 2011; ROLLEMBERG et al., 2011).

Os casos de esquistossomose no país ocorrem principalmente na faixa litorânea do estado do Maranhão até o Espírito Santo e o estado de Minas Gerais,

onde ainda se encontram regiões com prevalência igual ou superior a 15%. Além disso, Minas Gerais e Bahia concentram cerca de 70% dos casos que ocorrem no país (NOYA et al., 2015). Existem ainda focos de transmissão no Distrito Federal, Pará, Ceará, Piauí, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná, Santa Catarina, Goiás e Rio Grande do Sul (BRASIL, 2017), bem como casos de pacientes positivos que vieram de áreas endêmicas registradas em todo território nacional, principalmente em áreas consideradas de migração, como o estado de Rondônia, que evidenciam a expansão da esquistossomose (COURA; AMARAL, 2004). A região Nordeste contribui com grande parcela no número de casos de esquistossomóticos do país, em virtude de extensas plantações mantidas por irrigação natural ou artificial, e por meio de valas que se transformam em criadouros ideais para os moluscos vetores (PARAENSE, 2001) (Figura 2).

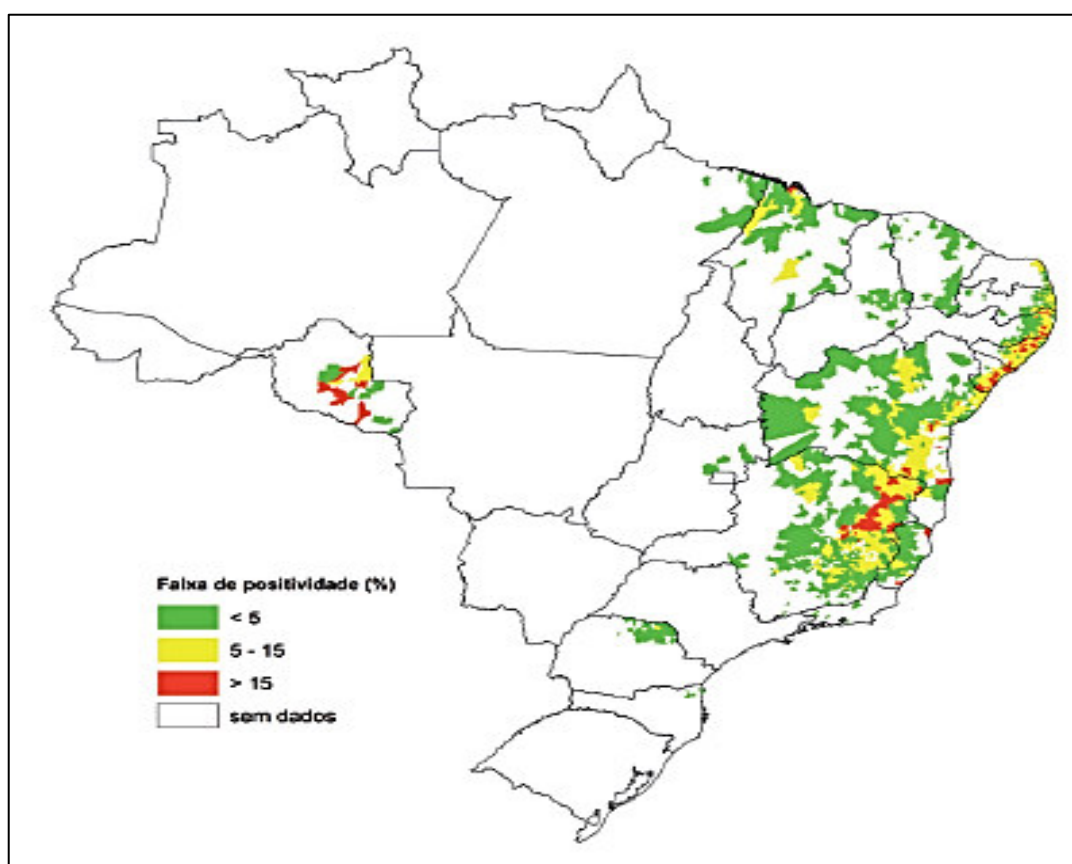


Figura 2. Distribuição da esquistossomose no Brasil, destacando as áreas de maior concentração de casos de acordo com o percentual da faixa positividade. Fonte: BRASIL (2014).

Nessas áreas, vários fatores econômicos, sociais e ecológicos têm contribuído para a contínua transmissão da doença ao longo dos anos. As precárias condições de saneamento básico, o baixo poder socioeconômico dos moradores das áreas

endêmicas, os hábitos de vida (principalmente associados às atividades econômicas de pesca e agricultura), a migração populacional, a presença dos hospedeiros intermediários do parasito e o clima, são exemplos de condições que permitem a permanência da transmissão da esquistossomose (LOUREIRO, 1989; KLOOS et al., 2008; KLOOS et al., 2010).

Outro aspecto importante para a manutenção da esquistossomose no Brasil, mas ainda pouco estudado, está relacionado à presença de vertebrados não humanos capazes de atuarem como reservatórios do parasito (REY, 1993). Diversas espécies de roedores de hábitos semiaquáticos, 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 (VEIGA-BORGEAUD et al., 1986; MARTINS et al., 1955; GENTILE et al., 2010; MIRANDA et al., 2015).

No 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 altas prevalências (CUTRIM, 1995). O Maranhão é um dos estados da federação que apresenta índices consideráveis desta doença, com distribuição endêmica em 20 dos seus 217 municípios e 29 municípios apresentam focos isolados (BRASIL, 2011; CANTANHEDE et al., 2014).

2.1.2 Ciclo biológico

O parasito da espécie *S. mansoni* apresenta ciclo de vida heteróximo (Figura 3), com fase de reprodução assexuada no hospedeiro intermediário, representados por espécies de caramujos do gênero *Biomphalaria*, e com fase de reprodução sexuada dentro do hospedeiro vertebrado, principalmente o ser humano (KATZ; ALMEIDA, 2003). Entretanto, apesar de *S. mansoni* ser inicialmente um parasito de seres humanos, algumas espécies de roedores (principalmente *Holochilus* spp. e *Nectomys* spp.), outros primatas (NELSON, 1960), e bovinos (BARBOSA et al., 1962; MODENA et al., 2008) já foram encontrados naturalmente infectados pelo parasito (THÉRON et al., 1992; ALARCÓN DE NOYA et al., 1997), contudo a sua real participação na manutenção do parasito ainda é pouco conhecida.

Os hospedeiros intermediários pertencem ao gênero *Biomphalaria* Preston, 1910, filo Mollusca Linnaeus, 1758, classe Gastropoda Cuvier 1797, subclasse Pulmonata Cuvier 1817, ordem Basommatophora Schmidt 1855 e família Planorbidae Rafinesque, 1815 (MALEK, 1985; PARAENSE, 2004; JARNE et al., 2011). Somente as espécies *B. glabrata* (Say, 1818), *B. tenagophila* (Orbigny, 1835) e *B. straminea* (Dunker, 1848), foram encontradas naturalmente infectadas e têm importância na transmissão da esquistossomose no Brasil (PARAENSE, 1972).

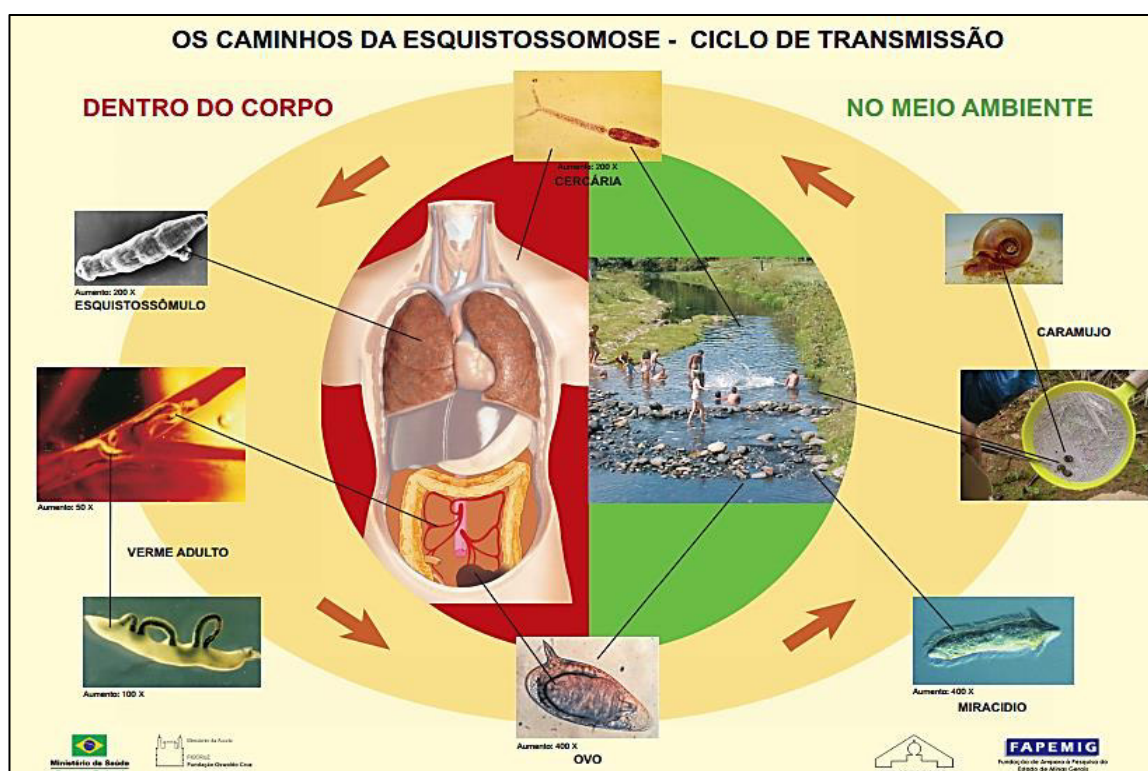


Figura 3. Ciclo biológico de *S. mansoni*. Fonte: Schall et al. (2007) e modificado pelo autor.

O ciclo inicia-se quando os ovos maduros de *S. mansoni* são eliminados nas fezes do hospedeiro vertebrado infectado e, ao entrar em contato com água de rios e lagos, eclode liberando a larva ciliada, denominada miracídio, que nada à procura do hospedeiro intermediário (ROLLINSON; SIMPSON, 1987; JENKINS-HOLICK; KAUL, 2013). O miracídio apresenta formato oval e revestido por placas ciliadas, medindo em torno de 150 a 170 mm de comprimento, por 60 a 70 mm de largura (KATZ; ALMEIDA, 2003; NEVES et al., 2016).

Durante a penetração no caramujo, os miracídios liberam o conteúdo das glândulas de adesão e penetração, perdem suas placas ciliares e sofrem modificações fisiológicas, transformando-se em esporocistos. Estes por sua vez sofrem ciclos de

reprodução assexuada dando origem as formas larvárias de *S. mansoni*, denominadas de cercárias, que liberadas no ambiente aquático, infectam o ser homem. Condições abióticas como iluminação e temperatura da água exercem influência na liberação das cercárias nas coleções hídricas (BOGEA et al., 1996; WOLMARANS et al., 2002). As cercárias apresentam uma cauda bifurcada de aproximadamente 300 mm e dimensões corporais em torno de 0,2 mm de comprimento por 0,07 mm de largura (KATZ; ALMEIDA, 2003; NEVES et al., 2016). Durante o processo de penetração no tegumento do hospedeiro, as cercárias perdem a cauda e o corpo cercariano permanece na derme ou tecido conjuntivo por dois ou três dias sofrendo modificações estruturais, fisiológicas e bioquímicas, originando o esquistossômulo de pele (CURWEN; WILSON 2003; WHITFIELD et al., 2003). Em seguida, o esquistossômulo alcança a corrente circulatória, sendo carregado passivamente pelo fluxo sanguíneo venoso para o lado direito do coração, de onde será bombeado para os pulmões, sendo a agora conhecido como, esquistossômulo pulmonar (REY, 2008).

Aproximadamente duas semanas após infecção, os esquistossômulos atingem o coração, preferencialmente, via circulação passiva, da aorta para o sistema porta-hepático, via veia porta, ou circulando sistemicamente por vários órgãos antes de atingirem artérias que derivam no sistema porta-hepático (LENZI et al., 2008). O desenvolvimento final do esquistossômulo em verme adulto (macho ou fêmea) se completa nos vasos intra-hepáticos (PINTO; ALMEIDA, 1948). Entretanto, também se admite que uma pequena parte dos esquistossômulos possa atingir os vasos intra-hepáticos migrando ativamente através da veia cava e artéria hepática, ou ainda, por migração transdiafragmática (LENZI et al., 2008).

Na veia porta hepática, os vermes adultos amadurecem sexualmente, se acasalam e, só então migram para veia mesentérica inferior, onde a fêmea inicia a postura dos ovos, após 4 a 6 semanas da penetração cercariana (BLOCH, 1980; ROLLINSON; SIMPSON, 1987; JENKINS-HOLICK; KAUL, 2013). Nessa etapa de vida do parasito, o macho mede cerca de 1cm e possui o tegumento recoberto de minúsculas projeções (tubérculos). O seu corpo apresenta-se 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 está presente o canal ginecóforo, que possui a função de albergar a fêmea e fecundá-la. Por sua vez, 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 (KATZ; ALMEIDA, 2003; NEVES et al., 2016).

O número de ovos produzidos diariamente pelas fêmeas de *S. mansoni* varia de acordo com a espécie do hospedeiro e da linhagem do parasito, porém, a maioria dos estudos indica a produção de 150-400 ovos/fêmea/dia infecção (LENZI et al., 2008). Quando maduros, os ovos de *S. mansoni* medem 150 µm de comprimento por 65 µm de largura, tamanho considerado grande (KATZ; ALMEIDA, 2003; NEVES et al., 2016). Do total de ovos eliminados pelo parasito, cerca de 40% a 50% são capazes de aderir e atravessar o endotélio e a membrana basal do vaso sanguíneo, atravessar a mucosa intestinal e alcançar a luz desse órgão, sendo eliminado nas fezes (PEARCE; MACDONALD, 2002; WYNN et al., 2004). Grande parte dos ovos produzidos pelas fêmeas de *S. mansoni* fica retida na mucosa intestinal, ou quando não deixam os vasos, são carregadas pelo fluxo sanguíneo e se acumulam nos órgãos internos, principalmente no fígado, onde se tornam alvo da resposta imune do hospedeiro (BOROS; WARREN, 1970; WARREN, 1982; BURKE et al., 2009; HAMS et al., 2013; CHUAH et al., 2014). Os primeiros ovos são inicialmente encontrados nas fezes após 40 dias da infecção, reiniciando o ciclo (SIQUEIRA-BATISTA et al., 1998; LENZI et al., 2008; SOUZA et al., 2011).

2.1.3 Resposta imunológica

A morbidade da esquistossomose está relacionada à uma série de fatores, que dentre eles destacam-se a carga parasitária, o status do hospedeiro, o tipo e intensidade da resposta imunológica, além de características da cepa do parasito (KABATEREINE et al., 1999; DE JESUS et al., 2002; ABATH et al., 2006).

A resposta imunológica do hospedeiro no decorrer da infecção por *S. mansoni* (Figura 4) ocorre a partir da migração dos esquistossômulos e maturação dos vermes adultos, denominando-se de fase aguda pré-postural, onde o hospedeiro produz uma resposta imune de perfil Th1, que atinge maior ativação entre a 3ª e 5ª semana após a exposição à cercária (GRZYCH et al., 1991; PEARCE et al., 1991). Essa resposta de perfil Th1 é caracterizada pela produção de citocinas pró-inflamatórias como interferon gama (IFN-γ), interleucinas 2 (IL-2), IL-1, IL-12, IL-6, e o fator de necrose

tumoral alfa (TNF- α) (PEARCE; MACDONALD, 2002; DE JESUS et al., 2002; WYNN et al., 2004; WILSON et al., 2007). Ao longo dessa fase, a maioria dos indivíduos infectados que vivem em áreas endêmicas são assintomáticos, mas são relatados quadros de dermatite cercariana, que pode se manifestar como uma urticária local, minutos após a infecção pelas cercárias (GRYSEELS et al., 2006; BURKE et al., 2009). Coincidindo com a migração e maturação sexual dos vermes adultos e posterior postura dos ovos pela fêmea (fase aguda postural), surgem sintomas como, febre elevada acompanhada de calafrios, significativa sudorese, mal-estar geral, astenia, tosse não produtiva, sintomas estes que são conhecidos como Síndrome de Katayama (COURA et al., 1970; GRYSEELS et al., 2006; BURKE et al., 2009; SOUZA et al., 2011).

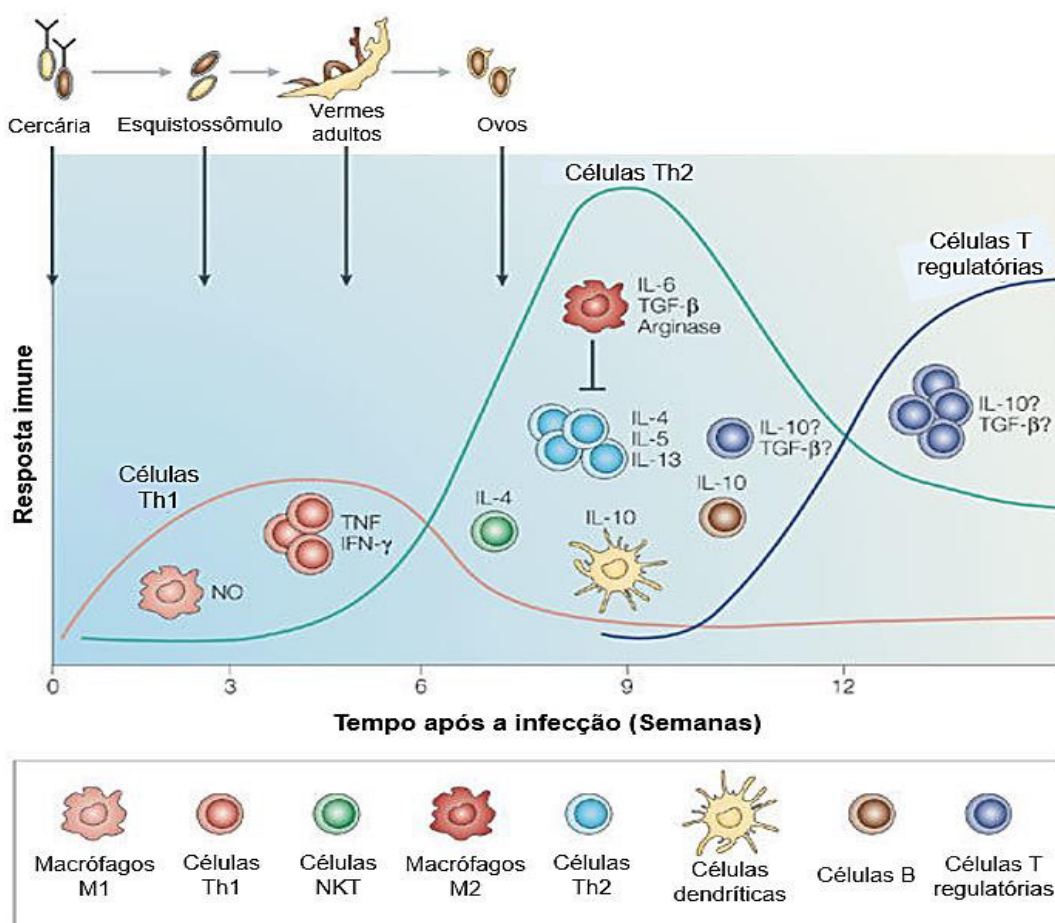


Figura 4. Indução da resposta imune durante infecção por *S. mansoni*. Fonte: Dunne; Cooke (2005).

Com o início da ovipostura (fase aguda postural), entre a 4ª a 5ª semana da infecção, os antígenos secretados/excretados pelos ovos do parasito dão início a uma mudança no perfil dos mediadores imunológicos produzidos pelo hospedeiro, e a

resposta imune torna-se predominantemente Th2, sendo observado aumento de produção de citocinas desse perfil, como IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13, e de quimiocinas, que estimulam a eosinofilia, diferenciação de macrófagos alternativamente ativados e a produção de IgE (CHEEVER et al., 1987; PEARCE et al., 1991; CHEEVER et al., 2000; PEARCE; MACDONALD, 2002; PEARCE et al., 2004; BARTLEY et al., 2006; BURKE et al., 2009; HAMS et al., 2013; VANNELLA et al., 2016).

A estimulação da resposta Th2 é responsável pela formação dos granulomas nos tecidos onde os ovos do parasito ficam retidos, pois induz o recrutamento e ativação de eosinófilos, macrófagos alternativamente ativados, linfócitos T CD4+ e miofibroblastos ao redor dos ovos, que evoluem progressivamente para depósitos de fibrose, principalmente no intestino e no sistema porta-hepático (LENZI et al. 1998; CHEEVER et al., 2000; CORLISS et al., 2016).

A resposta Th2 alcança seu pico na 8ª semana após o início da infecção, e é, então, modulada negativamente com a progressão da infecção para a fase crônica (PEARCE et al., 1991; PEARCE; MACDONALD, 2002; WYNN et al., 2004; WILSON et al., 2007). Este processo de modulação ocorre principalmente via IL-10 e TGF- β , que regulam o balanço da resposta Th1/Th2 pela ativação de células regulatórias, atingindo ativação máxima por volta da 11-12ª semana de infecção (ARAÚJO et al., 1996; PEARCE; MACDONALD, 2002; WYNN et al., 2004; WILSON et al., 2007). O processo modulatório está envolvido no prognóstico benigno da doença, uma vez que promove a redução do tamanho do granuloma (PEARCE; MACDONALD, 2002; LUNDY; LUKACS, 2013).

Cogita-se que a partir do momento que a resposta imunológica é modulada, o início da fase crônica é estabelecido. Os sintomas clínicos da esquistossomose durante essa fase são atribuídos à fibrose relacionada à intensidade da resposta inflamatória granulomatosa induzida por substâncias líticas liberadas pelos ovos do parasito (LENZI et al., 1998; WILSON et al., 2007; ANDRADE, 2009). O granuloma, ao mesmo tempo em que é nocivo ao indivíduo, representando uma intensa reação celular, que pode evoluir para fibrose hepática grave, também é benéfico, à medida que favorece a eliminação dos ovos pela mucosa intestinal e sequestra os antígenos liberados pelos ovos, os quais exibem efeito hepatotóxico (PEARCE; MACDONALD, 2002; HAMS et al., 2013; SCHWARTZ; FALLON, 2018). Dessa maneira, a evolução mais benigna da esquistossomose depende da formação e modulação dos granulomas.

2.2 Diagnóstico e Controle da esquistossomose

O diagnóstico é realizado com base na anamnese do indivíduo aliado a métodos laboratoriais, sendo eles parasitológicos e/ou imunológicos (VITORINO et al., 2012).

Os métodos parasitológicos se baseiam na análise macroscópica, verificando a consistência e presença de conteúdo sanguíneo e/ou fragmentos dos parasitos, e análise microscópica, avaliando a presença de ovos ou larvas dos parasitos eliminados junto às fezes. Dentre esses, temos os métodos qualitativos, como os métodos de Sedimentação Espontânea ou apenas HPJ (LUTZ, 1919; modificado por HOFFMAN et al., 1934) e o Centrífugo-sedimentação (MIFC) ou método de Blagg (BLAGG et al., 1955), e os métodos quantitativos, que destacam-se os métodos Kato-Katz (KATO; MIURA, 1954; modificado por KATZ et al., 1972) e Helmintex® (TEIXEIRA et al., 2007). Os métodos imunológicos consistem na detecção de anticorpos ou antígenos circulantes, apresentando melhor eficácia no diagnóstico de indivíduos com infecções de baixa carga parasitaria (VAN LIESHOUT et al., 2000; DOENHOFF et al., 2004). Dentre esses, temos os métodos de dosagem sorológica dos antígenos circulantes [Antígenos Anódicos Circulantes (CAA) e Antígenos Catódicos Circulantes (CCA)] de *S. mansoni* (RABELO, 1997; GRYSSELS, 2012), sendo este último, embora presente no soro, também é detectado na urina (ADRIKO et al., 2014).

Apesar do diagnóstico ser um grande aliado dos programas de controle da esquistossomose, esse conjunto ainda permanece com um grande desafio para os países endêmicos. As estratégias de controle se baseiam em programas públicos de saneamento básico, educação sanitária, controle do hospedeiro intermediário e tratamento das pessoas infectadas. O impacto econômico da esquistossomose é sentido por vários grupos sociais, principalmente pelos países pobres e pelas populações que vivem sob condições mais difíceis. O abastecimento de água tratada, as instalações sanitárias e o destino adequado dos esgotos sanitários são os recursos básicos de controle da doença a médio e longo prazo (BERGQUIST, 2002; FENWICK; WEBSTER, 2006; STEINMANN et al., 2006; BROOKER et al., 2009).

O controle da esquistossomose vem sendo direcionado ao hospedeiro intermediário, a partir do uso de moluscicidas químicos, causadores de alterações no ambiente (CARVALHO et al., 2008). Infelizmente, o foco dos estudos continua sendo

o molusco, pois inúmeros estudos buscam substâncias naturais com ação moluscicida, além do tratamento de doentes. Em contrapartida, poucas pesquisas estão sendo realizadas em busca de alternativas naturais para o combate ao agente etiológico, *S. mansoni*, seja na sua forma larvária (aquática) ou adulta (nos hospedeiros vertebrados).

O tratamento quimioterápico da esquistossomose é baseado no uso de apenas um fármaco, PZQ, eficaz na redução da morbidade, porém os resultados com o uso dessa droga têm sido menos promissores do que o esperado, pois seu uso extensivo e inapropriado culminou no aparecimento de resistência (CAFREY, 2007; DOENHOFF et al., 2008). Além disso, o fármaco é eficaz somente contra formas adultas do esquistossomo, não atuando, portanto, nas formas jovens do parasito, os esquistossômulos (UTZINGER et al., 2003). Dessa forma, é premente a necessidade de novas alternativas terapêuticas, especialmente com uso de produtos naturais (NDAMBA et al., 1994; MOLGAARD et al., 2001; SANDERSON et al., 2002; MOHAMED et al., 2005; BRASIL, 2014).

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

D. ambrosioides é uma espécie herbácea cosmopolita, encontrada na forma silvestre ou cultivada, procedente das Américas Central e Sul (México e outros países), se encontrando vastamente distribuída em regiões de clima tropical, subtropical e temperado. É considerada uma das espécies com maior área de dispersão (RIZZINI; MORS, 1976; CHEVALLIER, 1996; MORAES, 1996). No Brasil é extensa a sua distribuição (Figura 5), com ocorrência em todo o território (SENNA, 2010).

É uma espécie conhecida popularmente como mastruz ou erva-de-Santa-Maria no Brasil (MESSIAS et al., 2015); Paico no Peru e Argentina; Wormessed nos Estados Unidos; Pazote, epazote verde ou epazote blanco no México; Té de España, té burreno ou té hormiguero na Espanha; T'u-Ching-chieh na China; L'anserine vermifugue na França ou Wurmsaamen Gansefus na Alemanha (KLICKS, 1985; PARDO DE SANTAYNA et al., 2005; PATRÍCIO, 2011).

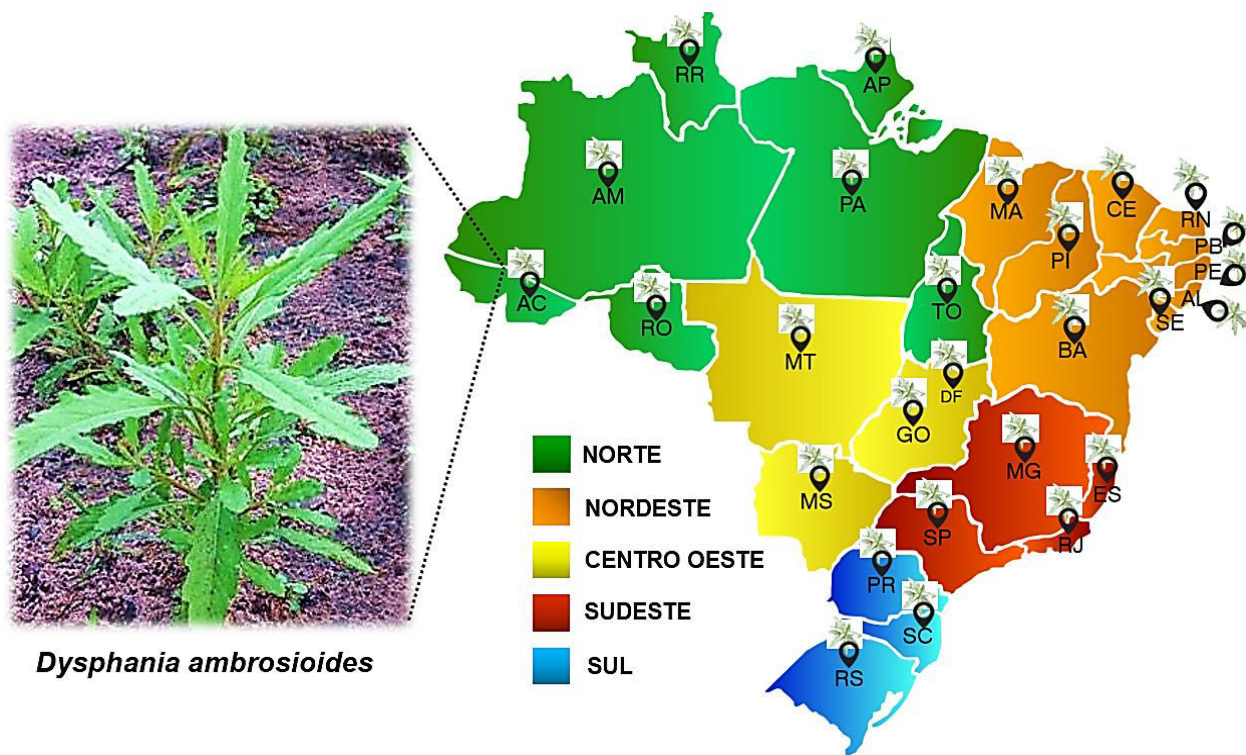


Figura 5. Distribuição de *Dysphania ambrosioides* pelo Brasil. Fonte: Elaborado pelo autor de acordo com dados de Senna (2010).

D. ambrosioides, anteriormente, conhecida como *Chenopodium ambrosioides*, pertencia ao gênero *Chenopodium*, um táxon grande e morfológicamente variável de ervas anuais e perenes (FUENTES-BAZAN et al., 2012). Por razões morfológicas foi expandida a circunscrição do gênero *Dysphania*, compreendendo todos os táxons glandulares de *Chenopodium*. A mudança do conceito do gênero foi confirmada por dados moleculares e tornou-se amplamente aceita (VERLOOVE, 2013).

Atualmente, a distribuição taxonômica desta espécie segundo Plants Database, (2019) é a seguinte:

Reino: Plantae

Subreino: Tracheobionta

Divisão: Magnoliophyta

Classe: Magnoliopsida

Subclasse: Caryophyllidae

Ordem: Carvophyllalles

Família: Chenopodiaceae

Gênero: *Dysphania* R. BR.

Espécie: *Dysphania ambrosioides* (L.) Mosyakin & Clemants

D. ambrosioides é uma planta herbácea de pequeno porte com altura variando de 20cm até 1,50m. Apresenta propriedades aromáticas fortemente notáveis e características peculiares, sendo seu princípio ativo encontrado no óleo extraído de suas sementes (LORENZI; MATOS, 2002; ALVAREZ et al., 2011). Apresenta folhas com cinco lobos, de coloração verde pálido com borda dorsal serrilhada, não claramente definida. As sementes são marrons com ponta chanfrada (GROZEVA; CVETANOVA, 2013). É uma espécie vegetal que tem preferência por solos de textura média, com boa fertilidade e suprimento moderado de água, tolerando solos salinos. O desenvolvimento vegetativo é favorecido por uma boa iluminação e as plantas se tornam mais competitivas em regiões e em épocas de dias longos, sendo o florescimento estimulado por dias curtos (ZHANG et al., 2012).

Devido ao disseminado uso terapêutico popular e a vasta distribuição no país, *D. ambrosioides* foi uma das 71 espécies escolhidas pelo Ministério da Saúde para integrar a Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse do Sistema Único de Saúde (RENISUS) (BRASIL, 2009), onde é indicada como antiespasmódico, tônico, auxiliar da digestão, antirreumático e antitérmico, sendo considerada pela Organização Mundial da Saúde como uma das espécies mais utilizadas entre os remédios tradicionais no mundo inteiro (LORENZI; MATOS, 2002; COSTA; TAVARES, 2006).

Alguns estudos demonstram que *D. ambrosioides* possui atividade anti-helmíntica (FILIPOV, 1994; KLICKS, 1985), moluscicida (HMAMOUCI et al., 2000), leishmanicida (BEZERRA et al., 2006; MONZOTE et al., 2007), fungicida (VARGAS et al., 1997; DELESPAUL et al., 2000; CHU et al., 2011), nematocida (INSUNZA et al., 2001; ZAMILPA et al., 2018), larvicida (MORSY TOSSON et al., 1998), antibacteriana (LALL; MEYER, 1999; LIMAVERDE et al., 2017), potencial acaricida (MUSA et al., 2017), potencial antidiabético (SONG et al., 2011), anti-inflamatório e cicatrizante (RIBEIRO et al., 2004; GRASSI, 2011; SÉRVIO et al., 2011) e regeneração óssea (PENHA et al., 2017; PINHEIRO NETO et al., 2017;). Além disso, apresentou um efeito imunomodulador sobre algumas infecções, como cistite hemorrágica (SILVA et al., 2015), sinovite (CALADO et al., 2015) e tumor de Ehrlich (NASCIMENTO et al., 2006), provocando aumento do recrutamento celular para órgãos linfóides secundários e aumento da atividade macrofágica (CRUZ et al., 2007).

Alguns trabalhos realizados com essa mesma espécie vegetal apresentaram resultados promissores como esquistossomicida, daí a necessidade de mais estudos

nesse contexto (KAMEL et al., 2011; SOARES et al., 2017). Além disso, não há registros na literatura sobre a avaliação da atividade imunomoduladora dessa planta em indivíduos infectados com *S. mansoni*.

Dessa forma, o presente trabalho se propõe em verificar o efeito anti-esquistossomose e imunomodulador do extrato hidroalcólico das folhas de *D. ambrosioides* frente a infecção experimental por *S. mansoni* em camundongos.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito esquistossomicida e imunomodulador *in vivo* do extrato hidroalcoólico das folhas de *Dysphania ambrosioides* (EDA) em camundongos infectados por *Schistosoma mansoni*.

3.2 Objetivo Específicos

- Avaliar atividade cercaricida e esquistossomicida *in vitro* do EDA;
- Avaliar o efeito do tratamento com EDA nos diferentes estágios da infecção por *S. mansoni* em camundongos;
- Avaliar a ativação da resposta imune do extrato das folhas de *D. ambrosioides* em camundongos infectados por *S. mansoni*.
- Realizar a análise histopatológica do tecido hepático de camundongos infectados por *S. mansoni* e tratados com extrato de *D. ambrosioides*;

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Extrato de *Dysphania ambrosioides* (EDA)

4.1.1 Coleta da planta

As partes aéreas de *D. ambrosioides* foram coletadas no Município da Raposa/MA, Bairro Alto do Farol (S 2°27'34,6" W 44°08'47,5") em abril de 2017, por volta das 08h00 da manhã, visando a manutenção de sua integridade e minimizando perdas de compostos voláteis (SIMÕES, 2003). O exemplar da planta identificado no Herbário do Maranhão (MAR) da Universidade Federal do Maranhão, Campus Bacanga, com exsicata de número 9.349 (Anexo A).

4.1.2 Obtenção do extrato hidroalcoólico

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

O extrato seco foi pesado para o cálculo do rendimento (PATRÍCIO et al., 2008). A extração apresentou rendimento de 15,5% em relação às folhas secas. Para o uso foi ressuspendido em água destilada.

4.2 Caramujos *Biomphalaria glabrata*

4.2.1 Obtenção e manutenção

Os espécimes de *B. glabrata* foram gentilmente cedidos pelo Moluscário do laboratório de Imunologia de Helmintos do Grupo Interdepartamental de Estudos sobre a Esquistossomose (GIDE), localizado no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Seguindo as normas de transporte de material biológico, os caramujos foram transportados contendo a cepa LE de *S. mansoni*. Esta cepa tem sido mantida por sucessivas infecções em hamsters (*Mesocricetus auratus*) e caramujos *B. glabrata*, de acordo com a técnica descrita por Pellegrino e Katz (1968).

Os espécimes foram mantidos no Laboratório de Parasitologia Humana (LPH) da Universidade Estadual do Maranhão, em aquários de vidro com água desclorada (GERKEN, 1977). Para sua nutrição e fortalecimento da concha, os caramujos tiveram como substrato uma fina camada de argila, acrescida com carbonato de cálcio e farinha de ostra, e como alimento, folhas de alface, segundo Malek (1985).

4.2.2 Obtenção das cercárias

Os caramujos foram acondicionados individualmente em recipientes de vidro, e expostos por quatro horas à iluminação artificial em água desclorada, para estimular a eliminação de cercárias. As larvas obtidas foram analisadas quanto a sua viabilidade, posteriormente concentradas e contadas, com o auxílio de uma lupa esterioscópica (SMITHERS; TERRY, 1965).

4.3 Avaliação da atividade cercaricida *in vitro*

Foram coletadas cercárias viáveis, por foto-estimulação de caramujos *B. glabrata*. Para os ensaios foram colocadas 10 larvas em cada poço de uma placa de cultura com 24 poços contendo 400µL de meio de cultura RPMI em cada. Foram adicionados 100µL de extrato hidroalcoólico das folhas de *D. ambrosioides* obtendo concentrações finais de 10.000µg/mL, 5.000µg/mL, 1.000µg/mL, 500µg/mL e 250µg/mL. Como controle negativo, 10 larvas foram colocadas em contato com 500µL meio RPMI. Para avaliação da atividade cercaricida *in vitro*, utilizou-se como parâmetro a viabilidade/mobilidade das larvas. O experimento foi realizado a temperatura ambiente ($\pm 25^{\circ}\text{C}$) e as observações feitas em microscópio estereoscópico (aumento de 40x/80x) após 15, 30, 60, 90, 120, 150 e 180 minutos. Os bioensaios foram repetidos quatro vezes, em quadruplicata, para cada grupo. Todos os procedimentos citados foram executados, segundo Silva (2012).

4.4 Avaliação da atividade esquistossomicida *in vitro*

Os vermes foram obtidos por perfusão do sistema portal e veias mesentéricas com solução salina estéril (NaCl a 0,9% w/v) (SMITHERS; TERRY, 1965) de camundongos com sessenta dias de infecção. Vermes machos foram imediatamente transferidos para meio RPMI 1640 suplementado com 100µg/mL de penicilina,

100µg/mL de estreptomicina e 10% de soro bovino fetal e lavados duas vezes com este meio. Os vermes foram distribuídos (dois vermes por poço) em placas de cultura com 24 poços com 2mL (por poço) do meio suplementado e as culturas incubadas a 37°C, em estufa de CO₂. Duas horas após incubação, para permitir a adaptação dos vermes ao meio de cultura, o EDA foi adicionado nas concentrações de 250µg/mL, 150µg/mL e 50µg/mL. Vermes incubados em meio RPMI suplementado serviram como grupo controle negativo. Vermes incubados em 10µg/mL de PZQ serviram como controle positivo. Todos os experimentos foram realizados três vezes, em quadruplicata, para cada grupo. Um microscópio invertido foi utilizado para avaliar as condições gerais dos vermes, incluindo a motilidade, alterações no tegumento e sobrevivência, monitorizada nos tempos de 3, 6, 12, 18 e 24 horas de cultura. Os procedimentos citados foram feitos com base no protocolo de Soares et al (2017).

4.4.1 Critérios de avaliação esquistossomicida e cálculo de IC₅₀

O tratamento foi considerado letal quando os vermes não exibiram nenhum tipo de movimento após 2 minutos de observação. A motilidade dos vermes foi pontuada após o tratamento com EDA e PZQ de acordo com os critérios de viabilidade marcados numa escala de 0-3 proposto por Horiuchi et al. (2005). Resumidamente o sistema de pontuação foi seguinte: 3 = movimento corporal completo; 2 a 1.5 = mobilidade lenta e parcial; 1 = atividade mínima, mas o verme ainda vivo; 0 = verme morto.

A concentração letal capaz de matar 50% dos vermes (IC₅₀), foi expressa com limite de confiança de 95%, por meio do método de regressão linear, utilizando os dados do logaritmo da concentração das amostras versus o percentual de vermes mortos, para cada tempo de análise. O software utilizado para a realização desses cálculos foi o GraphPad Prism versão 6 (Prism Software, Irvine, Califórnia, EUA).

4.5 Avaliação do efeito esquistossomicida *in vivo*

4.5.1 Animais

Foram utilizados 42 camundongos *Swiss* machos, com peso entre 45-50g e idade entre 3 e 4 meses, fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal do Maranhão (UFMA). Todas as etapas, desde a manutenção até a experimentação dos

camundongos para fins de pesquisa científica, obedeceram aos princípios técnicos e éticos preconizados pela Sociedade Brasileira de Ciências em Animais de Laboratório (SBCAL). O certificado de aprovação do Comitê de Ética para o Uso de Animais (CEUA) da UFMA, sob o nº 23115.003822/2016-26, consta em anexo (Anexo B).

4.5.2 Infecção dos camundongos

Os animais foram infectados por via percutânea com 50 cercárias viáveis de *S. mansoni*, obtidas de exemplares de *B. glabrata* provenientes da Cepa LE de Belo Horizonte – MG.

4.5.3 Caracterização dos grupos e tratamento

Os camundongos foram divididos em 7 grupos com 6 animais cada, sendo seis grupos infectados e um grupo não infectado (Quadro 1).

Quadro 1. Caracterização e descrição dos grupos controles e testes, e os seus respectivos tratamentos.

Grupos	Características
Controle Limpo (L)	Camundongos não infectados, que foram utilizados como parâmetro fisiológico.
Controle Negativo (C-)	Camundongos infectados sem tratamento.
Controle Positivo (C+)	Camundongos que foram tratados no 45º dia de infecção com Praziquantel durante em sete dias seguidos.
Extrato <i>D. ambrosioides</i> 1 (EDA1)	Camundongos que foram tratados no 1º dia de infecção, na fase cutânea (esquistossômulo de pele), por sete dias consecutivos com EDA.
Extrato <i>D. ambrosioides</i> 14 (EDA14)	Camundongos que foram tratados no 14º dia de infecção, na fase pulmonar (esquistossômulo pulmonar), por sete dias consecutivos com EDA.
Extrato <i>D. ambrosioides</i> 28 (EDA28)	Camundongos que foram tratados no 28º dia de infecção, na fase de vermes imaturos (antes da ovipostura), por sete dias consecutivos com EDA.
Extrato <i>D. ambrosioides</i> 45 (EDA45)	Camundongos que foram tratados no 45º dia de infecção, na fase de vermes maduros (após início da oviposição), por sete dias consecutivos com EDA.

Fonte: Elaborado pelo autor com base no protocolo de AIRES et al (2014)

O tratamento dos grupos com EDA foi realizada na dose de 50mg/Kg (SILVA, 2012) por via oral (PEREIRA et al., 2010). O grupo Controle Positivo foi tratado com PZQ na dose de 50mg/Kg por via oral (AIRES et al. 2014). Os grupos Controle Limpo e Negativo não receberam nenhum tipo tratamento. No 60º dia de experimento, foi feita a eutanásia de todos animais (AIRES et al., 2014). Um resumo deste subtópico está ilustrado na Figura 6.

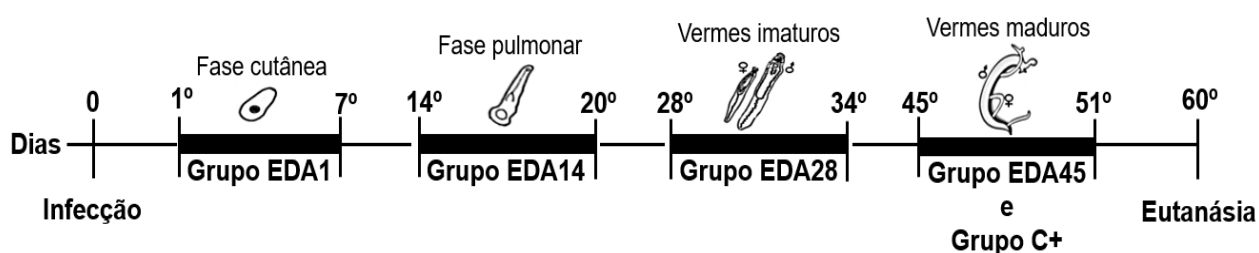


Figura 6. Delineamento experimental ao longo da etapa de infecção dos camundongos e das etapas de tratamento dos diferentes grupos. Fonte: Adaptado de AIRES et al (2014)

4.5.4 Eutanásia dos camundongos

Os animais foram pesados e eutanasiados com uma sobredose de anestésico (solução 2:1, Cloridrato de Xilasina 2% e Cloridrato de Ketamina 10%, intramuscular) para realização dos ensaios propostos (Figura 7).

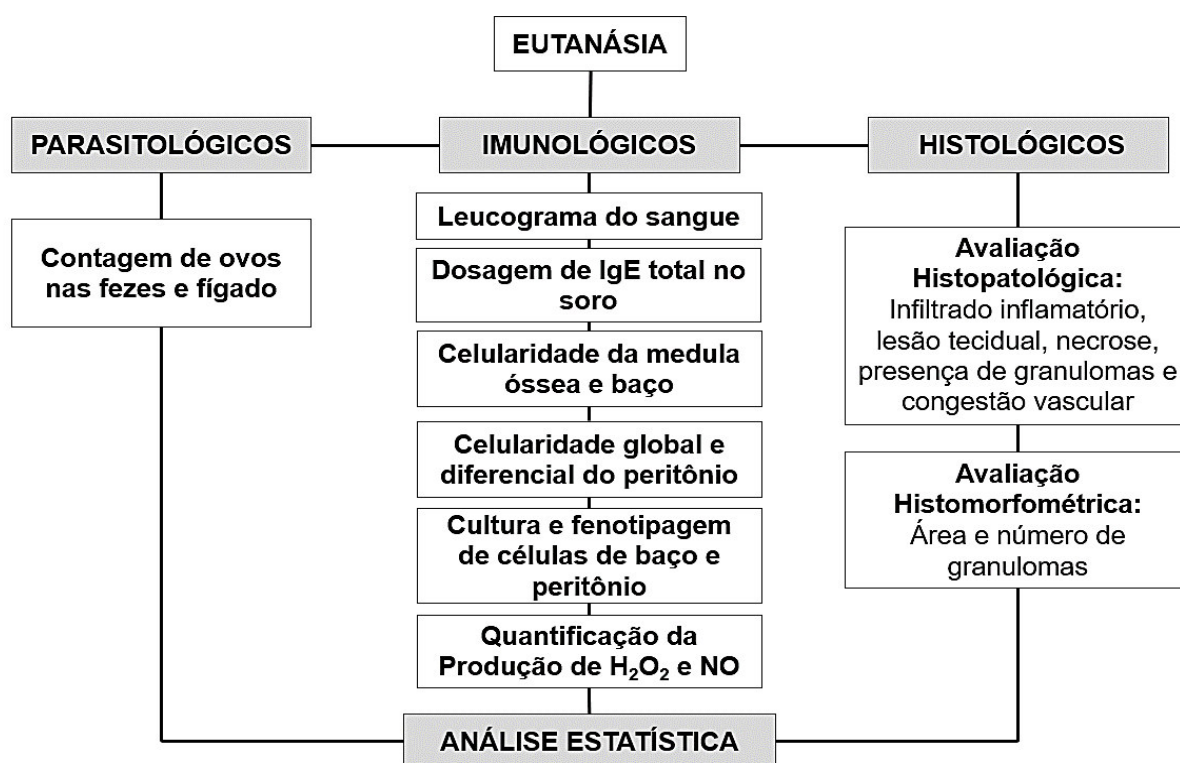


Figura 7. Organograma experimental dos ensaios realizados após eutanásia dos camundongos. Fonte: Elaborado pelo autor.

4.5.5 Quantificação de ovos eliminados nas fezes

Para quantificar a presença de ovos eliminados nas fezes foi utilizada a técnica de ovos por grama de fezes a partir do protocolo padronizado por Negrão-Corrêa et al (2004). De forma resumida, as amostras de fezes foram coletadas do reto dos animais eutanasiados e pesadas. Foram então, diluídas em 2mL de solução salina (0,87% NaCl). Após homogeneização, a amostra foi completada com 10mL de solução formol tamponado a 10%, e posteriormente submetidas a contagem. Para a quantificação, a solução fecal foi bem homogeneizada, foram preparadas seis lâminas com alíquotas de 100µL de cada amostra e examinadas ao microscópio óptico. Posteriormente, transformamos o valor obtido para ovos por grama de fezes acordo com a fórmula abaixo, onde: 1- Somatório de ovos encontrados em todas as lâminas analisadas; 2- Número de lâminas analisadas; 3- Volume final resultante da solução fecal; 4- Peso do material (fezes).

$$\frac{\left[\begin{array}{l} \text{1} \rightarrow \sum \text{Ovos (lâminas)} \\ \text{2} \rightarrow \text{Nº de lâminas} \end{array} \right]}{\text{4} \rightarrow \text{Peso (Fezes)}} \times \begin{array}{l} \text{3} \\ \downarrow \\ \text{V (mL)} \end{array} \times 10$$

4.5.6 Quantificação de ovos de *S. mansoni* retidos nos tecidos

A quantificação do número de ovos de *S. mansoni* retido no tecido, foi realizada segundo Cheever (1968). Resumidamente, os fígados (lobo direito) foram separados, no ato da eutanásia, pesados e digeridos individualmente em solução de hidróxido de potássio (KOH) 5% a 37°C por 4 h, ou até que não mais se observasse a presença de fragmentos de tecido. O material resultante da digestão tecidual foi transferido para tubos de 15mL e centrifugados por 1 min/ 200 g. O sobrenadante foi desprezado, cuidadosamente, e foram adicionados mais 14mL de solução salina (0,87% NaCl). O procedimento de lavagem foi repetido cinco vezes e o material ressuspenso em 10mL de solução salina e armazenado a 4°C até a contagem dos ovos. Para a contagem, seis lâminas com alíquotas de 100µL de cada amostra foram examinadas ao microscópio óptico. Os ovos foram quantificados de acordo com a fórmula abaixo, e posteriormente apresentados como total de ovos/órgão/animal. Sendo: 1- Somatório

de ovos encontrados em todas as lâminas analisadas; 2- Número de lâminas analisadas; 3- Volume final resultante da digestão; 4- Peso do material digerido.

$$\frac{\left[\begin{array}{l} \boxed{1} \rightarrow \sum \text{Ovos (lâminas)} \\ \boxed{2} \rightarrow \text{Nº de lâminas} \end{array} \right]}{\boxed{4} \rightarrow \text{Peso (Órgão)}} \times \begin{array}{l} \boxed{3} \\ \downarrow \\ V \text{ (mL)} \times 10 \end{array}$$

4.6 Avaliação do tratamento com EDA sobre a resposta imune

4.6.1 Avaliação de leucograma

4.6.1.1 Obtenção do sangue

Após a anestesia dos animais (descrito no tópico 4.5.4), o sangue foi obtido do plexo orbital. Coletado em tubo cônico de 2mL, e utilizado para fazer o esfregaço sanguíneo, imediatamente, 10µL de sangue. Em seguida, 20µL foram diluídos em 400µL do Líquido de Turck (100mL de solução de ácido acético 2%, 1mL de solução de violeta genciana) para contagem dos leucócitos totais (ARAÚJO-JORGE; CASTRO, 2000). Após cinco minutos de descanso a temperatura ambiente, o tubo com o sangue foi acondicionado em caixa com gelo, até a formação do coágulo. Após centrifugação (290 G /4°C/10 minutos), o soro foi coletado e congelado.

4.6.1.2 Análise leucométrica

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

A contagem diferencial dos leucócitos foi realizada no esfregaço sanguíneo corado com o kit panótico rápido (Laborclin), com auxílio de microscópio óptico de luz comum, sob aumento de 100X. Estabeleceu-se a quantidade de cada tipo de célula, encontrada ao final da contagem de 100 leucócitos.

4.6.2 Dosagem de IgE Total

A concentração de IgE total no soro foi estimada utilizando um kit de ELISA comercialmente disponível de acordo com as instruções do fabricante (Bethyl Laboratories Inc, Montgomery, Texas). Resumidamente, placas de 96 poços foram sensibilizadas com 1µL de anticorpo de captura diluído em 100µL de tampão de carbonato-bicarbonato com pH 9,6, para cada poço, permanecendo por 1h a temperatura ambiente. Após este período, as placas foram lavadas 3 vezes com tampão de lavagem (tampão Tris-NaCl: Tris 50 mM, NaCl 0,14 M, contendo 0,05% Tween 20, pH 8). As placas foram bloqueadas por 30 minutos com tampão Tris-NaCl contendo 1% de BSA e lavadas como descrito anteriormente. As amostras de soro foram diluídas (1:200) em tampão de diluição (tampão de lavagem contendo 1 % BSA). Concentração conhecida da proteína recombinante fornecida pelo fabricante também foi diluída em tampão de diluição (250 – 3,9 ng/mL), e aplicada nas placas para gerar a curva padrão utilizada para transformar as leituras de absorbância das amostras em concentração de proteína. As placas contendo as amostras foram incubadas a temperatura ambiente por 1h, e lavadas por 3 vezes com tampão de lavagem. Imunoglobulina E (IgE) presente nos poços foi revelada pela incubação com o anticorpo de detecção conjugado com peroxidase (1:10000) por 1 h a temperatura ambiente seguido por 3 lavagens, e revelação da reação através da adição do substrato (H_2O_2 0,5 M em solução de OPD 4 mM diluído em tampão citrato pH 5). As placas foram incubadas durante 20 minutos a temperatura ambiente, ao abrigo da luz, e a reação foi interrompida pela adição de solução 2 N de H_2SO_4 (50µL/poço). A leitura da intensidade de cor foi realizada no leitor de microplacas com filtro de 492 nm.

4.6.3 Obtenção e contagem das células dos órgãos linfóides e peritônio

O lavado peritoneal foi obtido com a aplicação de 5mL de PBS estéril na cavidade peritoneal, seguida de aspiração. O baço foi retirado, pesado e triturado em 3 mL de PBS estéril, e a suspensão celular obtida foi mantida em banho de gelo e diluída 50x em PBS para contagem. Para obtenção das células da medula óssea, o fêmur da pata esquerda foi perfundido com 1mL de PBS. Para a contagem as suspensões celulares foram fixadas e coradas de cristal violeta, na proporção 9:1. As

contagens celulares foram realizadas em câmara de Neubauer, com auxílio de um microscópio óptico de luz comum (CRUZ et al., 2007).

4.6.4 Contagem diferencial das células do peritônio

Para a contagem diferencial, 200µL da suspensão celular (obtida conforme o tópico 4.6.2), com ajuste para 2×10^5 de células, foram centrifugados (800 G /4°C/3 minutos), em Cito-Centrifuga Presvac®, e as lâminas foram posteriormente coradas com o kit panótico rápido (Laborclin). A contagem das células foi feita em microscópio óptico de luz comum, sob aumento de 100X. Estabeleceu-se a quantidade de cada tipo de célula, encontrada ao final da contagem de 100 células (ARAÚJO-JORGE; CASTRO, 2000).

4.6.5 Preparação das culturas do baço e peritônio

Células do baço (após hemólise) e peritônio foram cultivadas em placas de 96 poços a uma concentração de 2×10^5 por poço, em meio RPMI 1640 suplementado com 2mM de L-glutamina, 23mM de L asparagina, 0,1mM de ácido pirúvico, 1mM de ácido fólico, 1% de estreptomicina (100µg/mL), penicilina G (100 µg/mL) e 2% de soro fetal bovino. Foram incubadas por 48 horas a 37°C e 5% de CO₂ (YANG et al., 2011).

4.6.6 Avaliação da produção de peróxido de hidrogênio (H₂O₂)

As células do peritônio foram ressuspensas com PBS e ajustadas para 1×10^6 /mL, e 100µL foram transferidos para os poços de uma placa de 96 poços. Cada amostra foi testada em triplicata, para avaliação do NM (não marcado), DHR (espontâneo) e DHR+PMA (estimulado). Estas células foram incubadas a 37°C, em presença de DHR (Dihydrorhodamine 100 ng/mL; SIGMA-ALDRICH), por 10 minutos. Em seguida, tratadas ou não com éster de forbol, Phorbol-12- miristato-13- acetato (PMA - 50nM; SIGMA-ALDRICH) e incubadas por 1 hora a 37°C. Em seguida foram lavadas com PBS, e ressuspensas para leitura. As aquisições foram feitas em citômetro de fluxo FACScalibur (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA), no canal FL1. Para análise, 5000 eventos foram adquiridos, levando-se em consideração os parâmetros de tamanho (Forward Scatter, FSC) e complexidade celular (Side Scatter, SSC) para estabelecimento do gate de aquisição. Os dados foram analisados no

software Flow Jow® (TreeStar) e expressos em média de intensidade de fluorescência (MFI) e percentual de células expressando a marcação com DHR.

4.6.7 Determinação da produção de óxido nítrico

Foram transferidos 50µL dos sobrenadantes das culturas para placas de 96 poços de fundo chato aos quais foram adicionados 50µL de reagente de Griess (1% de sulfanilamida/0,1% de dihidroclorato de naftileno/2,5% de ácido orto-fosfórico) em temperatura ambiente por 10 minutos ao abrigo da luz. A absorbância foi determinada no leitor de microplaca (Molecular Devices, SpectraMax® Plus 384), com filtro de 540nm, com branco constituído por meio RPMI mais reagente de Griess. Os resultados obtidos em densidade óptica foram transformados em µM de NO, mediante equação de regressão linear com base na curva padrão obtida com concentrações conhecidas de nitrito de sódio (0, 5, 10, 30 e 60µM de NO) (DING; NATHAN; STUEHR, 1988).

4.6.8 Fenotipagem das células do baço e peritônio

Para avaliação fenotípica, as células do baço e peritônio (1×10^6 /mL) foram ressuspensas em 100 µL de PBS e transferidas para uma placa de 96 poços de fundo redondo e centrifugadas (340 G /4°C/ 3 minutos). Após centrifugação o sobrenadante foi descartado e adicionou-se 200µL de PBSA 1% (PBS 1x mais BSA 1%) ao pellet formado para ser lavado por duas vezes. Após a lavagem foi adicionado aos poços 50µL anticorpo Fc Block (BD Pharmingen) na proporção de 1µL do Anticorpo:100µL de PBSA 1% em todos os poços para incubar por 15 minutos a 4°C. Adicionou-se 150µL de PBSA 1% e foi feita centrifugação das células a 340 G; 4°C durante 3 minutos. O sobrenadante foi descartado novamente e o pellet desprendido para ser incubado com o 100µL do mix de anticorpos e incubados durante 20 minutos ao abrigo da luz a 4°C. Passado o período de incubação foi adicionado mais 200µL de PBSA 1% para o pellet ser centrifugado por mais duas vezes (340 G/ 4°C / 3 min). Em seguida, as células foram fixadas com paraformaldeído à 4% e incubadas por 15 minutos à 4°C ao abrigo da luz para em seguida serem novamente lavadas por mais duas vezes com PBSA 1%. Após a última lavagem, o pellet foi ressuspenso em 150µL de PBSA 1%. As suspensões de células foram transferidas para microtubos de leitura

para aquisição de 20000 eventos no citômetro de fluxo FACScalibur (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA). Os dados foram analisados no programa Flow Jow®(TreeStar).

Para as células do baço, foram montados 3 painéis de marcação com os seguintes anticorpos monoclonais conjugados com fluorocromos: anti-CD3 conjugado com FITC; anti-CD28 e anti-CD19 conjugados com PE; anti-CD4 e anti-CD8 conjugados com PerCP; e anti-F4/80 conjugado com PerCP-Cy5.5; (BD Biosciences Pharmingen) (Quadro 2). Para as células peritoneais, foi montado 1 painel de marcação com os seguintes anticorpos monoclonais conjugados com fluorocromos: anti-iNOS conjugado com PE-Cy7; e anti-F4/80 conjugado com PerCP-Cy5.5; (BD Biosciences Pharmingen) (Quadro 3).

Para cada painel foi realizada a marcação com os respectivos isotipos no pool de células. Para calibração do citômetro, foi realizado um pool de células, que foram utilizadas no controle branco (sem anticorpo conjugado) e três controles positivos 1, 2 e 3 (marcados com um anticorpo conjugado com fluorocromo da molécula mais expressa para seu canal correspondente).

Quadro 2. Painéis para marcação das células do baço

FLUOROCROMO	FITC	PerCP	PE	PerCP-Cy5.5
PAINEL 1	CD3	CD4	CD28	-
PAINEL 2	CD3	CD8	CD28	-
PAINEL 3	-	-	CD19	F4/80

Quadro 3. Painel para marcação das células do peritônio

FLUOROCROMO	PE-Cy7	PerCP-Cy5.5
PAINEL 1	iNOS	F4/80

4.7 Avaliação histopatológica e histomorfométrica do tecido hepático

Com relação à análise histológica, amostras de fígado (parte central do lobo lateral esquerdo) foram retiradas de quatro camundongos por grupo, e fixadas em formol a 10% por 48 horas. O material passou por uma sequência de imersão em álcool a 70%, 80%, 95% e absoluto 1 e 2. Posteriormente foi imerso em xilol 1 e 2

para clarificação e finalmente, embebido em parafina histológica para inclusão. Após a inclusão em parafina os blocos foram seccionados em micrótomo na espessura de 5µm e os cortes corados com hematoxilina-eosina (LUNA, 1968).

Análise histopatológica foi realizada por microscopia óptica de luz comum, avaliando-se parâmetros patológicos (infiltrado inflamatório, lesão tecidual, necrose, presença de granulomas e congestão vascular) através do sistema de escore que determina (0) ausente, (1) leve, (2) moderado e (3) intenso. A análise histomorfométrica foi realizada por software ImageJ, em imagens de 6 campos aleatórios por amostra histológica para a contagem do número e área dos granulomas. As imagens foram feitas usando um microscópio óptico invertido (NIKON®, modelo eclipse Ti-U) acoplado a uma câmera digital e sistema de computador (NIS-*Elements advanced research*). Todas as avaliações foram realizadas por observadores “duplo-cegos”.

4.8 Análise estatística

Os dados foram analisados utilizando Software Prism 6 (GraphPad, San Diego, CA, EUA). Os resultados foram apresentados como média $\pm$ desvio padrão (S.D). A normalidade foi avaliada pelo teste Kolmogorov–Smirnov. O teste *t* de Student foi utilizado e o nível de significância foi de 5% (um valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo). Para avaliação da curva de sobrevivência foi utilizada a curva de KaplanMeier e a análise estatística foi realizada pelo teste de Log-Rank. E utilizou-se teste Two-way ANOVA para avaliar a viabilidade *in vitro* dos diferentes grupos.

5 RESULTADOS

5.1 Extrato de *D. ambrosioides* (EDA) apresenta efeito cercaricida *in vitro*

No decorrer da exposição das cercárias de *S. mansoni* frente a diferentes concentrações do EDA, observou-se que após três horas (180 minutos) todas as larvas morreram. As concentrações de 10.000 µg/mL e 5.000 µg/mL as larvas apresentaram menor sobrevida, morrendo em 15 minutos e 30 minutos, respectivamente. Nas concentrações de 1.000 µg/mL e 500 µg/mL, 100% das larvas estavam mortas após 90 minutos. E na concentração de 250 µg/mL, as larvas apresentaram maior sobrevida, ficando inativas (20%) após 90 minutos, e completando os 100% em 150 minutos. O tempo médio de sobrevivência das cercárias do grupo controle foi superior a 3 horas, permanecendo viáveis em até 20 horas (Figura 8A e B).

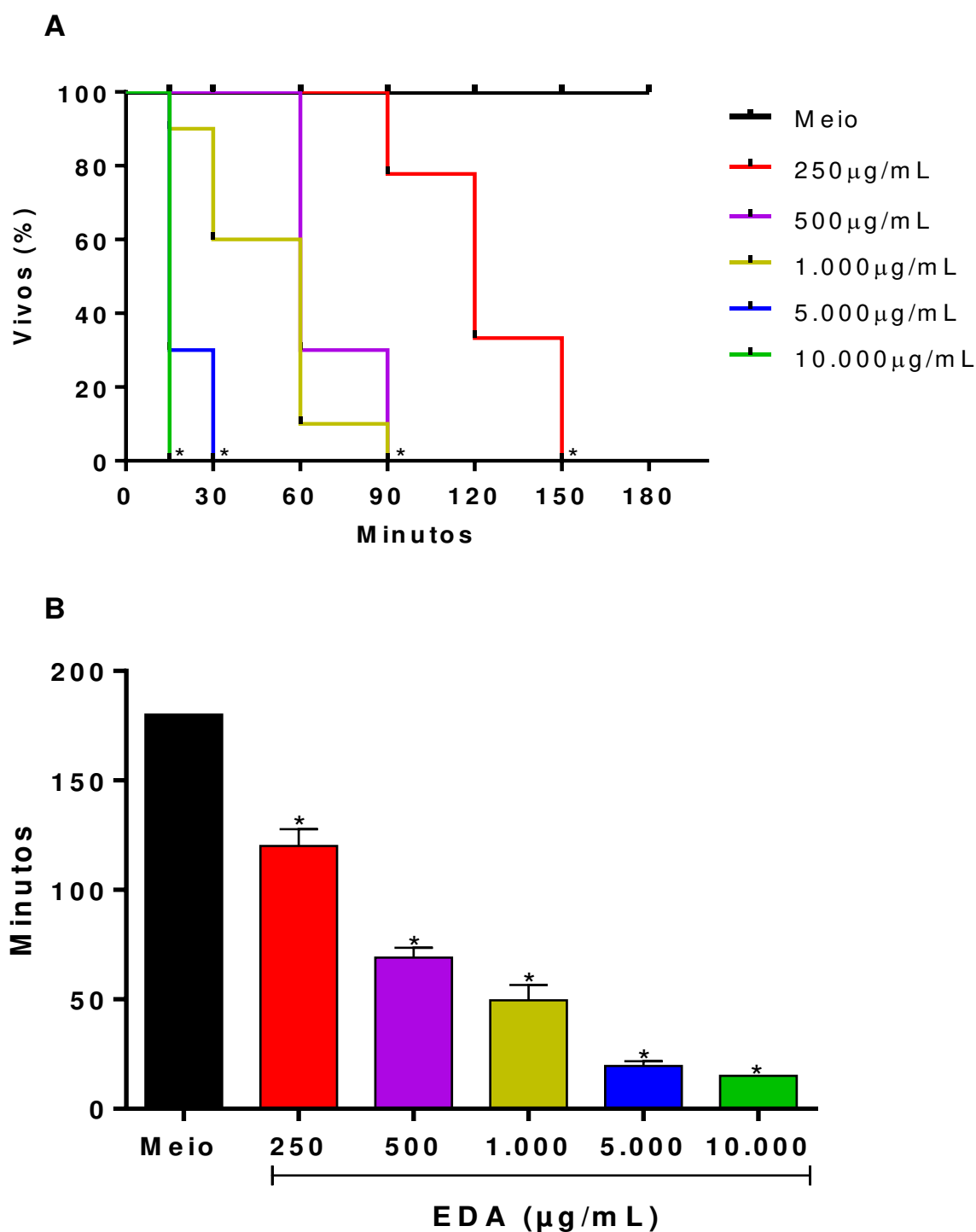


Figura 8. Sobrevivência de cercárias de *S. mansoni* (Cepa LE – Belo Horizonte/MG) durante 180 minutos de exposição ao extrato hidroalcoólico de *D. ambrosioides*. Foram utilizadas 10 larvas por poço em quadruplicata em diferentes concentrações (µg/mL) do extrato. No grupo controle utilizou-se apenas meio. (A) Avaliação do percentual de sobrevivência pela curva de Kaplan Meier e a análise estatística pelo teste de Log-Rank. (B) Avaliação da inatividade das larvas pela média de minutos. *p<005 em comparação ao controle.

5.2 O EDA apresenta atividade esquistossomicida *in vitro*

No decorrer da exposição dos vermes machos de *S. mansoni* frente a diferentes concentrações do extrato hidroalcoólico de *D. ambrosioides*, observou-se que após 24 horas todos os helmintos estavam mortos. A concentração 250 µg/mL foi a mais efetiva, pois os vermes machos apresentaram 50% de viabilidade (com score: 2 a 1.5) após 6 horas, e morreram (score: 0) após 9 horas de cultura. As concentrações de 150 µg/mL e 50 µg/mL, os vermes machos apresentaram 50% de viabilidade (com score: 2 a 1) após 12 horas, e morreram (score: 0) após 16 horas e 20 horas de cultura, respectivamente. No grupo controle positivo, tratado com praziquantel, os vermes apresentaram 50% viabilidade (com score: 2 a 1.5) após 3 horas, morreram após 5 horas de cultura. O tempo médio de sobrevivência dos helmintos do grupo controle negativo, sem exposição às drogas, foi de 48 horas (score: 3) de cultura (Figura 9A e B).

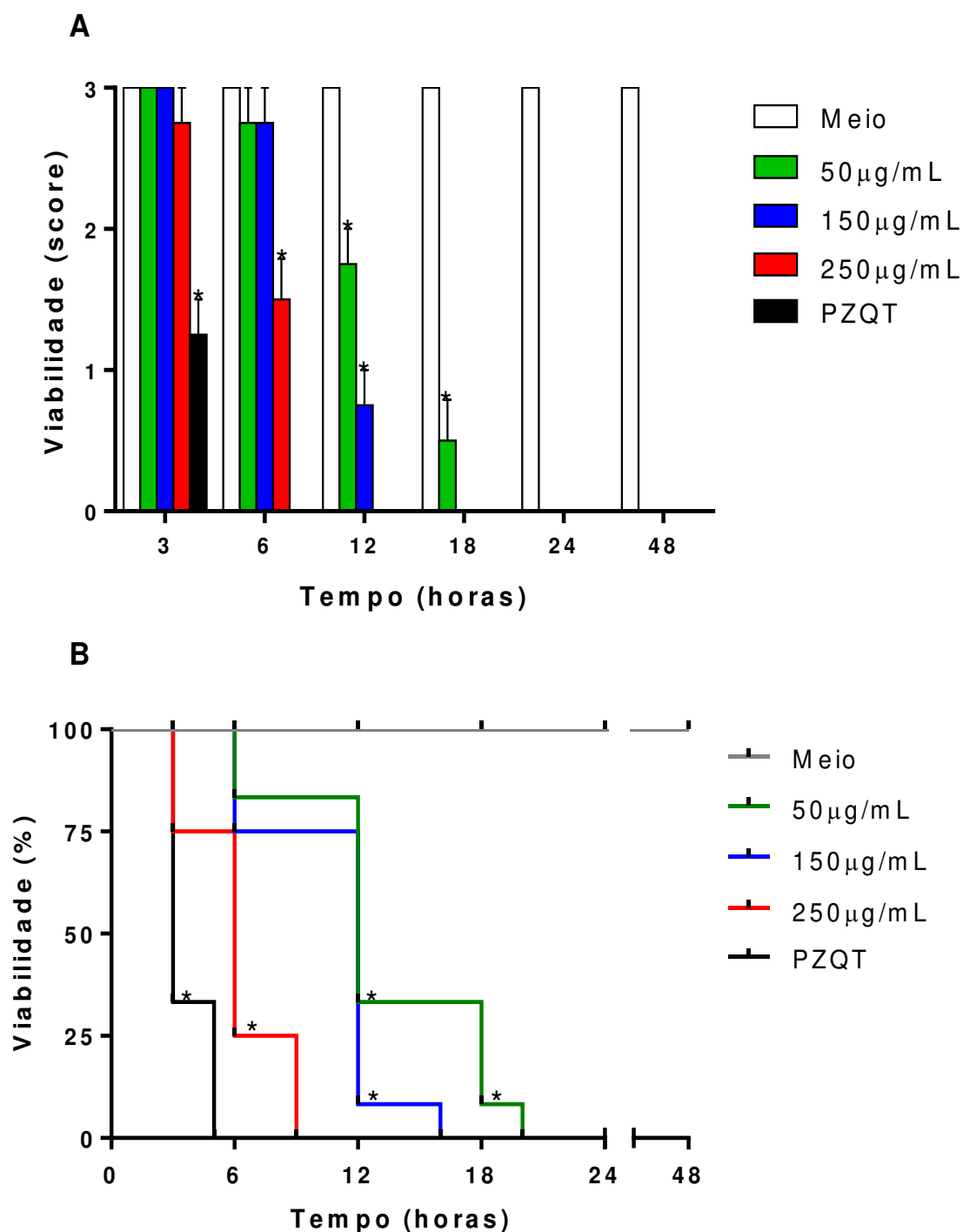


Figura 9. Viabilidade de vermes machos adultos de *S. mansoni* (Cepa LE – Belo Horizonte/MG) durante 24 horas de exposição ao extrato hidroalcoólico de *D. ambrosioides*. Foram utilizados dois vermes machos por poço em quadruplicata em diferentes concentrações (µg/mL) do extrato. No grupo controle negativo utilizou-se apenas meio. No grupo controle positivo utilizou-se droga anti-*Schistosoma* (Praziquantel). A viabilidade dos vermes foi monitorada através escala de viabilidade que varia de 0 a 3 (3 = movimento corporal completo; 2 a 1.5 = mobilidade lenta e parcial; 1 = atividade mínima ou imóvel, mas o verme ainda vivo; 0 = verme morto), e analisados pelo teste Two-way ANOVA (A). Para avaliação do percentual de sobrevivência foi utilizada a curva de Kaplan Meier e a análise estatística foi realizada pelo teste de Log-Rank (B). * $p < 0.05$ em comparação ao controle negativo.

A partir do cálculo de IC₅₀, foram estabelecidas as concentrações do extrato hidroalcoólico de *D. ambrosioides* capazes de inibir 50% de viabilidade dos vermes nas diferentes horas avaliadas. Essas concentrações variaram de, 178.5 a 6.5µg/mL (Tabela 1).

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

	Tempo (horas)				
	3	6	12	18	24
IC ₅₀ - µg/mL	178.5	152.3	34.9	7.7	6.5

^a Os valores de IC₅₀ apresentados foram determinados a partir de curvas de regressão sigmoidal feitas no programa Graph Pad Prism 6.0.

5.3 Efeito esquistossomicida *in vivo* do EDA

5.3.1 O tratamento com EDA reduz ovos nas fezes e nos tecidos

O tratamento com extrato hidroalcoólico de *D. ambrosioides*, em diferentes fases da infecção, reduziu o número total de ovos eliminados nas fezes e retidos no tecido hepático, apresentando eficácia semelhante ao controle positivo, e sendo diferente ao controle negativo (Figura 10A e B).

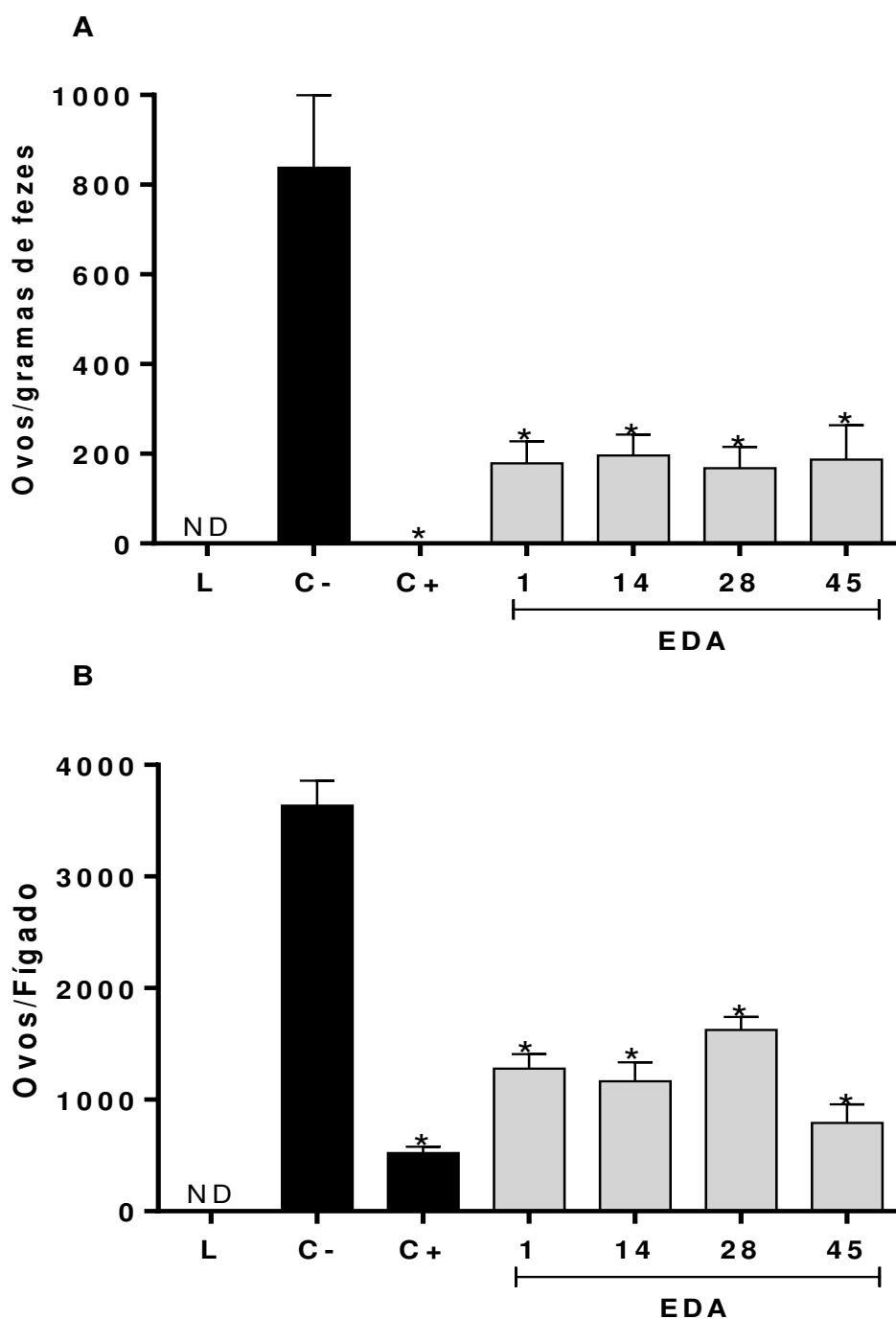


Figura 10. Efeito do tratamento com extrato hidroalcoólico de *D. ambrosioides* sobre o número de ovos presentes nas fezes (A) e retidos no fígado (B) de camundongos infectados por *S. mansoni*. O número total de ovos eliminados por grama de fezes foi estimado a partir do método de diluição com solução salina (0,85% NaCl) e solução de formol tamponado a 10%. O número de ovos retidos no fígado foi quantificado pelo método de digestão completa com KOH 5%. No dia 0 os camundongos foram infectados com 50 cercárias e eutanasiados no 60º dia. O grupo limpo (L) não foi infectado. O controle negativo (C-) não recebeu tratamento. O controle positivo (C+) foi tratado (45º ao 51º dia) por via oral com Praziquantel na dose de 50mg/kg. Nos dias 1 ao 7 (EDA1), 14 ao 20 (EDA14), 28 ao 34 (EDA28) e 45 ao 51 (EDA45) foram tratados por via oral com EDA na dose de 50mg/kg. Os valores representam a média ± desvio padrão de 6 animais por grupo. * $p < 0.05$ em comparação ao controle negativo.

5.4 Efeito de EDA sobre a resposta imune camundongos infectados

5.4.1 O tratamento com EDA altera parâmetros leucométricos de camundongos infectados por *S. mansoni*

Os dados relacionados ao perfil leucométrico de camundongos infectados ou não por *S. mansoni*, e tratados ou não com extrato hidroalcoólico de *D. ambrosioides*, se encontram na Tabela 2 (frequência absoluta) e Tabela 3 (frequência relativa).

A infecção (controle negativo) aumentou número de leucócitos totais, monócitos e eosinófilos, e reduziu o número linfócitos, quando comparado ao controle limpo. Os grupos tratados com *D. ambrosioides*, quando comparados ao controle negativo, apresentaram alteração do número de leucócitos totais, dependendo do intervalo de tratamento, sendo maior no grupo EDA14 e menor no grupo EDA45; a contagem diferencial mostrou redução do número de neutrófilos, monócitos e eosinófilos no EDA45; o grupo EDA 28 também houve redução do número eosinófilo.

O tratamento com o extrato induziu o aumento do número de linfócitos em relação aos controles negativo e positivo.

Tabela 2. Contagem global e diferencial de leucócitos do sangue de camundongos infectados ou não por *S. mansoni*, e tratados ou não com extrato hidroalcoólico de *D. ambrosioides*.

Célula (x10 ³ / mm ³)	Grupos						
	L	C-	C+	EDA1	EDA14	EDA28	EDA45
Leucócitos	3.7 ±0.6	6.5 ±0.9 [@]	5.8 ±1.6	7.4 ±2.3	11.5 ±4.8*	7.5 ±0.9	4.8 ±1.1*
Neutrófilos	2.6 ±0.5	3.0 ±0.4	3.4 ±1.0	2.7 ±1.1	3.1 ±1.4	2.7 ±0.8	1.9 ±0.5*
Linfócitos	1.0 ±0.3	0.6 ±0.2 [@]	0.6 ±0.3	2.7 ±0.9* [#]	5.9 ±2.5* [#]	3.0 ±0.7* [#]	1.7 ±0.6* [#]
Monócitos	0.1 ±0.1	1.4 ±0.6 [@]	1.3 ±0.6	1.1 ±0.5	1.4 ±0.5	1.2 ±0.5	0.6 ±0.1*
Eosinófilos	0	1.4 ±0.4 [@]	0.6 ±0.3*	0.8 ±0.5	1.1 ±0.5	0.7 ±0.2*	0.5 ±0.1*

^a No dia 0 os camundongos foram infectados com 50 cercárias e eutanasiados no 60º dia. O grupo limpo (L) não foi infectado. O controle negativo (C-) não recebeu tratamento. O controle positivo (C+) foi tratado (45º ao 51º dia) por via oral com Praziquantel na dose de 50mg/kg. Nos dias 1 ao 7 (EDA1), 14 ao 20 (EDA14), 28 ao 34 (EDA28) e 45 ao 51 (EDA45) foram tratados por via oral com EDA na dose de 50mg/kg.

^b Os valores representam a média ± desvio padrão de 6 animais por grupo.

@ p<0.05 em comparação ao controle limpo; * p<0.05 em comparação ao controle negativo; # p<0.05 em comparação ao grupo controle positivo.

Em relação ao percentual do perfil leucométrico (Tabela 3), o controle negativo aumentou o percentual de neutrófilos, monócitos e eosinófilos, e reduziu o percentual de linfócitos, quando comparado ao controle limpo.

O tratamento com o extrato, em relação aos controles negativo e positivo, apresentou aumento do percentual linfócitos, e redução do percentual de neutrófilos; além da redução do percentual de monócitos nos grupos EDA14 e EDA28.

Os grupos tratados com *D. ambrosioides* ou com praziquantel (controle positivo) apresentaram redução do percentual de eosinófilos em relação ao controle negativo.

Tabela 3. Percentual total e diferencial de leucócitos do sangue de camundongos infectados ou não por *S. mansoni*, e tratados ou não com extrato hidroalcoólico de *D. ambrosioides*.

Célula (%)	Grupos						
	L	C-	C+	EDA1	EDA14	EDA28	EDA45
Leucócitos	100	100	100	100	100	100	100
Neutrófilos	71.2 ±6.9	46.3 ±3.5 [@]	58.5 ±7.2	36.8 ±10.5 ^{*#}	26.2 ±3.1 ^{*#}	36.3 ±9.3 ^{*#}	39.3 ±2.7 ^{*#}
Linfócitos	26.7 ±6.6	8.8 ±2.8 [@]	10 ±3.5	37.3 ±9.4 ^{*#}	51.2 ±1.9 ^{*#}	40 ±9.7 ^{*#}	34.5 ±5.5 ^{*#}
Monócitos	2.8 ±1.2	20.8 ±6 [@]	22.7 ±5.6	15.3 ±4.1	12.7 ±1.4 ^{*#}	15.8 ±5	8.8 ±4 ^{*#}
Eosinófilos	0	21.3 ±4.3 [@]	10.7 ±4.7 [*]	10.8 ±4.8 [*]	10 ±2.1 [*]	8.8 ±1.9 [*]	11.8 ±2.9 [*]

^a No dia 0 os camundongos foram infectados com 50 cercárias e eutanasiados no 60º dia. O grupo limpo (L) não foi infectado. O controle negativo (C-) não recebeu tratamento. O controle positivo (C+) foi tratado (45º ao 51º dia) por via oral com Praziquantel na dose de 50mg/kg. Nos dias 1 ao 7 (EDA1), 14 ao 20 (EDA14), 28 ao 34 (EDA28) e 45 ao 51 (EDA45) foram tratados por via oral com EDA na dose de 50mg/kg.

^b Os valores representam a média ± desvio padrão de 6 animais por grupo.

@ p<0.05 em comparação ao controle limpo; * p<0.05 em comparação ao controle negativo; #p<0.05 em comparação ao grupo controle positivo.

5.4.2 O tratamento com EDA aumenta celularidade da medula óssea de camundongos infectados por *S. mansoni*

Em relação à celularidade da medula óssea (Tabela 4), o controle negativo aumentou o número de células, quando comparado ao controle limpo. Os grupos

tratados com *D. ambrosioides*, em relação controle negativo, apresentaram aumento no número de células no grupo EDA28.

Tabela 5. Celularidade da medula óssea de camundongos infectados ou não por *S. mansoni*, e tratados ou não com extrato hidroalcoólico de *D. ambrosioides*.

Órgãos	Grupos						
	L	C-	C+	EDA1	EDA14	EDA28	EDA45
Medula óssea (x10⁶/mL)	1.3 ±0.6	4.3 ±1.7 [@]	5.8 ±1.4	5.8 ±1.3	7.4 ±3.5	7.4 ±1.6*	6.0 ±2.5

^a No dia 0 os camundongos foram infectados com 50 cercárias e eutanasiados no 60º dia. O grupo limpo (L) não foi infectado. O controle negativo (C-) não recebeu tratamento. O controle positivo (C+) foi tratado (45º ao 51º dia) com Praziquantel na dose de 50mg/kg. Nos dias 1 ao 7 (EDA1), 14 ao 20 (EDA14), 28 ao 34 (EDA28) e 45 ao 51 (EDA45) foram tratados por via oral com EDA na dose de 50mg/kg.

^b Os valores representam a média ± desvio padrão de 6 animais por grupo.

@ p<0.05 em comparação ao controle limpo; * p<0.05 em comparação ao controle negativo.

5.4.3 O tratamento com EDA reduz níveis de IgE total no soro de camundongos infectados por *S. mansoni*

Em relação a dosagem das concentrações séricas de IgE total (Figura 11), o controle negativo apresentou aumento, em relação ao controle limpo. Entretanto, os grupos tratados com *D. ambrosioides*, em relação controle negativo, apresentaram redução dos níveis de IgE total nos grupos EDA28 e EDA45.

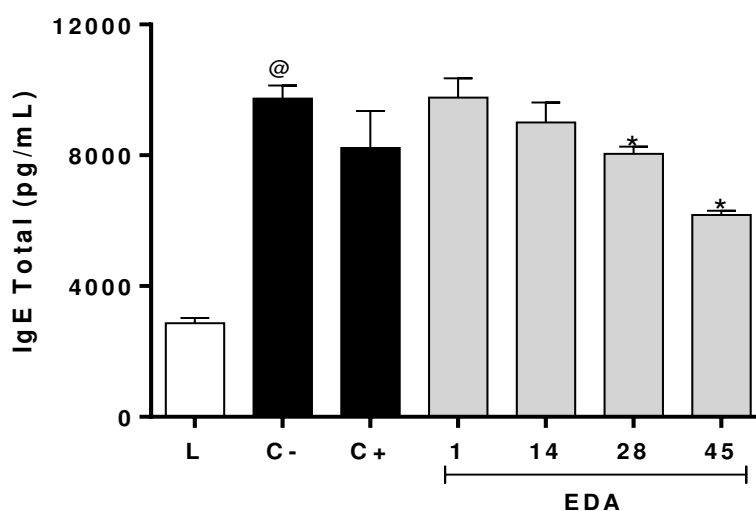


Figura 11. Concentrações séricas de IgE total de camundongos infectados ou não por *S. mansoni*, e tratados ou não com extrato hidroalcoólico de *D. ambrosioides*. O soro foi obtido de animais que, no dia 0 foram infectados com 50 cercárias e eutanasiados no 60º dia. O grupo limpo (L) não foi infectado. O controle negativo (C-) não recebeu tratamento. O controle positivo (C+) foi tratado (45º ao 51º dia) por via oral com Praziquantel na dose de 50mg/kg. Nos dias 1 ao 7 (EDA1), 14 ao 20 (EDA14), 28 ao 34 (EDA28) e 45 ao 51 (EDA45) foram tratados por via oral com EDA na dose de 50mg/kg. @ p<0.05 em comparação ao controle limpo; * p<0.05 em comparação ao controle negativo.

5.4.4 O tratamento com EDA aumenta número de linfócitos T, linfócitos B e macrófagos no baço de camundongos infectados por *S. mansoni*

Em relação à celularidade total do baço (Figura 12A), o controle negativo aumentou o número de células, quando comparado ao controle limpo. Os grupos tratados com *D. ambrosioides* apresentaram aumento no número de células no grupo EDA28, em relação aos controles negativo e positivo.

Quanto ao número de linfócitos T, linfócitos B e macrófagos no baço (Figura 12B, C e D), o controle negativo aumentou número de todos os subtipos celulares caracterizados, quando comparado ao controle limpo. Os grupos tratados com *D. ambrosioides*, em relação aos controles negativo e positivo, apresentaram aumento no número de todos subtipos celulares no grupo EDA28; e no grupo EDA14 houve aumento apenas de linfócitos B.

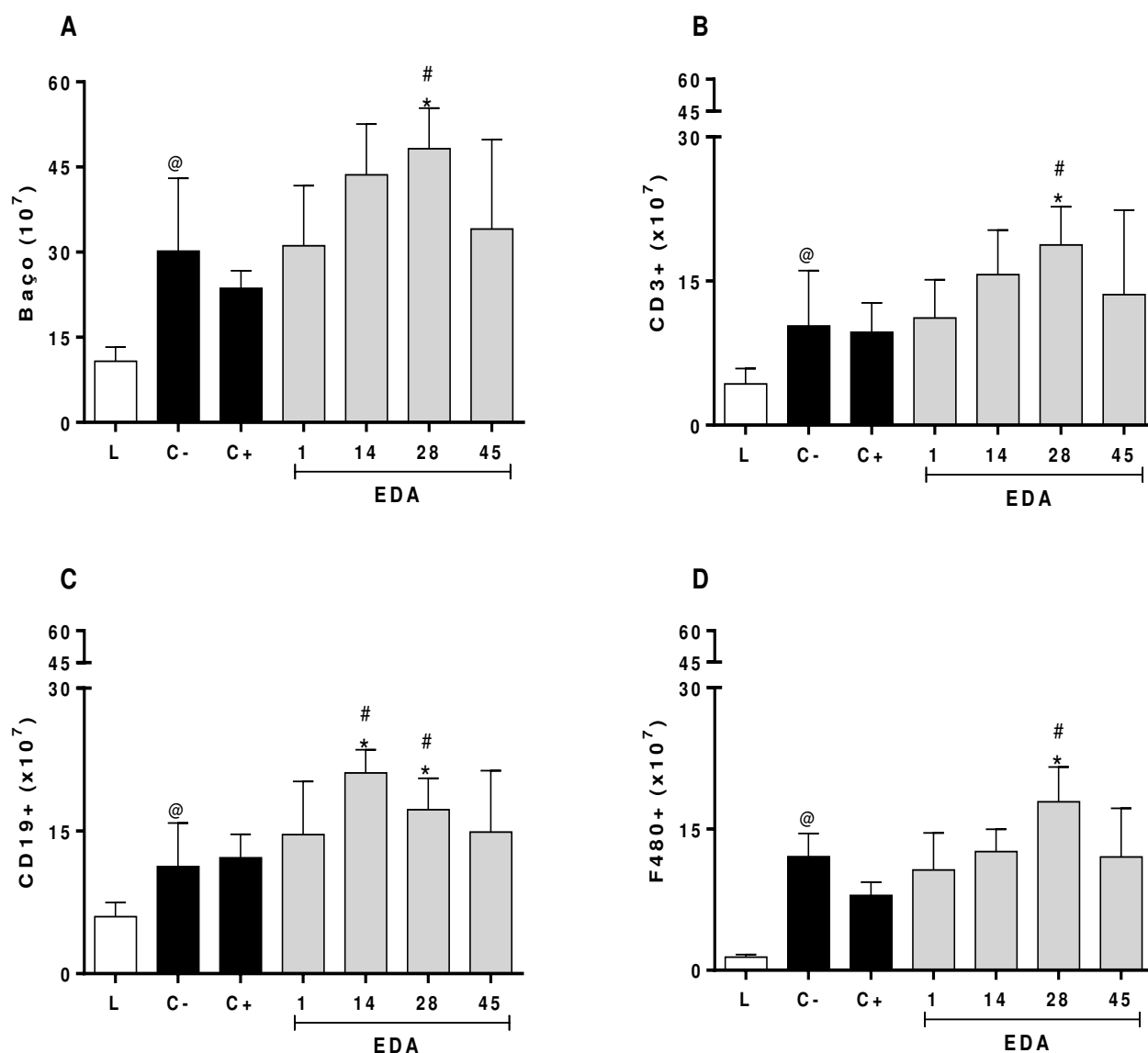


Figura 12. Celularidade total (A) e caracterização fenotípica dos linfócitos T (B), linfócitos B (C) e macrófagos (D) do baço de camundongos infectados ou não por *S. mansoni*, e tratados ou não com extrato hidroalcoólico de *D. ambrosioides*. As células do baço foram obtidas dos animais que, no dia 0 foram infectados com 50 cercárias e eutanasiados no 60º dia. O grupo limpo (L) não foi infectado. O controle negativo (C-) não recebeu tratamento. O controle positivo (C+) foi tratado (45º ao 51º dia) por via oral com Praziquantel na dose de 50mg/kg. Nos dias 1 ao 7 (EDA1), 14 ao 20 (EDA14), 28 ao 34 (EDA28) e 45 ao 51 (EDA45) foram tratados por via oral com EDA na dose de 50mg/kg. A suspensão celular do baço foi contada em câmara de Neubauer. Os esplenócitos foram marcados com anticorpos específicos e foi realizada análise das frequências absolutas. Os valores representam a média $\pm$ desvio padrão de 6 animais por grupo. @ p<0.05 em comparação ao controle limpo; * p<0.05 em comparação ao controle negativo; #p<0.05 em comparação ao grupo controle positivo.

5.4.5 O tratamento com EDA aumenta número de linfócitos T auxiliares e citotóxicos no baço de camundongos infectados por *S. mansoni*

Em relação ao número de linfócitos T auxiliares (Figura 13A e B), o controle negativo aumentou o número de células, mas não alterou o número das células que expressam CD28, quando comparado ao controle limpo. Os grupos tratados com *D. ambrosioides* apresentaram aumento de linfócitos T CD4 e das células que expressam de CD28 no grupo EDA28, em relação aos controles negativo e positivo.

Quanto aos linfócitos T citotóxicos (Figura 13C e D), o controle negativo aumentou o número de células e das que expressam CD28, em relação ao controle limpo. Os grupos tratados com *D. ambrosioides* apresentaram aumento de linfócitos T CD8 e das células que expressam de CD28 no grupo EDA28, em relação aos controles negativo e positivo.

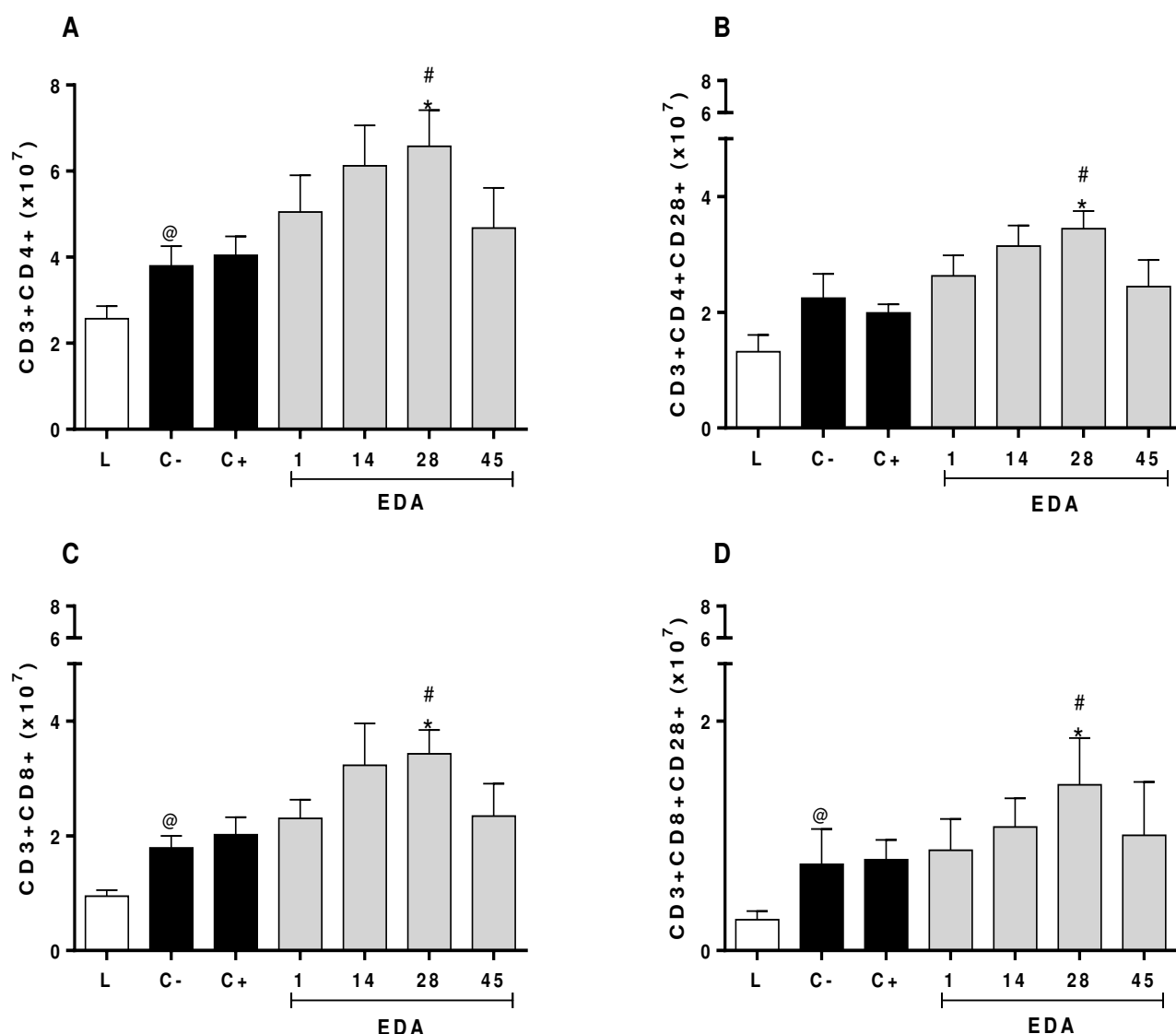


Figura 13. Caracterização fenotípica dos linfócitos T auxiliares (A e B) e linfócitos T citotóxicos (C e D) do baço de camundongos infectados ou não por *S. mansoni*, e tratados ou não com extrato hidroalcoólico de *D. ambrosioides*. As células do baço foram obtidas dos animais que, no dia 0 foram infectados com 50 cercárias e eutanasiados no 60º dia. O grupo limpo (L) não foi infectado. O controle negativo (C-) não recebeu tratamento. O controle positivo (C+) foi tratado (45º ao 51º dia) por via oral com Praziquantel na dose de 50mg/kg. Nos dias 1 ao 7 (EDA1), 14 ao 20 (EDA14), 28 ao 34 (EDA28) e 45 ao 51 (EDA45) foram tratados por via oral com EDA na dose de 50mg/kg. Os esplenócitos foram marcados com anticorpos específicos e foi realizada análise das frequências absolutas. Os valores representam a média $\pm$ desvio padrão de 6 animais por grupo. @ $p < 0.05$ em comparação ao controle limpo; * $p < 0.05$ em comparação ao controle negativo; # $p < 0.05$ em comparação ao grupo controle positivo.

5.4.6 O tratamento com EDA não altera celularidade da cavidade peritoneal de camundongos infectados por *S. mansoni*

Em relação à contagem total ou diferencial de células peritoneais (Tabela 5), o controle negativo aumentou número de células peritoneais totais, de macrófagos, linfócitos e eosinófilos, em relação ao controle limpo.

O tratamento com o EDA, em relação ao controle negativo, aumentou o número de neutrófilos, com exceção do grupo EDA14; e aumentou o número de linfócitos no grupo EDA14.

Os grupos tratados com *D. ambrosioides* ou com praziquantel (controle positivo) apresentaram redução de mastócitos em relação ao controle negativo.

Tabela 5. Contagem total e diferencial de células peritoneais de camundongos infectados ou não por *S. mansoni*, e tratados ou não com extrato hidroalcoólico de *D. ambrosioides*.

Células (x10 ⁶ / mL)	Grupos						
	L	C-	C+	EDA1	EDA14	EDA28	EDA45
Células Peritoneais	1.0 ±0.3	8.6 ±3.7[@]	6.0 ±2.7	9.5 ±2.1	13.9 ±6.4	12.0 ±4.6	10.7 ±3.2
Macrófagos	0.5 ±0.1	3.8 ±1.8 [@]	3.0 ±1.7	4.1 ±1.3	6.0 ±3.6	5.1 ±2.1	5.1 ±1.5
Neutrófilos	0.2 ±0.1	0	0	1.7 ±1.2*	0.2 ±0.3	1.1 ±0.5*	0.6 ±0.3*
Linfócitos	0.2 ±0.1	1.6 ±0.7 [@]	1.1 ±0.4	1.1 ±0.4	4.0 ±1.6*	2.3 ±0.8	1.6 ±0.5
Eosinófilos	0	2.9 ±1.3 [@]	1.9 ±0.9	2.6 ±0.5	3.5 ±2.4	3.5 ±1.4	3.4 ±1.4
Mastócitos	0.1 ±0.1	0.2 ±0.1	0*	0*	0*	0*	0*

^a No dia 0 os camundongos foram infectados com 50 cercárias e eutanasiados no 60º dia. O grupo limpo (L) não foi infectado. O controle negativo (C-) não recebeu tratamento. O controle positivo (C+) foi tratado (45º ao 51º dia) por via oral com Praziquantel na dose de 50mg/kg. Nos dias 1 ao 7 (EDA1), 14 ao 20 (EDA14), 28 ao 34 (EDA28) e 45 ao 51 (EDA45) foram tratados por via oral com EDA na dose de 50mg/kg.

^b Os valores representam a média ± desvio padrão de 6 animais por grupo.

[@] p<0.05 em comparação ao controle limpo; * p<0.05 em comparação ao controle negativo.

5.4.7 O tratamento com EDA não altera os percentuais de macrófagos e expressão de iNOS em células da cavidade peritoneal de camundongos infectados por *S. mansoni*

Em relação a caracterização fenotípica dos macrófagos (Figura 14A) e expressão da enzima iNOS (Figura 14B), o controle negativo aumentou o percentual de macrófagos, mas não alterou o percentual de expressão da iNOS, em relação ao grupo limpo.

Os grupos tratados com *D. ambrosioides* ou com praziquantel não apresentaram alteração no percentual de macrófagos e expressão da iNOS, em relação ao controle negativo.

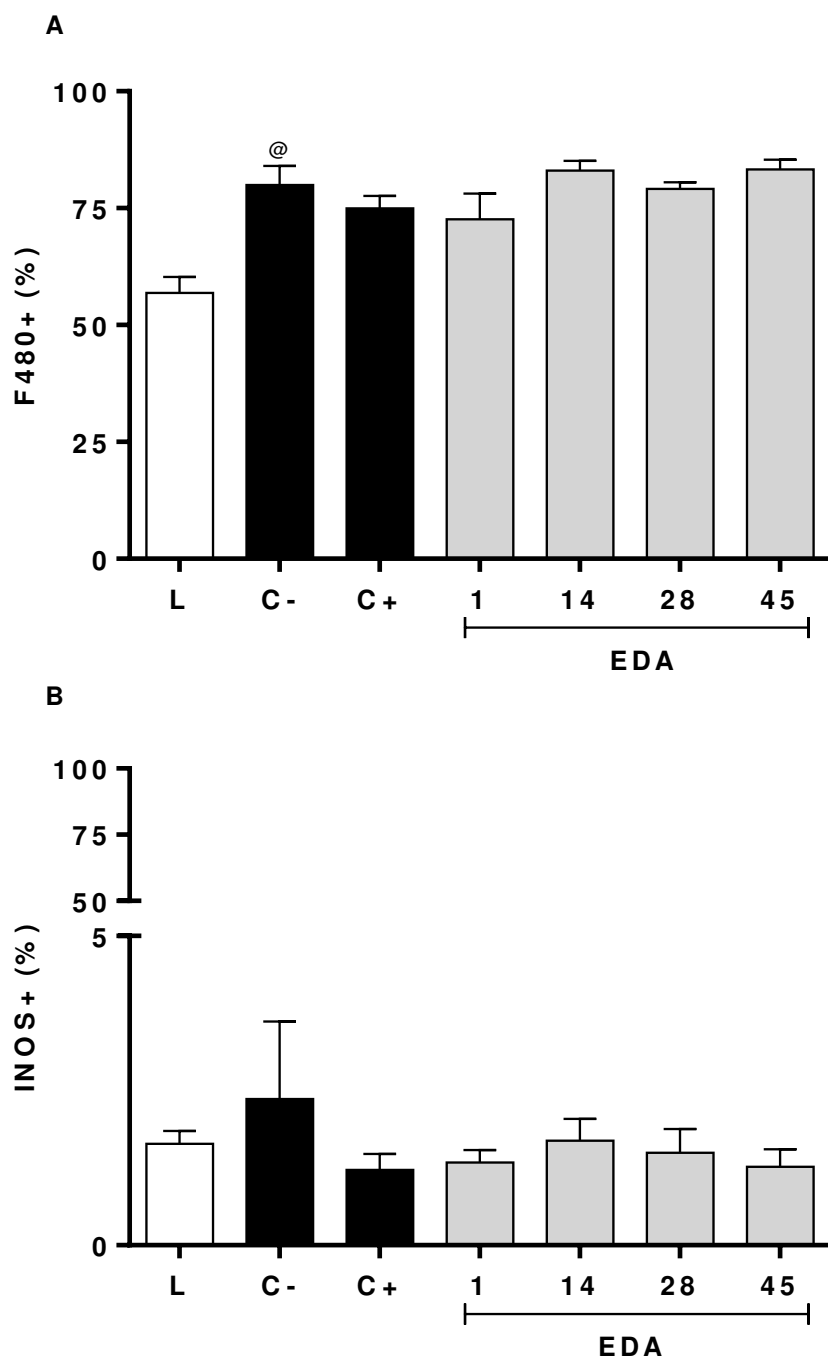


Figura 14. Percentual da análise fenotípica de macrófagos (A) e expressão de iNOS (B) em células da cavidade peritoneal de camundongos infectados ou não por *S. mansoni*, e tratados ou não com extrato hidroalcoólico de *D. ambrosioides*. As células peritoneais foram obtidas dos animais que, no dia 0 foram infectados com 50 cercárias e eutanasiados no 60º dia. O grupo limpo (L) não foi infectado. O controle negativo (C-) não recebeu tratamento. O controle positivo (C+) foi tratado (45º ao 51º dia) com Praziquantel na dose de 50mg/kg. Nos dias 1 ao 7 (EDA1), 14 ao 20 (EDA14), 28 ao 34 (EDA28) e 45 ao 51 (EDA45) foram tratados com EDA na dose de 50mg/kg. As células foram marcadas com anticorpos específicos ou para estimar a produção de H₂O₂ pelo método DHR, e em seguida, avaliadas em citômetro de fluxo FACSCalibur (BD Biosciences). Os valores representam a média $\pm$ desvio padrão de 6 animais por grupo. [@]p<0.05 em comparação ao controle limpo; *p<0.05 em comparação ao controle negativo; [#]p<0.05 em comparação ao grupo controle positivo.

5.4.8 O tratamento com EDA reduz produção peróxido de hidrogênio em células da cavidade peritoneal de camundongos infectados por *S. mansoni*

Em relação a produção de peróxido de hidrogênio avaliada nas células peritoneais (Figura 15), o controle negativo apresentou aumento espontâneo e estimulado (PMA), em relação ao controle limpo. O tratamento com *D. ambrosioides*, no grupo EDA1, ou com praziquantel apresentou redução da produção espontânea de peróxido de hidrogênio nas células peritoneais, em relação ao controle negativo.

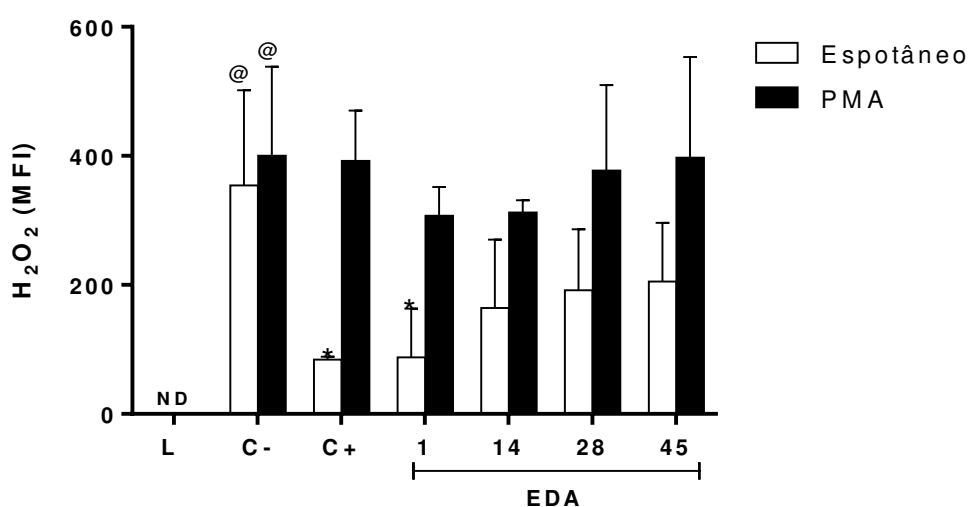


Figura 15. Avaliação da produção de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em camundongos infectados ou não por *S. mansoni*, e tratados ou não com extrato hidroalcoólico de *D. ambrosioides*. Foram utilizadas células do peritônio (1×10^6 /mL) de todos os camundongos para estimar a produção de H_2O_2 a partir do método DHR, e avaliadas em citômetro de fluxo FACSCalibur (BD Biosciences). No dia 0 os camundongos foram infectados com 50 cercárias e eutanasiados no 60º dia. O grupo limpo (L) não foi infectado. O controle negativo (C-) não recebeu tratamento. O controle positivo (C+) foi tratado (45º ao 51º dia) por via oral com Praziquantel na dose de 50mg/kg. Nos dias 1 ao 7 (EDA1), 14 ao 20 (EDA14), 28 ao 34 (EDA28) e 45 ao 51 (EDA45) foram tratados por via oral com EDA na dose de 50mg/kg. Os valores representam a média $\pm$ desvio padrão de 6 animais por grupo. @ $p < 0.05$ em comparação ao controle limpo; * $p < 0.05$ em comparação ao controle negativo.

5.5 Avaliação histopatológica e histomorfométrica do tecido hepático

5.5.1 O tratamento com EDA reduz infiltrado, necrose, lesão tecidual e presença de granuloma em tecido hepático de camundongos infectados por *S. mansoni*

Em relação a análise histopatológica do fígado (tabela 6), o controle negativo apresentou aumento de todos os parâmetros analisados, em relação ao controle limpo.

Em comparação ao controle negativo, o tratamento com *D. ambrosioides*, no grupo EDA28, ou com praziquantel apresentou redução em todos os parâmetros analisados; O grupo EDA1 apresentou redução em todos os parâmetros, exceto na necrose; o grupo EDA14 apresentou redução de lesão tecidual e presença de granuloma; o grupo EDA45 apresentou redução de congestão vascular.

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

	Grupos						
	L	C-	C+	EDA1	EDA14	EDA28	EDA45
Infiltrado	1 ±0	3 ±0 [@]	2 ±0*	2 ±0*	3 ±0	2 ±0*	2.5 ±0.5
Necrose	0	2 ±0 [@]	1 ±0*	1.5 ±0.5	1.5 ±0.5	1 ±0*	1.5 ±0.5
Lesão tecidual	1 ±0	3 ±0 [@]	2 ±0*	2 ±0*	2.3 ±0.5*	2 ±0*	2.5 ±0.5
Presença de granuloma	0	3 ±0 [@]	1 ±0*	2 ±0*	2 ±0*	1.5 ±0.5*	3 ±0
Congestão vascular	1 ±0	2 ±0 [@]	1 ±0*	1 ±0*	1.5 ±0.5	1.5 ±0.5	1 ±0*

^a No dia 0 os camundongos foram infectados com 50 cercárias e eutanasiados no 60º dia. O grupo limpo (L) não foi infectado. O controle negativo (C-) não recebeu tratamento. O controle positivo (C+) foi tratado (45º ao 51º dia) por via oral com Praziquantel na dose de 50mg/kg. Nos dias 1 ao 7 (EDA1), 14 ao 20 (EDA14), 28 ao 34 (EDA28) e 45 ao 51 (EDA45) foram tratados por via oral com EDA na dose de 50mg/kg. A análise foi realizada em cortes histológicos (corados com HE) da parte central do lobo lateral esquerdo do fígado (4 lâminas por grupo). A avaliação realizada com base no escores: 0= ausente; 1= leve; 2= moderado; 3= intenso.

^b Os valores representam a média ± desvio padrão de 4 animais por grupo.

@ p<0.05 em comparação ao controle limpo; * p<0.05 em comparação ao controle negativo.

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

Quanto ao número de granulomas por área no tecido hepático (Figura 16A e 17), o tratamento com *D. ambrosioides*, exceto no EDA45, ou com praziquantel apresentou redução, em relação ao controle negativo.

Em relação a análise da área dos granulomas no tecido hepático (Figuras 16B e 18), os grupos tratados com *D. ambrosioides* ou com praziquantel apresentaram redução da área, em relação ao controle negativo. O grupo EDA1 apresentou redução da área do granuloma, em relação ao controle positivo.

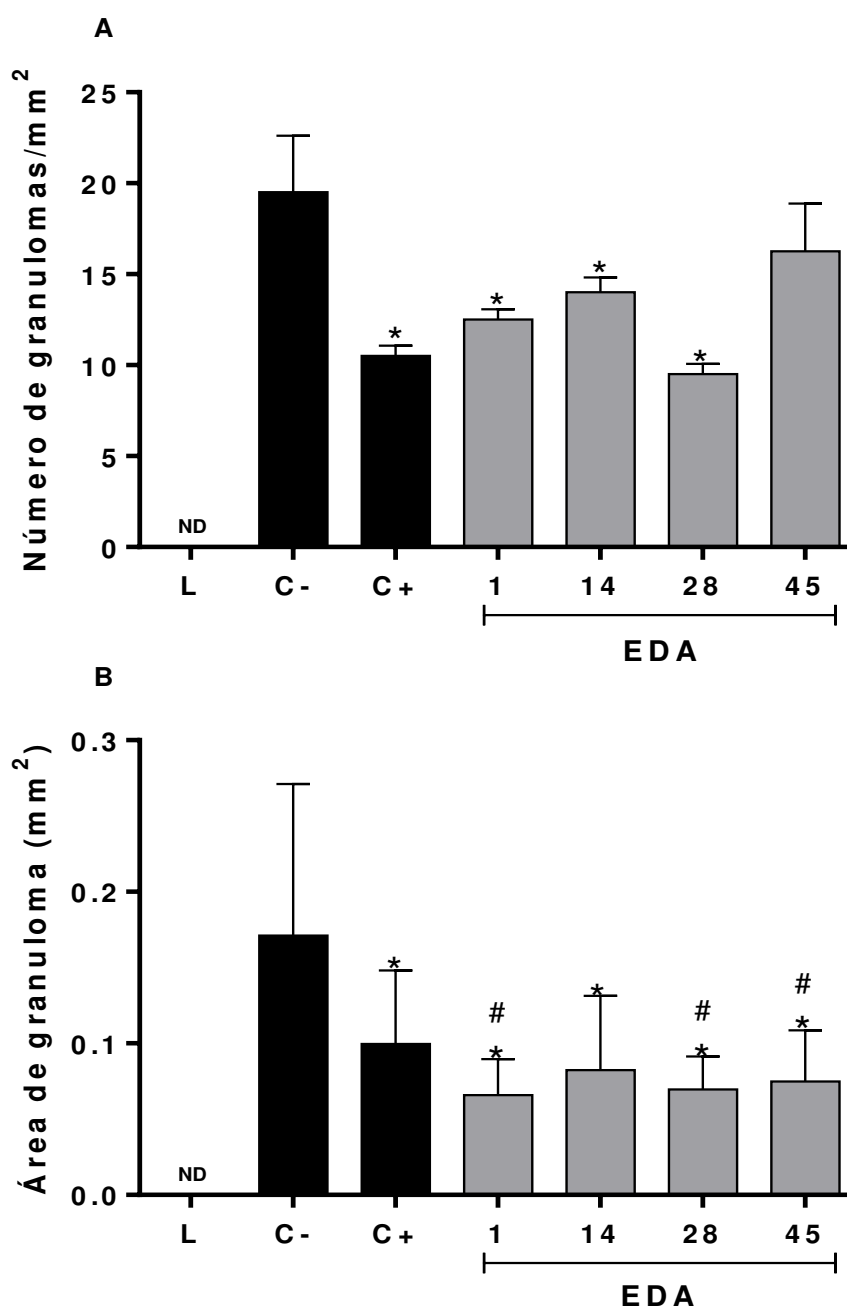


Figura 16. Análise morfométrica da área (A) e número (B) de granulomas no tecido hepático de camundongos infectados ou não por *S. mansoni*, e tratados ou não com extrato hidroalcoólico de *D. ambrosioides*. A análise foi realizada através do software ImageJ em imagens de cortes histológicos (corados com HE) da parte central do lobo lateral esquerdo do fígado (4 lâminas por grupo) de animais que, no dia 0 foram infectados com 50 cercárias e eutanasiados no 60º dia. O grupo limpo (L) não foi infectado. O controle negativo (C-) não recebeu tratamento. O controle positivo (C+) foi tratado (45º ao 51º dia) por via oral com Praziquantel na dose de 50mg/kg. Nos dias 1 ao 7 (EDA1), 14 ao 20 (EDA14), 28 ao 34 (EDA28) e 45 ao 51 (EDA45) foram tratados por via oral com EDA na dose de 50mg/kg. Os valores representam a média $\pm$ desvio padrão de 4 animais por grupo. * $p < 0.05$ em comparação ao controle negativo; # $p < 0.05$ em comparação ao controle positivo.

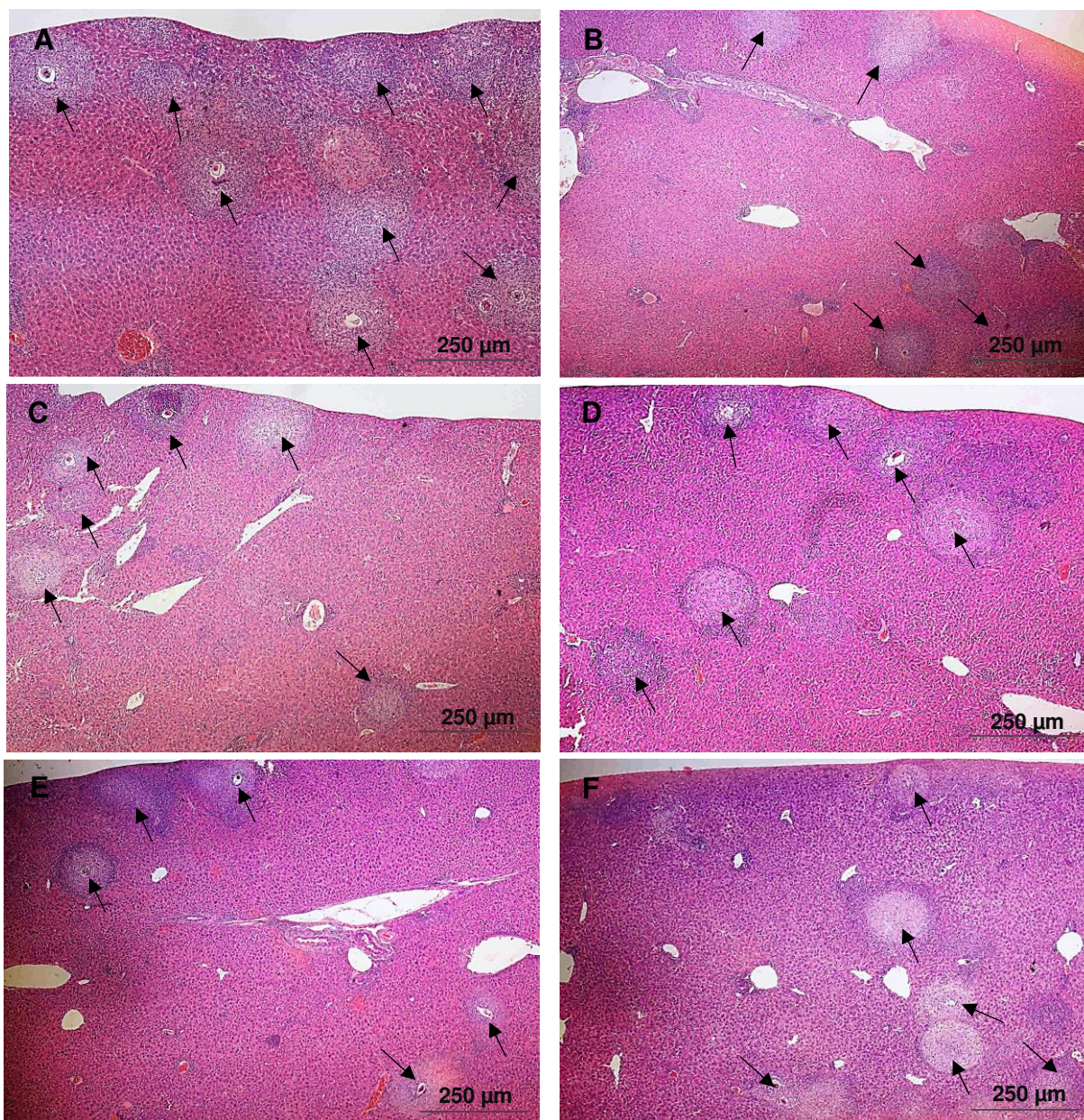


Figura 17. Fotomicrografia de cortes histológicos hepáticos de camundongos infectados ou não por *S. mansoni*, e tratados ou não com extrato hidroalcoólico de *D. ambrosioides* corados com HE (40x). As imagens representam número de granulomas sobre área do tecido hepáticos de animais que, no dia 0 foram infectados com 50 cercárias e eutanasiados no 60º dia. O controle negativo (A) não recebeu tratamento. O controle positivo (B) foi tratado (45º ao 51º dia) por via oral com Praziquantel na dose de 50mg/kg. Nos dias 1 ao 7 (EDA1) (C), 14 ao 20 (EDA14) (D), 28 ao 34 (EDA28) (E) e 45 ao 51 (EDA45) (F) foram tratados por via oral com EDA na dose de 50mg/kg.

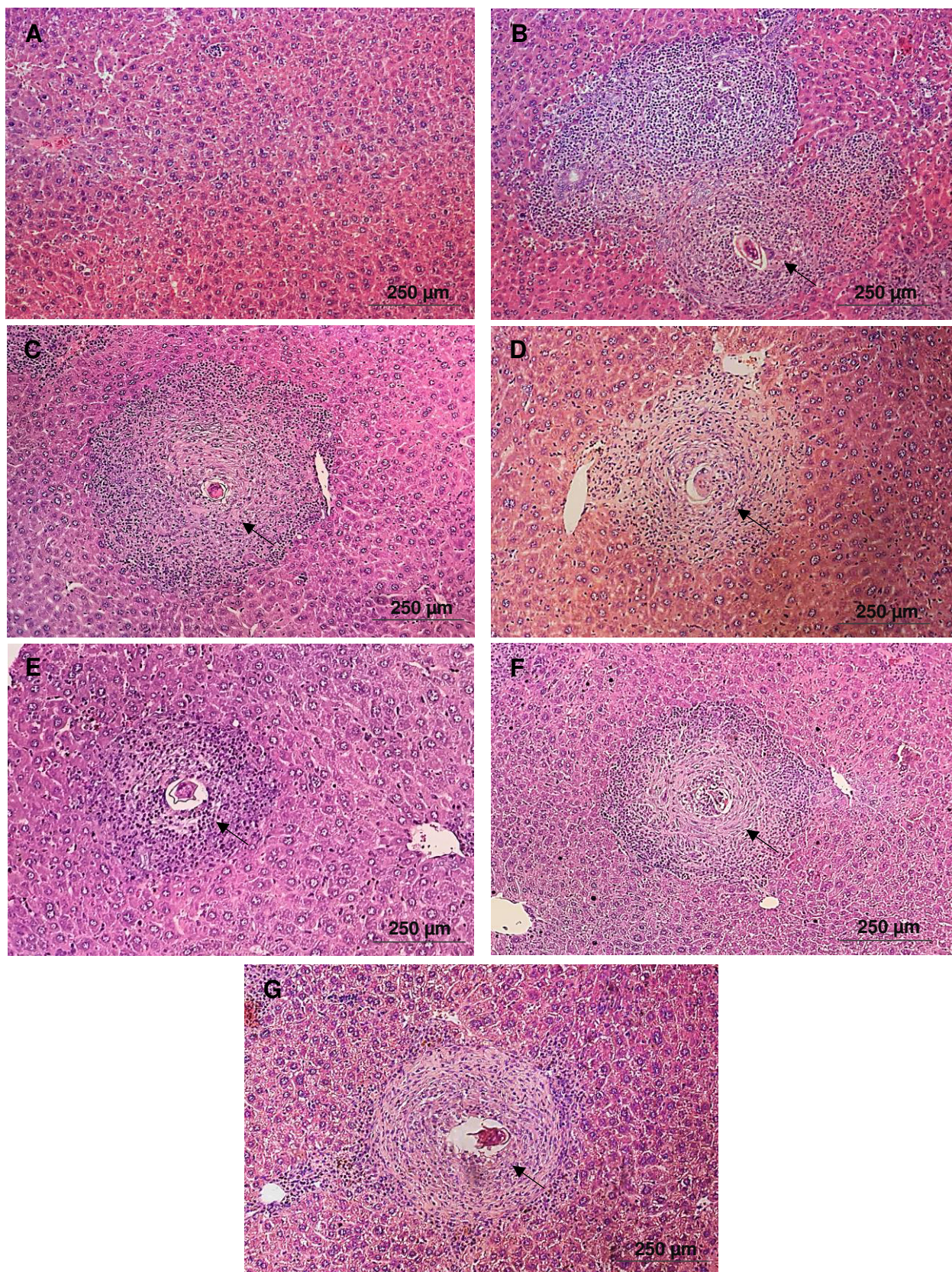


Figura 18. Fotomicrografia de cortes histológicos hepáticos de camundongos infectados ou não por *S. mansoni*, e tratados ou não com extrato hidroalcoólico de *D. ambrosioides* corados com HE (100x). As imagens representam áreas dos granulomas hepáticos de animais que, no dia 0 foram infectados com 50 cercárias e eutanasiados no 60º dia. O grupo limpo (A) não foi infectado. O controle negativo (B) não recebeu tratamento. O controle positivo (C) foi tratado (45º ao 51º dia) por via oral com Praziquantel na dose de 50mg/kg. Nos dias 1 ao 7 (EDA1) (D), 14 ao 20 (EDA14) (E), 28 ao 34 (EDA28) (F) e 45 ao 51 (EDA45) (G) foram tratados por via oral com EDA na dose de 50mg/kg.

6 DISCUSSÃO

Em síntese, os dados apresentados neste trabalho mostram que o tratamento com o EDA apresentou ação esquistossomicida *in vitro* e *in vivo*, e ação imunomoduladora sobre a infecção.

No ensaio cercaricida, todas as larvas morreram após três horas de exposição a diferentes concentrações do extrato. A disposição do EDA na água deve ser considerada como um fator de estresse químico, podendo alterar o comportamento e a expressão das larvas de maneira pontual ou duradoura (FEIL; FRAGA 2012; ROQUIS et al., 2015), onde a presença de macromoléculas solúveis presente no meio, sobre as cercárias de *S. mansoni*, pode acarretar efeitos danosos no desenvolvimento do parasito, levando-o a morte, e evidenciando tal composto como cercaricida ou larvicida (THORNHIL et al., 2009).

Na avaliação do efeito esquistossomicida de uma substância é importante conhecer a biologia do parasito, dessa maneira, parâmetros como, motilidade e alterações morfológicas, associados diretamente a mortalidade, são indicadores para tal efeito (KATZ, 2008). Em relação à atividade esquistossomicida *in vitro*, o EDA se mostrou eficaz nas três concentrações testadas, levando os vermes a morte em até 24 horas de cultura, com diferença em relação ao grupo controle negativo, onde os vermes permaneceram viáveis em até 48 horas.

Os bioensaios realizados por Soares et al (2017) evidenciaram que o óleo essencial de *D. ambrosioides*, nas maiores concentrações, apresentou atividade esquistossomicida, matando os vermes adultos em até 72 horas de cultura, com relatos de alteração tegumentar e redução da atividade motora, até morte total dos vermes adultos. Esses relatos corroboram com os achados em nosso estudo.

A ação do EDA pode estar relacionada às alterações no sistema neuromodulador ou neurotransmissor do parasito, pois estes, como serotonina, dopamina, acetilcolina, adrenalina, neuropeptídeos e glutamato, são responsáveis pela variedade de movimentos ondulatórios e peristálticos propagados ao longo da sua extensão corporal (SANGSTER et al., 2005; NOEL et al., 2008; MARKS; MAULE, 2010; TAMAN; RIBEIRO, 2011). Além disso, a ação do EDA pode estar associada ao tegumento de *Schistosoma* spp., que está envolvido em uma variedade de funções que são importantes para o verme, como a absorção de nutrientes, presença de proteínas responsáveis pela manutenção das respostas imunes do hospedeiro, pelos

reparos de danos, e por ser a interface entre o parasito e o ambiente hospedeiro (HOFFMANN et al., 1996; XIÃO et al., 2002; DOENHOFF et al., 2008). Assim, sugere-se que sistema neuromodulador ou neurotransmissor e o tegumento do parasito sejam os principais alvos na ação esquistossomicida do EDA presente no meio.

O grupo não tratado não apresentou qualquer alteração na viabilidade, atividade motora e tegumento dos vermes adultos, comprovando que os efeitos estavam relacionados a ação do extrato (DE MELO et al., 2011). No grupo tratado com PZQ, os vermes morreram em até 5 horas de cultura, pois sua ação esquistossomicida interfere na homeostasia dos íons de cálcio, provocando contrações musculares continuas e lesões no tegumento dos parasitos, que os levam a morte (ALMEIDA et al., 2011; GODINHO et al., 2014).

A caracterização química do EDA utilizada no presente estudo, realizada por Gomes (2018), revelou a presença de dezesseis compostos, tendo como majoritários aqueles derivados da Quercetina e Kaempferol (Apêndice A). Matos et al (2014) observaram que os flavonoides derivados da quercetina inibem o desenvolvimento do protozoário *Neospora caninum in vitro*. Já Helgren et al (2015) evidenciaram que os análogos da quercetina apresentaram efeitos antiparasitários contra o protozoário *Plasmodium falciparum*.

Por sua vez, Ferreira et al (2011) e Akkari et al (2014) constataram atividade anti-helmíntica de extratos aquosos e etanólicos de *Artemisia* sp. contra *Haemonchus contortus*, *Angiostrongylus cantonensis* e *S. mansoni in vitro*, sendo que a análise química desses extratos revelou a presença proeminente dos flavonoides quercetina e apigenina.

Apesar das propriedades e mecanismos de ação anti-helmíntica da quercetina ainda não estarem bem elucidados, tem havido grande interesse nas atividades biológicas desse flavonoide para uma variedade de doenças (D'ANDREA, 2015). Nossos resultados, *in vitro*, sugerem que a ação anti-*Schistosoma* do EDA sobre as cercárias e vermes adultos podem estar diretamente associados à quercetina, um dos principais flavonoides encontrado no extrato.

Com resultados promissores da atividade esquistossomicida *in vitro*, nós propusemos avaliar o efeito esquistossomicida e imunomodulador do EDA em camundongos experimentalmente infectados por *S. mansoni*. Para realização desta etapa, avaliamos parâmetros parasitológicos, imunológicos e histopatológicos.

Iniciando com avaliação dos parâmetros parasitológicos, que são essenciais para a triagem de compostos anti-esquistossomóticos e/ou drogas eficazes no combate a helmintos *in vivo*, temos: avaliação da carga parasitária dos animais tratados, avaliação quantitativa dos ovos distribuídos no tecido hepático, quantificação dos ovos eliminados pelas fezes e contagem dos granulomas no fígado (PELLEGRINO; KATZ, 1968; HOLLAND et al., 1974). Por sua vez, o tratamento com EDA em animais infectados, reduziu a quantidade de ovos de *S. mansoni* eliminado nas fezes e retidos no tecido hepático, em comparação aos animais infectados (controle negativo).

A avaliação da carga parasitária em relação a eliminação de ovos nas fezes, de acordo com a Organização Mundial de Saúde (WHO, 2014), é feita com base na quantidade de ovos eliminados nas fezes, sendo considerada baixa com até 99 opg (ovos por gramas), moderada quando estiver entre 100 a 399, e alta quando estiver acima de 399 opg. Os grupos tratados com EDA apresentaram carga parasitaria baixa e moderada com opg de fezes variando entre 53 a 203, tendo eficácia semelhante a grupo PZQ, e sendo significativamente diferente do grupo controle negativo, na qual a carga parasitária foi superior a 500 opg por fezes.

Quanto à redução no número de ovos do tecido hepático dos camundongos infectados tratados com EDA, nós acreditamos ter ocorrido, principalmente, pela redução dos vermes no hospedeiro, tendo em vista a eficácia esquistossomicida *in vitro* do extrato. Dessa maneira, havendo redução dos vermes, consequentemente ocorrerá redução da carga parasitária, resultando numa diminuição correspondente do número de ovos depositados sobre os tecidos (SECOR, 1996; KAMEL et al., 2006). Além do mais, esses achados nos grupos tratados com EDA foram semelhantes aos do grupo tratado com PZQ, que também apresentou uma redução acentuada do número de ovos de *S. mansoni* no tecido.

Em outros trabalhos, a espécie vegetal *D. ambrosioides* apresentou ação anti-helmíntica, comprovada por Sousa et al (1991), Pessoa et al (2001), e mais recentemente por Zamilpa et al (2018), bem como uma ação promissora anti-*Schistosoma*, relatada por Kamel et al (2011) com extrato metanólico, por Silva (2012) e por Soares (2017), com óleo essencial.

Na esquistossomose, em torno de 40 a 50% dos ovos produzidos pelos vermes, ficam retidos nos tecidos do hospedeiro, principalmente no fígado, provocando uma reação inflamatória imunogênica, granulomatosa e fibrótica, que causam doença

intestinal ou hepatoesplênica (PEARCE; MACDONALD, 2002; WYNN et al., 2004; GRYSEELS et al., 2006; SOUZA et al., 2011). Como o EDA apresentou potencial na redução da carga parasitária, avaliamos parâmetros histopatológicos no tecido hepático dos animais infectados e tratados com esse extrato.

A resposta imunológica sobre a infecção por *S. mansoni* apresenta um predomínio de resposta do tipo 1 na fase aguda pré-postural, e predomínio de uma resposta do tipo 2 após a ovoposição (fase aguda pós-postural). O predomínio Th2 é importante na defesa do hospedeiro através da formação do granuloma, que limita os antígenos liberados pelos ovos e reduz o dano tecidual (ANDRADE, 2009; CHUAH et al., 2014). O granuloma é formado pela interação dinâmica e intrincada entre célula-célula, e célula-matriz do tecido afetado, e aquelas recrutadas da circulação. Os linfócitos T CD4+ e B, macrófagos e eosinófilos, em consequência de um estímulo frente à antígenos solúveis dos ovos, modificam a produção e deposição da matriz extracelular heterogênea, que resulta na formação de uma estrutura esférica e compacta, que se organiza ao redor do ovo do parasito (LENZI et al., 1991; PESCE et al., 2006; LENZI et al., 2008).

O tratamento com PZQ em animais infectados apresentou reduções na deposição de ovos, na formação, na área e no número dos granulomas sobre o tecido hepático, corroborando com a literatura (ZAIA, 2015).

Estudos tem evidenciado o potencial anti-inflamatório do EDA na redução da formação do granuloma (IBIRONKE et al., 2007; PERREIRA et al., 2009; TRIVELLATO-GRASSI et al., 2013). Por sua vez, o composto majoritário deste extrato, a Quercetina, é um flavonoide que também apresenta efeito hepatoprotetor e antifibrótico (HERNÁNDEZ-ORTEGA et al., 2012). O tratamento com o EDA em animais infectados, evidenciou redução de todos os parâmetros patológicos avaliados, tais como, infiltrado inflamatório, lesão tecidual, necrose, presença de granulomas e congestão vascular, quando comparados aos animais infectados tratados ou não com PZQ. Dessa forma, sugere-se que o tratamento com EDA apresenta efeito hepatoprotetor, reduzindo a atividade granulomatosa sobre o tecido hepático.

Além do mais, os animais infectados e tratados com EDA apresentaram redução da área do granuloma e em sua quantidade sobre o tecido hepático. Guimarães et al (2015) demonstraram melhora da doença hepática, a partir do tratamento com alcaloide Epiisopiloturina, havendo a redução do diâmetro dos granulomas, e sugerindo em seu estudo, que isso ocorreu devido a intervenções

imunológicas e ações imunomoduladoras do alcaloide. Já Aires et al (2014) associaram a redução no tamanho do granuloma à atividade anti-inflamatória da Beta-lapachona. Deste modo, sabendo que o EDA possui efeito anti-inflamatório, além de compostos com potencial efeito hepatoprotetor e antifibrótico, é provável que o EDA tenha modulado favoravelmente a resposta imune granulomatosa, não causando danos exacerbados no tecido hepático dos animais.

Em continuidade, avaliamos fatores que estão diretamente associados à morbidade da doença, como leucometria global e diferencial (PELLEGRINO; KATZ, 1968). A contagem leucométrica no sangue dos animais infectados sem tratamento, apresentou aumento de leucócitos totais, monócitos, eosinófilos e neutrófilos (percentual), e redução de linfócitos. Em animais imunocompetentes, oscilações na mobilização de células para o sangue periférico são esperadas à medida que o sistema imune combate infecções causadas por diversos agentes etiológicos (DESCAT, 2002). Por sua vez, sempre ocorre aumento progressivo do número de leucócitos entre a 8ª até a 10ª semana de infecção por *S. mansoni* (FERNANDES, 2016), bem como o aumento de monócitos (LAROCCA et al., 2004; ZAIA, 2015) eosinófilos (SOUZA et al., 2011), e neutrófilos (SHAMRI et al., 2011).

Quanto ao perfil leucométrico no sangue dos animais infectados e tratados com EDA, em relação aos animais infectados sem tratamento (controle negativo), percebeu-se, dependendo do intervalo de tratamento, o aumento leucócitos totais, e dentre os diferenciais, apenas os linfócitos obtiveram aumento significativo. Essa leucocitose nos grupos tratados com EDA ocorreu devido a uma provável linfoproliferação induzida pelo extrato (PEREIRA et al., 2010; SILVA et al., 2015).

Além disso, ressalta-se que os eosinófilos exibem um grande papel na modulação da resposta imunológica frente às infecções helmínticas (CARA et al., 2000; GENTIL et al., 2013), principalmente como protetor na resposta imune frente a infecção por *S. mansoni*, apresentando um aumento em quantidade e maior atividade dessas células (SILVEIRA-LEMOS, 2008). Neste estudo, os animais infectados e tratados com EDA apresentaram redução de eosinófilos, quando comparados aos animais infectados sem tratamento. Assim, sugerimos que o tratamento com o extrato apresentou potencial em regular a resposta inflamatória da infecção por *S. mansoni*, que é responsável pela indução do aumento de eosinófilos.

A redução de eosinófilos no sangue também ocorreu no grupo infectado e tratado com PZQ. Segundo Souza et al (2007), após a quimioterapia específica com

PZQ, os indivíduos infectados apresentam valores normais de leucócitos, principalmente de eosinófilos, que são o tipo celular predominante em hospedeiros infectados (OVINGTON; BEHM, 1997).

Como o tratamento com EDA evidenciou redução da carga parasitária, o próximo passo do presente estudo foi avaliar os parâmetros imunológicos, que segundo Chaiworaporn et al (2005), na infecção por *S. mansoni*, a redução da carga parasitária, realizada com composto anti-esquistossomótico, está diretamente relacionada a ação sinérgica do sistema imune do hospedeiro. Dessa maneira, com alterações do perfil leucométrico no sangue dos animais infectados e tratados com EDA, avaliamos o órgão responsável pela produção de células, a medula óssea, além da dosagem do anticorpo IgE.

O EDA é considerado um extrato seguro, pois segundo Pereira et al. (2010), apesar do EDA induzir a alterações renais pontuais em doses altas, não apresenta toxicidade subcrônica na dose terapêutica (5mg/kg) e não causou morte dos animais mesmo em dose 100 vezes maior. A dose utilizada neste estudo, já padronizada no estudo de Silva (2012), foi de 50mg/kg, não apresentando toxicidade, uma vez que os grupos infectados e tratados nessa dose, apresentaram aumento no número células da medula, em relação ao grupo infectado, possivelmente, porque o EDA apresenta potencial imunoestimulador, e pode ter aumentado o recrutamento de células para esse órgão linfoide (CRUZ et al., 2007).

O grupo infectado e tratado com PZQ, não apresentou diferenças em relação ao grupo infectado, ou infectado e tratado com EDA, denotando provavelmente ausência de toxicidade relacionada à droga neste compartimento, e corroborando com alguns trabalhos, que evidenciam, uma droga segura e com baixa toxicidade e ausência de potencial mutagênico, carcinogênico e teratogênico (FROHBURG, 1989; VALE et al., 2017).

Além de células da imunidade inata, anticorpos como a imunoglobulina E (IgE), produzidas por linfócitos B, estão diretamente envolvidos na imobilização ou destruição do parasito *S. mansoni* em associação com populações de células efectoras, tais como eosinófilos (CAPRON; CAPRON, 1992; ZHANG; MUTAPI, 2006). A IgE age como anticorpo opsonizante para fixar os eosinófilos fagocitários aos helmintos, e permitir que as principais proteínas básicas e catiônicas dos eosinófilos sejam liberadas para se centrarem sob os alvos de morte extracelular do parasito (ZHANG; MUTAPI, 2006), proporcionando, redução da carga parasitária, do número

de eosinófilos e dos níveis plasmáticos de IgE (GAMA, 2010). Os animais infectados e tratados com EDA apresentaram redução dos níveis de IgE total, em relação ao grupo infectado sem tratamento. Logo, sugere-se que o tratamento com EDA ao diminuir a carga parasitária, modula a resposta imune a favor do hospedeiro, diminuindo a resposta inflamatória ocasionada pela infecção, responsável pela indução de eosinófilos e altos níveis de IgE.

Em relação ao baço, realizamos avaliação da celularidade total, tendo em vista que, este é o maior órgão linfoide interposto entre a circulação sistêmica e a portal (TISCHENDORF, 1985), onde juntamente com o fígado, é um dos órgãos diretamente afetados pelo parasito da espécie *S. mansoni*, ocasionando o aumento de celularidade e hiperplasia desse órgão, com desenvolvimento de esplenomegalia relacionada à fibrose (ANDRADE, 1991; PEREIRA et al., 1999). O aumento da celularidade dos animais infectados sem tratamento é explicado por esses eventos.

Os animais infectados e tratados com EDA apresentaram aumento no número de células em relação aos animais infectados ou infectados e tratado com PZQ. Como exposto anteriormente, esse aumento ocorreu, provavelmente, porque o EDA apresenta potencial imunestimulador, e pode ter aumentado o recrutamento e/ou proliferação de células para o baço (CRUZ et al., 2007).

Tendo em vista o aumento da celularidade do baço, realizamos à caracterização dos esplenócitos. Assim, evidenciamos nos animais infectados, aumento de linfócitos T, B e macrófagos. Durante a infecção por *S. mansoni*, supõe-se que as células T normalmente mediem os mecanismos reconhecimento, que permitem aos hospedeiros sobreviverem, incluindo formação de granuloma, o desenvolvimento de anticorpos específicos aos antígenos dos ovos e a regulação de processos inflamatórios (PEARCE; MACDONALD, 2002; HOFFMANN et al., 2002). As células B apresentam a função de proteger o hospedeiro em estágios posteriores durante a infecção, impedindo o avanço crônico e excessivamente grave da doença, por regularem a inflamação hepática e desenvolvimento de hipertensão portal mais grave (HERNANDEZ et al., 1997; JANKOVIC et al., 1998; ZARETSKY et al., 2009). Além dos linfócitos, os macrófagos apresentam-se essenciais para a sobrevivência do hospedeiro durante a fase crônica da infecção, prevenindo a hiperresponsividade dentro do compartimento Th2 (HERBERT et al., 2004).

O EDA apresenta grande potencial em atuar no sistema imune, apresentando atividade imunostimuladora, aumentando a proliferação de linfócitos murinos e

induzindo o recrutamento de macrófagos (ROSSI-BERGAMANN et al., 1997; CRUZ et al., 2007; PATRICIO et al., 2008). Os animais infectados e tratados com EDA apresentaram tal efeito, aumentando o número de linfócitos T, linfócitos B e macrófagos no baço. Por outro lado, diversos estudos evidenciaram que atividade biológica do EDA pode estar associada a outros componentes presente no extrato. Macdonald et al (2004) trabalharam com fração hexânica de *D. ambrosioides* que continha ascaridol, e obtiveram 10% da atividade contra o verme *Caenorhabditis elegans*, enquanto que extrato aquoso livre de ascaridol apresentou 90% da atividade vermífuga. Bernardes (2006) demonstrou que o extrato bruto de *D. ambrosioides*, com predominância de fitol e ausência de ascaridol, mostrou atividade profilática em camundongos infectados com *Strongyloides venezuelensis*. Um dos compostos majoritários do EDA, utilizado neste estudo, é o flavonoide Quercetina, relatado em literatura com inúmeras atividades, como, anti-inflamatória, antioxidante, anticarcinogênica, antiviral, antiulcerogênica, antitrombótica, anti-isquêmica, antialérgica e hepatoprotetora (BEHLING et al., 2004; FORMICA et al, 1995). Logo, sugere-se para estudos futuros, a investigação do efeito desse composto sobre o sistema imune e sua ação imunomoduladora.

Quanto a análise de duas subpopulações celulares de linfócitos T, os animais infectados apresentaram aumento do número de células TCD4⁺ e TCD8⁺. Garcia et al. (1986) demonstraram que indivíduos infectados com *S. mansoni*, as células T aumentavam em número e totalizavam em média 55% dos esplenócitos totais, com subpopulações linfocitárias CD4⁺ e CD8⁺ equivalentes. Isso ocorre porque a resposta granulomatosa é dependente de linfócitos T CD4⁺ específicos contra antígenos parasitários, linfócitos T CD8⁺ e linfócitos B, que atuam produzindo citocinas e modulando tal resposta (MUTAPI et al., 2017).

Os animais infectados e tratados com EDA, apresentaram aumento do número de células TCD4⁺ e TCD8⁺, e das células que expressam CD28, em relação aos animais infectados ou infectados e tratados com PZQ. Em modelo experimental para esquistossomose, CD28 apresenta papel crucial no desenvolvimento da resposta do tipo 2, com aumento da produção de IL-4 e IL-5 na presença de antígenos de ovos de *S. mansoni* (KING et al., 1996). Diante do exposto, é possível que o tratamento com EDA, além do efeito de induzir linfoproliferação, apresenta potencial em induzir, primariamente, a resposta do tipo 2.

A infecção por *S. mansoni* provoca intensa resposta granulomatosa inflamatória sobre os órgãos do sistema porta-hepático dos hospedeiros, principalmente fígado, baço e intestino, chegando a atingir graus extremos de severidade (SILVA-SOUZA; VASCONCELOS, 2005). Em virtude disso, realizamos avaliação da celularidade total e diferencial da cavidade peritoneal, verificando que os animais infectados apresentaram aumento número de células peritoneais totais, de macrófagos, linfócitos e eosinófilos. Possivelmente isso ocorreu, porque durante a infecção portal sistêmica da esquistossomose, há o recrutamento de eosinófilos, células mononucleadas, mastócitos e macrófagos, em defesa a ação de antígenos secretados pelos ovos e pelos vermes adultos (LAROCCA et al., 2004; ZAIA, 2015).

O tratamento com EDA em animais infectados, aumentou o número de neutrófilos, em relação aos animais infectados sem tratamento. Sousa et al. (2012), mostraram que o tratamento com EDA, induziu aumento do número de neutrófilos na cavidade peritoneal, corroborando com nossos achados. Gomes (2018) constataram que o EDA tem potencial para regular as funções dos neutrófilos, em contextos de ativação demasiada. Então, propõe-se que além da indução do aumento de neutrófilos, o EDA apresenta potencial em regular as atividades efectoras dessas células, uma vez que, a sua ativação desregulada ou sua manutenção durante processos inflamatórios, associa-se ao desenvolvimento ou piora de doenças inflamatórias (PINEGIN et al., 2015).

Larocca et al (2004) verificaram a migração crescente de mastócitos na cavidade peritoneal dos camundongos infectados por *S. mansoni*, sugerindo a participação destes granulócitos na resposta inflamatória crônica experimental. Os animais infectados que receberam tratamento com EDA, apresentaram redução do número de mastócitos. Os efeitos anti-inflamatórios do EDA têm sido demonstrados em diferentes modelos experimentais, onde Calado et al (2015) evidenciaram que o tratamento com EDA reduziu inflamação sinovial e as alterações comportamentais causadas pela dor; Silva et al (2015) demonstraram efeito anti-inflamatório do EDA sobre a cistite hemorrágica, com diminuição o peso e a hemorragia da bexiga; Rios et al (2017) mostraram que o EDA diminuiu o crescimento bacteriano e, concomitantemente, evitou a resposta inflamatória exacerbada sistêmica observada na sepse; E Pereira et al (2018) observaram que o tratamento com EDA reduziu citocinas inflamatórias (IL-6 e TNF- α) que participam diretamente do desenvolvimento e manutenção do processo inflamatório na artrite reumatoide. Assim, sugere-se que o

tratamento apresentou eficácia em regular a resposta inflamatória da infecção por *S. mansoni*, responsável pela indução do recrutamento de mastócitos.

Apesar dos animais infectados e tratados com EDA não apresentarem diferenças no número de macrófagos da cavidade peritoneal em relação aos outros grupos, essas células totalizaram em média, mais de 50% das células peritoneais. Deste modo, avaliamos a caracterização fenotípica dos macrófagos e sua ativação pela expressão da enzima iNOS e produção de peróxido de hidrogênio (H_2O_2).

Os macrófagos são células hematopoiéticas especializadas que desenvolvem um papel importante na homeostase, remodelação de tecido e na defesa contra patógenos (KUROWSKA-STOLARSKA et al., 2009). Dependendo do tipo de citocinas no microambiente em que os macrófagos se encontram, podem ser diferencialmente ativados em M1 (ou classicamente ativado) ou M2 (alternativamente ativados) (STRAUSS-AYALI et al., 2007). Os macrófagos M1 possuem alta capacidade anti-inflamatória por meio da produção de espécies reativas de nitrogênio, como óxido nítrico (NO), através da enzima iNOS, e espécies reativas de oxigênio, como peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (PAIXÃO E SILVA et al., 2011). Os macrófagos M2 modulam a resposta inflamatória do tipo 1, e promovem e regulam a resposta imune do tipo 2, além de promoverem uma reparação tecidual (GORDON, 2003). Os animais infectados e tratados com EDA, não apresentaram diferença quanto aos percentuais de macrófagos e sua ativação, assim, não foi possível inferir qual dos subtipos de macrófagos estava ativado.

Na avaliação da produção de H_2O_2 nas células da cavidade peritoneal, os animais infectados apresentaram aumento espontâneo e estimulado (PMA) de H_2O_2 . A elevada produção de H_2O_2 em infecções por *S. mansoni* tem sido associada a um sistema constituído por células monocíticas/macrofágicas, que tem o importante papel de realizar a fagocitose de partículas, antígenos e patógenos (SHOKOUH-AMIRI et al., 1990; BRANDT et al., 2005). Quando ativadas, estas células produzem grandes quantidades de agentes microbicidas altamente reativos derivados do oxigênio, tais como o ânion superóxido (O_2^-), que, por ação da enzima superóxido dismutase (SOD), se convertem em um produto com alto potencial microbicida, o H_2O_2 (FRIDOVICH, 1989).

Por sua vez, os animais infectados e tratados com EDA, quando comparados aos animais infectados sem tratamento, apresentaram redução da produção espontânea de H_2O_2 nas células peritoneais. De acordo com Brunk e Cadenas (1988),

a produção de H_2O_2 além de outros componentes tóxicos para os lisossomos, são fabricados em grandes quantidades durante a fagocitose, sendo considerados de grande importância para os mecanismos de defesa do hospedeiro durante o processo inflamatório por *S. mansoni*. Em contrapartida, estudos realizados por Shaheen et al. (1994) evidenciaram que o tratamento com Praziquantel reduz ou estabiliza o processo inflamatório, ocasionando a possível redução da produção de H_2O_2 . De maneira semelhante, em nosso estudo, os animais infectados e tratados com PZQ tiveram redução da produção espontânea de H_2O_2 nas células peritoneais. Nesse contexto, o EDA apresentou desempenho similar ao PZQ.

Além disso, a redução espontânea de H_2O_2 dos animais tratados com o EDA pode ter ocorrido porque o extrato apresenta efeito antioxidante, devido a presença de compostos fitoquímicos antioxidantes, tais como flavonóides, terpenos e esteroides (DE FEUDIS et al., 2003; TAKEOKA; DAO, 2003), onde, possivelmente, inibiu ou regulou a produção espontânea de H_2O_2 . Todavia, apesar do EDA apresentar atividade antioxidante, tal efeito não é irreversível, uma vez que, a adição do estímulo com PMA sobre as células peritoneais dos animais tratados, induziu aumento de H_2O_2 em todos os grupos.

Dessa maneira, nossos resultados apoiam a ideia preliminar de que o EDA apresenta atividade anti-esquistossomótica, e é capaz modular a resposta imune a favor do hospedeiro vertebrado, regulando o processo inflamatório granulomatoso ocasionado pela esquistossomose. Além disso, nos fornece a perspectiva em avançar nas investigações dos compostos isolados presentes no EDA, na avaliação dos possíveis efeitos antiparasitários e imunomoduladores sobre as diferentes fases de *S. mansoni*.

7 CONCLUSÕES

Diante dos resultados expostos podemos concluir que o tratamento com extrato hidroalcoólico das folhas de *D. ambrosioides* na infecção por *S. mansoni*:

- Apresenta da atividade cercaricida e esquistossomicida *in vitro*;
- Reduz ovos de *S. mansoni* no tecido hepático e nas fezes;
- Aumenta número de linfócitos e induz redução do número de eosinófilos no sangue;
- Aumenta celularidade da medula óssea;
- Aumenta celularidade da do baço, com significativo aumento de linfócitos T auxiliares, T citotóxicos, linfócitos B;
- Aumenta número de neutrófilos e reduz número de mastócitos na cavidade peritoneal;
- Reduz a produção de peróxido de hidrogênio pelas células peritoneais;
- Reduz área e a quantidade de granulomas sobre o tecido hepático.

REFERÊNCIAS

- ABATH FGC, MORAIS CN, MONTENEGRO CE, WYNN TA, MONTENEGRO SM. Immunopathogenic mechanisms in schistosomiasis: what can be learnt from human studies? *Trends in Parasitology*, 22 (2): 85-91; 2006.
- ADRIKO M, STANDLEY CJ, TINKITINA B, TUKAHEBWA EM, FENWICK A, FLEMING FM, SOUSA-FIGUEIREDO JC, STOTHARD JR, KABATEREINE N. B. Evaluation of circulating cathodic antigen (CCA) urine-cassette assay as a survey tool for *Schistosoma mansoni* in different transmission settings within Bugiri District, Uganda. *Acta Tropica*, 136: 50-57; 2014.
- AIRES AL, XIMENES ECPAZ, BARBOS VX, GÓES AJS, SOUZA VNO, ALBUQUERQUE MCPA. β -Lapachone: A naphthoquinone with promising antischistosomal properties in mice. *Phytomedicine*, 21: 261–267; 2014.
- AKKARI H, RTIBI K, B'CHIR F, REKIK M, DARGHOUTH MA, GHARBI M. *In vitro* evidence that the pastoral *Artemisia campestris* species exerts an anthelmintic effect on *Haemonchus contortus* from sheep. *Veterinary Research Communications*, 38: 249-255; 2014.
- ALARCÓN DE NOYA B, POINTIER JP, COLMENARES C. THÉRON A, BALZAN C, CESARI IM, GONZALES S, NOYA O. Natural *Schistosoma mansoni* infection in wild rats from Guadeloupe: parasitological and immunological aspects. *ActaTropica*, 68(1):11-21; 1997.
- ALMEIDA LMS, FARANI PG, TOSTA LA, SILVÉRIO MS, SOUSA OV, MATTOS AC, COELHO PM, VASCONCELOS EG, FARIA-PINTO P. *In vitro* evaluation of the schistosomicidal potential of *Eremanthus erythropappus* (DC) McLeisch (Asteraceae) extracts. *Natural Product Research*, 26 (22): 2137-2143; 2011.
- ALVAREZ C, RODRIGUES P, CARVAJAL E. Efecto del extracto de paico (*Chenopodium ambrosioides*), en parasitos gastrointestinales de galos de pelea (*Gallus domesticus*). *Revista Cultura Científica JDC*, 9: 77-80; 2011.
- ALVIM MC. A esquistossomose no Maranhão. Belém: Hiléia méd., 1980.
- ANDRADE ZA, WARREN KS. Mild prolonged schistosomiasis in mice. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 58, 53-57; 1964.
- ANDRADE ZA. Schistosomiasis and liver fibrosis. *Parasite Immunology*, 31 (11): 656-663; 2009.
- ANDRADE ZA. Extracellular matrix and schistosomiasis. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 86 (Supl 3): 61-73; 1991.
- ANDRADE ZDA. Schistosomiasis and liver fibrosis. *Parasite Immunology*, 31: 656-663; 2009.

ARAÚJO MI, DE JESUS AR, BACELLAR O. Evidence of a T helper type 2 activation in human schistosomiasis. *European Journal of Immunology*, 26: 1399-1403; 1996.

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

BARBOSA FA, BARBOSA I, ARRUDA F. *Schistosoma mansoni*: natural infection of cattle in Brazil. *Science*, 138 (3542): 831; 1962.

BARTLEY PB, RAMM GA, JONES MK, RUDDLE RG, LI Y, MCMANUS DPA. Contributory role for activated hepatic stellate cells in the dynamics of *Schistosoma japonicum* egg-induced fibrosis. *International Journal for Parasitology*, 36 (9): 993-1001; 2006.

BEHLING BE, SENDÃO MC, FRANCESCATO HDC, ANTUNES LMG, BIANCHI MLP. Flavonóide Quercetina: Aspectos gerais e ações biológicas. *Alimentos e Nutrição*, 15 (3): 285-292; 2004.

BERGQUIST NR. Schistosomiasis: from risk assessment to control. *Trends in Parasitology*, 18: 309-314; 2002.

BERNARDES HMS. Estudo do efeito anti-helmíntico do extrato hidroalcoólico e frações de *Chenopodium ambrosioides* L. sobre *Strongyloides venezuelensis* (BRUMPT, 1934). Tese doutorado (Parasitologia) UNICAMP, Campinas. 2006.

BEZERRA JL, COSTA GC, LOPES TC, CARVALHO ICDS, PATRICIO FJ, SOUSA SM, AMARAL FMM, REBELO JMM, GUERRA RNM, RIBEIRO MNS, NASCIMENTO FRF. Avaliação da atividade leishmanicida in vitro de plantas medicinais. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 16: 631-637; 2006.

BLAGG W, SCHOEGEL EL, MANSOUR NS, KHALAT GI. A new concentration technic for the demonstration of protozoa and helminth eggs in feces. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 4: 23-28; 1955.

BLOCH, E. H. *In vivo* microscopy of schistosomiasis. II. Migration of *Schistosoma mansoni* in the lungs, liver, and intestine. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 29 (1): 62-70; 1980.

BOGEA T, FAVRE TC, ROTENBERG L, SILVA HS, PIERI OS. Circadian pattern of cercarial emergence in *Schistosoma mansoni* (Plathelmyntes: Digenea) from isolated *Biomphalaria glabrata*. *Chronobiology International*, 13 (2): 93-101; 1996.

BOROS DL, WARREN KS. Delayed hypersensitivity-type granuloma formation and dermal reaction induced and elicited by a soluble factor isolated from *Schistosoma mansoni* eggs. *Journal of Experimental Medicine*, 132 (3): 488-507; 1970.

BRANDT CT, LEITE CRC, CASTRO RM, BRANDT- FILHO C, CASTRO FMM, CASTRO CMMB. Avaliação do efeito da esplenectomia e auto-implante esplênico sobre algumas funções de monócitos em crianças com esquistossomose

mansônica. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 38 (1): 38-42; 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. RENISUS- Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS. 2009.

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 das Doenças Transmissíveis. Vigilância da esquistossomose mansoní: diretrizes técnicas. 4. Ed. Brasília: Ministério da saúde, 2014. 144p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Sistema nacional de vigilância em saúde – Relatório de situação – Maranhão/ Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. – 5. ed. – Brasília: Ministério da Saúde, 2011. 35p.

BROOKER S, CLEMENTS AC, BUNDY DA. Global epidemiology and control of soil-transmitted helminth infections. Advances in Parasitology, 62: 103-105; 2009.

BRUNK U, CADENAS E. The potential intermediate role of lysosomes in oxygen free radical pathology. Acta Pathologica Microbiologica et Immunologica Scandinavica, 96: 3-13; 1988.

BURKE ML, JONES MK, GOBERT GN, LI YS, ELLIS MK, MCMANUS DP. Immunopathogenesis of human schistosomiasis. Parasite Immunology, 31 (4): 163-176; 2009.

CAFFREY CR. Chemotherapy of schistosomiasis: present and future. Current Opinion in Chemical Biology, 11: 433–439; 2007.

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, 10 (11): 10-18; 2015.

CANTANHEDE SPD, FERNANDEZ MA, MATTOS AC, MONTRESOR LG, SILVA-SOUZA N, THIENGO SC. Freshwater gastropods of the Baixada Maranhense Microregion, na endemic área for schistosomiasis in the State of Maranhão, Brazil: I – qualitative study. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 447 (1): 79-85; 2014.

CAPRON M, CAPRON A. Effector functions of eosinophils in schistosomiasis. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 87 (4): 167-70; 1992.

CARA DC, NEGRÃO-CORRÊA D, TEIXEIRA MM. Mechanisms underlying eosinophil trafficking and their relevance in vivo. Histology and histopathology, 15: 899-920; 2000.

CARDIM LL, FERRAUDO AS, PACHECO STA, REIS RB, SILVA MMN, CARNEIRO DDMT, BAVIA ME. Análises espaciais da identificação das áreas de risco para a esquistossomose mansônica no município de Lauro de Freitas, Bahia, Brasil. *Cadernos de Saúde Pública*, 27 (5): 899- 908; 2011.

CARVALHO OS, COELHO PMZ, LENZI HL. *Schistosoma mansoni* e esquistossomose: uma visão interdisciplinar. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 2008. p. 459- 484.

CHAIWORAPORN, R. MANEERAT Y, ROJEKITTIKHUN W, RAMASOOTTA P, JANECHARUT T, MATSUDA H, KITIKOON V. Therapeutic effect of subcurative dose praziquantel on *Schistosoma mansoni* infected mice and resistance to challenge infection after treatment. *The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, 36 (4): 846-852, 2005.

CHEEVER AW, DUVALL RH, HALLACK TAJR, MINKER RG, MALLEY JD, MALLEY KG. Variation of hepatic fibrosis and granuloma size among mouse strains infected with *Schistosoma mansoni*. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 37 (1): 97; 1987.

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

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

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

CHOI M, YU J. Who Neglects Neglected Tropical Diseases? – Korean Perspective. *Journal of Korean Medical Science*, 30 (2): 122–130; 2015.

CHU SS, HU JF, LIU ZL. Composition of essential oil of Chinese *Chenopodium ambrosioides* and insecticidal activity against maize weevil, *Sitophilus zeamais*. *Pest Managemet Science*, 67: 714–718; 2011.

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. Human schistosomiasis. *The Lancet*, 383 (9936): 2253–2264; 2014.

CORLISS BA, AZIMI MS, MUNSON J, PEIRCE SM, MURFEE WL. Macrophages: an inflammatory link between angiogenesis and lymphangiogenesis. *Microcirculation*, 23: 95–121; 2016.

COSTA AF. Farmacognosia. 2. ed. Lisboa: Calouste Gulbenkian, 1987.

COSTA MVL, TAVARES ES. Anatomia foliar de *Chenopodium ambrosioides* L. (Chenopodiaceae) – erva-de-Santa-Maria. Revista Brasileira de Plantas Mediciniais, 8 (3): 63-71; 2006.

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

COURA JR; CAMILLO-COURA L, KALACHE A, ARGENDO CA. Esquistossomose aguda autóctone de foco na cidade do Rio de Janeiro. Estudo de 22 casos. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 4 (6): 387-397; 1970.

CRUZ GVB, PEREIRA PVS, PATRICIO 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, 111: 148–154, 2007

CURWEN RS, WILSON RA. Invasion of skin by schistosome cercariae: some neglected facts. Trends Parasitology, 19 (2): 63-66; 2003.

CUTRIM RMN. Aspectos clínicos e epidemiológicos da esquistossomose mansoni em três localidades da Baixada Ocidental Maranhense (1981-1993). Tese (Doutorado em medicina Tropical). Instituto Oswaldo Cruz; 1995.

D'ANDREA G. Quercetin: a flavonol with multifaceted therapeutic applications? Fitoterapia, 106: 256-271; 2015.

DE JESUS AR, SILVA A, SANTANA LB, MAGALHÃES A, DE JESUS AA, DE ALMEIDA RP, RÊGO MA, BURATTINI MN, PEARCE EJ, CARVALHO EM. Clinical and immunologic evaluation of 31 patients with acute schistosomiasis mansoni. The Journal of Infectious Disease, 185: 98–105; 2002.

DE MELO NL, MAGALHAES LG, CARVALHO CE, WAKABAYASHI KA, AGUIAR GP, RAMOS RC, MANTOVANI AL, TURATTI IC, RODRIGUES V, GROppo M, CUNHA WR, VENEZIANI RC, CROTTI AE. Schistosomicidal activity of the essential oil of *Ageratum conyzoides* L. (Asteraceae) against adult *Schistosoma mansoni* worms. Molecules, 16 (1): 762-773; 2011.

DEFEUDIS FV, PAPADOPOULOS V, DRIEU K. Ginkgo biloba extracts and cancer: a research area in its infancy. Fundamental Clinical Pharmacology, 17: 405–407; 2003.

DELESPAUL Q, BILLERBECK VG, ROQUES CG, MICHEL G. The antifungal activity of oils as determined by different screening methods. Journal of Essential Oil Research, 12 (2): 256-66; 2000.

DESCAT, F. Hematologie du rat: hemogramme et myelogramme. 105p. Tese (Doutorado) – Ecole Nationale Veterinaire, Toulouse, France, 2002.

DING AH, NATHAN CF, STUEHR DJ. Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. Comparison of activating cytokines and evidence for independent production. *Journal of Immunology*, 141: 2407-2412; 1988.

DOENHOFF MJ, CHIODINI PL, HAMILTON JV. Specific and sensitive diagnosis of schistosome infection: can it be done with antibodies? *Trends Parasitology*, 20: 35-39; 2004.

DOENHOFF MJ, CIOLI D, UTZINGER J. Praziquantel: mechanisms of action, resistance and new derivatives of schistosomiasis. *Current Opinion in Chemical Biology*, 21: 659-667; 2008.

DUNNE DW, COOKE A. A worm's eye view of the immune system: consequences for evolution of human autoimmune disease. *Nature Reviews Immunology*, 5: 420-426, 2005.

FEIL R, FRAGA MF. Epigenetics and the environment: emerging patterns and implications. *Nature Reviews Genetics*, 13: 97-109; 2012.

FENWICH A, WEBSTER JP. Schistosomiasis: challenges for control, treatment and drug resistance. *Current Opinion in Infectious Diseases*, 19: 577-582; 2006.

FERNANDES LLM. Participação da ativação da via IL-33/ST2 na lesão intestinal em camundongos infectados com *Schistosoma mansoni*. 105f. (Mestrado em Parasitologia) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2016.

FERREIRA J, PEADEN P, KEISER J. *In vitro* trematocidal effects of crude alcoholic extracts of *Artemisia annua*, *A. absinthium*, *Asimina triloba*, and *Fumaria officinalis*. *Parasitology Research*, 109: 1585-1592; 2011.

FILIPOV A. Medicinal plants of the Pilaga of central Chaco. *Journal of Ethnopharmacology*, 44: 181-193; 1994.

FINKELMAN FD, PEARCE EJ, URBAN JF JR, SHER A. Regulation and biologic function of helminth-induced cytokine response. *Immunology Today*, 12 (3): 62-66; 1991.

FORMICA JVV, REGELSON W. Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids. *Food and Chemical Toxicology*, 33: 1061-1080; 1995.

FRIDOVICH I. Superoxide dismutase. An adaptation to a paramagnetic gas. *Journal of Biological Chemistry*. 264 (14): 7761-7764; 1989.

FROHBERG H. The toxicological profile of praziquantel in comparison to other anthelmintic drugs. *Acta Leidensia*, 57 (2): 201-215; 1989.

FUENTES-BAZAN S. et al. A novel phylogeny-based generic classification for *Chenopodium* sensu lato, and a tribal rearrangement of Chenopodioideae (Chenopodiaceae). Willdenowia, 42 (1): 5-24; 2012.

GAMA DC. Aspectos epidemiológicos e laboratoriais (eosinófilos e Ige total) em portadores de *Schistosoma mansoni* e Geohelminths. 95 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade Federal de Alagoas, Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, 2010.

GBD (Global Burden of Disease). Mortality and Causes of Death Collaborators. Global, regional, and national life expectancy, all-cause and cause-specific mortality for 249 causes of death, 1980-2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. Lancet, 388: 1459-1544; 2016.

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.

GENTIL K, HOERAUF A, LAYLAND L. Eosinophil-mediated responses toward helminths. Eosinophils in health and disease. Elsevier, 303-312; 2013.

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

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

GODINHO LA, CARVALHO LSA, CASTRO CCB, DIAS MM, PINTO PF, CROTTI AEM, PINTO PLS, MORAES J, FILHO AAS. Anthelmintic activity of crude extract and essential oil of *Tanacetum vulgare* (Asteraceae) against adult worms of *Schistosoma mansoni*. The Scientific World Journal, 460342: 9; 2014.

GOMES LN. Efeito do extrato de *Dysphania ambrosioides* (L) na resposta de neutrófilos humanos. 71 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade Federal do Maranhão, 2018.

GORDON S. Alternative activation of macrophages. Nature Reviews Immunology, 3: 23-35, 2003.

GRASSI LT. *Chenopodium ambrosioides* L. – Erva de Santa Maria (amaranthaceae): estudo do potencial anti-inflamatório antinociceptivo e cicatrizante. 147f. 2011. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade do Vale do Itajaí. Itajaí, 2011.

GROZEVA NH, CVETANOVA YG. Karyological and morphological variations within the genus *Dysphania* (chenopodiaceae) in Bulgaria. *Acta Botanica Croatica*, 72 (1): 49-69; 2013.

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

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

GRZYCH JM, PEARCE E, CHEEVER A, CAULADA ZA, CASPAR P, HEINY S, LEWIS F, SHER A. Egg deposition is the major stimulus for the production of Th2 cytokines in murine schistosomiasis mansoni. *The Journal of Immunology*, 146 (4): 1322-1327; 1991.

GUIMARÃES MA, DE OLIVEIRA RN, VÉRAS LM, LIMA DF, CAMPELO YD, CAMPOS SA, KUCKELHAUS SA, PINTO PL, EATON P, MAFUD AC, MASCARENHAS YP, ALLEGRETTI SM, DE MORAES J, LOLIĆ A, VERBIĆ T, LEITE JR. Anthelmintic activity *in vivo* of epiisopiloturine against juvenile and adult worms of *Schistosoma mansoni*. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 27:9(3):e0003656; 2015.

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

HELGREN TR, SCIOTTI RJ, LEE P, DUFFY S, AVERY VM, IGBINOBA O, AKOTO M, HAGEN TJ. The synthesis, antimalarial activity and CoMFA analysis of novel aminoalkylated quercetin analogs. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 25: 327-332; 2015.

HERBERT DR, HOLSCHEER C, MOHRS M. Alternative macrophage activation is essential for survival during schistosomiasis and downmodulates T helper 1 responses and immunopathology. *Immunity*, 20 :623–635; 2004.

HERNANDEZ HJ, WANG Y, STADECKER MJ. In infection with *Schistosoma mansoni*, B cells are required for T helper type 2 cell responses but not for granuloma formation. *The Journal of Immunology*, 158: 4832–4837; 1997.

HERNÁNDEZ-ORTEGA LD, ALCÁNTAR-DÍAZ BE, RUIZ-CORRO LA, SANDOVAL-RODRÍGUEZ A, BUENO-TOPETE M, J ARMENDARIZ-BORUNDA, SALAZAR-MONTES AM. Quercetin improves hepatic fibrosis reducing hepatic stellate cells and regulating pro-fibrogenic/anti-fibrogenic molecules balance. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 27: 1865–1872; 2012.

HMAMOUCI M, LAHLOUM, AGOUMI A. Molluscicidal activity of some Moroccan medicinal plants. *Fitoterapia*, 71: 308-14; 2000.

HOFFMANN KF, STRAND M. Identificação molecular de uma proteína tegumentar de *Schistosoma mansoni* com similaridade às cadeias leves de dineína citoplasmática. *Journal of Biological Chemistry*, 271: 26117-26123; 1996.

HOFFMANN KF, WYNN TA, DUNNE DW. Cytokine-mediated host responses during schistosome infections; walking the fine line between immunological control and immunopathology. *Advances in Parasitology*, 52: 265–307; 2002.

HOFFMANN WA, PONS JA, JANER JL. The sedimentation concentration method in schistosomiasis mansoni. *Journal of Public Health*, 9: 283-91; 1934.

HOLLAND JC, PELLEGRINO J, COZINELLI F. Infection of mice with cercariae, schistosomula of *S. mansoni* by intravenous and subcutaneous routes. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 16: 132–4; 1974.

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

IBIRONKE GF, AJIBOYE KI. Studies on the anti-inflammatory and analgesic properties of *Chenopodium ambrosioides* leaf extract in rats. *International Journal of Pharmacology*, 3: 111-115; 2007.

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

JANKOVIC D, CHEEVER AW, KULLBERG MC. CD4+ T cell mediated granulomatous pathology in schistosomiasis is downregulated by a B cell-dependent mechanism requiring Fc receptor signaling. *Journal of Experimental Medicine*, 187: 619–629; 1998.

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

JENKINS-HOLICK DS, KAUL TL. Schistosomiasis. *Urologic Nursing Journal*, 33 (4): 163–170; 2013.

KABATEREINE NB, VENNERVALD BJ, OUMA JH, KEMIJUMBI J, BUTTERWORTH AE, DUNNE DW, FULFORD AJ. Adult Resistance to Schistosomiasis mansoni: Age-Dependence to Reinfection Remains Constant in Communities with Diverse Exposure Patterns. *Parasitology*, 118: 101–5; 1999.

KAMEL EG, EL-EMAM MA, MAHMOUD SSM, FOU DA 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.

KAMEL EG, EL-EMAM M, MOSTAFA B, MAHMOUD S, BAYAUMY FA. Studies on combination of some environmental factors in relation to the infectivity of *S. mansoni* cercariae to albino mice. *The 4th International Conference on Biological Sciences*, 1: 207-217; 2006.

KATO T, MIURA M. On the comparison of some stool examination methods. Japanese Journal of Parasitology, 3: .35; 1954.

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

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

KATZ, N. Terapêutica experimental da esquistossomose mansoni, In: *Schistosoma mansoni* & esquistossomose: uma visão multidisciplinar, CARVALHO, O. S., COELHO, P. M. Z. & LENZI, H. L. (eds), 825-870, Fiocruz, Rio de Janeiro, Brasil, 2008.

KING CL, XIANLI J, JUNE CH, ABE R, LEE KP. CD28-deficient mice generate an impaired Th2 response to *Schistosoma mansoni* infection. European Journal of Immunology, 262: 2448-2455; 1996.

KLIKS MM. Studies on the traditional herbal anthelmintic *Chenopodium ambrosioides* L.: ethnopharmacological evaluation and clinical field trials. Social Science and Medicine, 21: 879–886; 1985

KLOOS H, CORREA-OLIVEIRA R, QUITES HF, SOUZA MC, GAZZINELLI A. Socioeconomic studies of schistosomiasis in Brazil: a review. Acta Tropica, 108 (2-3): 194-201; 2008.

KLOOS H, CORREA-OLIVEIRA R, REIS DC, RODRIGUES EW, MONTEIRO LA, GAZZINELLI A. The role of population movement in the epidemiology and control of schistosomiasis in Brazil: a preliminary typology of population movement. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 105 (4): 578-586; 2010.

LALL N, MEYER JMM. In vitro inhibition of drugresistant and drug-sensitive strains of *Mycobacterium tuberculosis* by ethnobotanically selected South African plants. Journal of Ethnopharmacology, 66: 347-54, 1999.

LAROCCA RF, SOUZA BR, MARMOL CHC, SILVA DS, BRIGOTO OM, RODRIGUES V, ANIBAL FF. Avaliação do recrutamento celular no modelo experimental da esquistossomose mansônica. Revista Uniara, 15; 2004.

LENZI H, ROMANHA WDS, MACHADO M, MOTA E, LENZI J. Patologia Experimental com enfoque no granuloma esquistosomótico. Coelho PMZ (Org), Lenzi HL (Org). *Schistosoma mansoni* & Esquistossomose: Uma visão multidisciplinar, Rio de Janeiro, Fiocruz, 561-654; 2008.

LENZI HL, JURBERG AD, COELHO PMZ, LENZI JA. Migração e Desenvolvimento de *Schistosoma mansoni* no hospedeiro definitivo. In: Carvalho OS, COELHO, P. M. Z. & LENZI HL. *Schistosoma mansoni* & Esquistossomose. Uma visão Multidisciplinar. 1a edição. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2008.

LENZI HL, KIMMEL E, SCHECHTMANH, PELAJO-MACHADO M, ROMANHA WS, PACHECO RG, RONALDO G, MARIANO M, LENZI JA. Histoarchitecture of schistosomal granuloma development and involution: morphogenetic and biomechanical approaches. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 93 (1): 141-151; 1998.

LENZI HL, LENZI JA, KERR I, ANTUNES SLG, MOTA EM, OLIVEIRA DN. Extracellular matrix in parasitic and infectious diseases. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 86: 77-90; 1991.

LIMA JUNIOR JÁ, COSTA GC, REIS AS, BEZERRA JL, PATRÍCIO FJB, SILVA LA, AMARAL FMM, NASCIMENTO FR. Inibição da infecção *in vitro* de macrófagos por *Leishmania amazonensis* por extrato e frações de *Chenopodium ambrosioides* L. *Revista Ciências da Saúde*, 16 (1): 46-53; 2014.

LIMAVERDE PW, CAMPINA FF, CUNHA FAB, CRISPIM FD, FIGUEREDO FG, 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 α -terpinene against *Staphylococcus aureus* IS-58. *Food and Chemical Toxicology*, 1: 1-5; 2017.

LORENZI H, MATOS FJA. Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 2002. 542p.
LOUREIRO S. A questão do social na epidemiologia e controle da esquistossomose mansônica. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 84 (1): 124-133; 1989.

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

LUNDY SK, LUKACS NW. Chronic schistosome infection leads to modulation of granuloma formation and systemic immune suppression. *Frontiers in Immunology*, 4: 39; 2013.

LUTZ AO. *Schistosomum mansoni* e a schistosomatose segundo observações feitas no Brasil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 11: 121-155; 1919.

MACDONALD D, VANCHEY K, HARRISON P, RANGACHARI PK, ROSENFELD J, WARREN C, SORGER G. Ascaridole-less infusions of *Chenopodium ambrosioides* contain a nematocide(s) that is(are) not toxic to mammalian smooth muscle. *Journal of Ethnopharmacology*, 92: 215-221; 2004.

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

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

MARTINS AV, MARTINS G, BRITO RS. Wild reservoirs of the *Schistosoma mansoni* in the State of Minas Gerais. *Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais*, 7: 259–265; 1955.

MATOS RB, BRAGA-DE SOUZA S, PITANGA PB, SILVA VD, JESUS EE, PINHEIRO AM, COSTA MF, EL BACHA RS, RIBEIRO CS, COSTA LS. Flavonoids modulate the proliferation of *Neospora caninum* in glial cell primary cultures. *Korean Journal of Parasitology*, 52: 613-619; 2014.

MESSIAS MCTB, MENEGATTO MF, PRADO ACC, SANTOS BR, GUIMARÃES MFM. Uso popular de plantas medicinais e perfil socioeconômico dos usuários: um estudo em área urbana em Ouro Preto, MG, Brasil. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*, 17 (1): 76-104; 2015.

MIRANDA GS, RODRIGUES JGM, LIRA MGS, NOGUEIRA RA, GOMES GCC, SILVA-SOUZA N. Monitoring positivity for *Schistosoma mansoni* in rodents *Holochilus* sp. naturally infected. *Ciência Animal Brasileira*, 16 (3): 456–463; 2015.

MODENA CM; LIMA WS; COELHO PM. Wild and domesticated animals as reservoirs of schistosomiasis mansoni in Brazil. *Acta Tropica*, 108 (2-3): 242–244; 2008.

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

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

MONZOTE L, MONTALVO AM, SCULL R, MIRANDA M, ABREU J. Activity, toxicity and analysis of resistance of essential oil from *Chenopodium ambrosioides* after intraperitoneal, oral and intralesional administration in BALB/c mice infected with *Leishmania amazonensis*: a preliminary study. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 61:14853; 2007.

MORAES EM. Perfil botânico, químico, farmacológico e toxicológico das plantas medicinais utilizadas no Maranhão. Monografia (Graduação de Farmácia) – Universidade Federal do Maranhão, 1996.

MORAES J, NASCIMENTO C, LOPES PO, NAKANO E, YAMAGUCHI LF, KATO MJ, KAWANO T. *Schistosoma mansoni*: *in vitro* schistosomicidal activity of pipartine. *Experimental Parasitology*, 127 (2): 357-364; 2011.

MORSY TOSSON AM, SHOUKRY A, MAZYAD SA, MAKLED KM. The effect of the volatile oils of *Chenopodium ambrosioides* and *Thymus vulgaris* against the larvae of *Lucilia sericata* (Meigen). *Journal of the Egyptian Societ of Pharmacology*, 28 (2): 503-10; 1998.

MUSA A, MEDO I, MARIE I, MAREIE D. Acaricidal and sublethal effects of a *Chenopodium*-based biopesticide on the two-spotted spider mite (Acari: Tetranychidae). *Experimental and Applied Acarology*, 71: 211-226; 2017.

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

NASCIMENTO FR, BARROQUEIRO ES, AZEVEDO AP, LOPES AS, FERREIRA SC, SILVA LA. Macrophage activation induced by *Orbignya phalerata* mart. *Journal of Ethnopharmacology*, 103, 53–58; 2006.

NDAMBA J, NYAZEMA N, MAKAZA N, ANDERSON C, KAONDERA KC. Traditional herbal remedies used for the treatment of urinary schistosomiasis in Zimbabwe. *Journal of Ethnopharmacology*, 42: 125-132; 1994.

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

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

NELSON GS. Schistosome infections as zoonoses in Africa. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 54: 301–324; 1960.

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

NOEL, F. Sistema neuromuscular e controle da motilidade do verme adulto. In: CARVALHO OS, COELHO PMZ, LENZI HL. *Schistosoma mansoni* & Esquistossomose: Uma visão interdisciplinar. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, pp.207-244, 2008.

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

OVINGTON KS, BEHM CA. The enigmatic eosinophil: investigation of the biological role of eosinophils in parasitic helminth infection. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 92 (Supl 2): 93-104; 1997.

PAIXÃO E SILVA O, FOCK RA, ROGERO MM, BORELLI P. Hydrogen peroxide production and activity of antioxidant enzymes of peritoneal macrophages in response to BCG (*Bacillus Calmette-guérin*) in a murine model of protein-energy

malnutrition. Journal of the Brazilian Society of Food and Nutrition, 36 (3): 1-14; 2011.

PARAENSE WL. Estado atual de sistemática do planorbídeos. Arquivo museu nacional, 55: 105-128; 1975.

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

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

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

PARDO DE SANTAYANA M, BLANCO E, MORALES R. Plants known as té in Spain: an ethno-pharmaco-botanical review. Journal of Ethnopharmacology, 98: 1-19; 2005.

PATRÍCIO F, COSTA GC, PEREIRA PVS, ARAGÃO-FILHO WC, SOUSA SM, FRAZÃO JB, PEREIRA WS, MACIEL MCG, SILVA LA, AMARAL FMM, REBELO JMM, GUERRA RNM, RIBEIRO MNS, NASCIMENTO FRF. Efficacy of the intralesional treatment with *Chenopodium ambrosioides* in the murine infection by *Leishmania amazonensis*. Journal of Ethnopharmacology, 115: 313–319; 2008.

PATRÍCIO, F.J.B. Atividade imunomodulatória e anti-leishmanial do extrato bruto hidroalcoólico de *Chenopodium ambrosioides* L. Tese (Doutorado em Biotecnologia), Universidade Federal do Maranhão, São Luís; 2011.

PEARCE EJ, CASPAR P, GRZYCH JM, LEWIS FA, SHER A. Downregulation of Th1 Cytokine production accompanies induction of Th2 responses by a parasitic helminth, *Schistosoma mansoni*. The Journal of Experimental Medicine, 173: 159-166; 1991.

PEARCE EJ, MACDONALD AS. The immunobiology of schistosomiasis. Nature Reviews Immunology, 2: 499-511; 2002.

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

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

PENHA ES, LACERDA-SANTOS, CARVALHO MGF, OLIVEIRA PT. Effect of *Chenopodium ambrosioides* on the healing process of the in vivo bone tissue. Microscopy Research and Technique, 1–7; 2017.

PEREIRA WS, DA SILVA GP, VIGLIANO MV, LEAL N.R, PINTO FA, FERNANDES, DC, SANTOS SV, MARTINO T. NASCIMENTO JR, DE AZEVEDO APS. AND FONSECA EM. Anti-arthritic properties of crude extract from *Chenopodium ambrosioides* L. leaves. Journal of Pharmacy and Pharmacology, 70 (8): 1078-1091; 2018.

PEREIRA SAL, CORRÊA BA, MINICUCCI GP, LOPES GMA, CASTRO ECC, REIS MA, TEIXEIRA VPA. O peso do baço em chagásicos crônicos. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 32: 167-170; 1999.

PEREIRA WS, RIBEIRO BP, SOUSA AI, SERRA IC, MATTAR NS, FORTES TS. Evaluation of the subchronic toxicity of oral treatment with *Chenopodium ambrosioides* in mice. Journal of Ethnopharmacology, 127: 602-5; 2010.

PEREIRA WS. *Chenopodium ambrosioides* L. Avaliação Toxicológica e Ação na Resposta Inflamatória. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Universidade Federal do Maranhão, 2009.

PEREIRA, W. S. Efeito do extrato bruto hidroalcoólico das folhas de *Chenopodium ambrosioides* sobre processos inflamatórios e o desenvolvimento da artrite experimental. 133f. 2014. Tese (Doutorado em Biociências) Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, 2014.

PESCE J, KAVIRATNE M, RAMALINGAM TR, THOMPSON RW, URBAN JF, CHEEVER AW, YOUNG DA, COLLINS M, GRUSBY MJ, WYNN TA. The IL-21 receptor augments Th2 effector function and alternative macrophage activation. The Journal of Clinical Investigation, 116: 2044-2055; 2006.

PESSOA LM. Atividade ovicida in vitro de plantas medicinais contra *Haemonchus contortus*. Dissertação (Mestrado em Ciência Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária. UECE, Fortaleza, 2001, 68 p.

PINEGIN B, NINA V, VLADIMIR P. Neutrophil extracellular traps and their role in the development of chronic inflammation and autoimmunity. Autoimmunity Reviews, 14 (7): 633-640; 2015.

PINHEIRO-NETO VF, RIBEIRO RM, MORAIS CS, CAMPOS MB, VIEIRA DA, GUERRA PC, ABREU-SILVA NL, JUNIOR JRS, NASCIMENTO FRF, BORGES MOR, BORGES ACR. *Chenopodium ambrosioides* as a bone graft substitute in rabbits radius fracture. Complementary and Alternative Medicine, 17: 350; 2017.

PINTO CE, ALMEIDA AF. Schistosomiasis mansoni no Brasil. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 5: 287; 1948.

PLANTS DATABASE. *Dysphania ambrosioides* (L.) Mosyakin & Clematis: Mexican tea, 2019. Disponível em: <https://plants.sc.egov.usda.gov/core/profile?symbol=DYAM>. Acesso em 06 jan. 2019.

RABELLO A. Diagnosing Schistosomiasis. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 92: 669-676; 1997.

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.

REY L. Non-human vertebrate hosts of *Schistosoma mansoni* and schistosomiasis transmission in Brazil. *Research and Reviews in Parasitology*, 53 (1-2): 13-25; 1993.

REY L. Parasitologia: Parasitos e Doenças Parasitárias do homem nas Américas e na África. 4. ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2008. 888 p.

RIBEIRO F, CRAIN PK, MOYLE PB. Variation in condition factor and growth in young-of-year fishes in floodplain and riverine habitats of the Cosumnes River, California. *Hydrobiologia*, 527: 77–84; 2004.

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

RIZZINI CT, MORS WB. Botânica Econômica Brasileira. São Paulo, EDUSP, 1976.

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

ROLLINSON D, SIMPSON A. The Biology of Schistosomes - From genes to Latrines. London: Academic Press, Harcourt Brace Jovanovich Publication, 1987.

ROQUIS D, LEPESANT JMJ, PICARD MAI, FREITAG M, PARRINELLO H, GROTH M, EMANS R, COSSEAU C, GRUNAU C. The epigenome of *Schistosoma mansoni* provides insight about how cercariae poise transcription until infection. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 25:9(8): e0003853; 2015.

ROSSI-BERGAMANN B, COSTA SS, MORAES VLG. Brazilian medicinal plants: a rich source of immunomodulatory substances. *Ciência e Cultura*, 49: 395-400; 1997.

SANDERSON L, BARTLETT A, WHITHIELD PJ. *In vitro* and *in vivo* studies on the bioactivity of a ginger (*Zingiber officinale*) extract towards adult schistosomes and the egg production. *Journal of Helminthology*, 76: 241-247; 2002.

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

- SCHALL V, MASSARA CL, ENK MJ, BARROS HS, MIRANDA ES. Os caminhos da esquistossomose dentro do nosso corpo. Série Esquistossomose nº 8 Parte 1. Belo Horizonte: FIOCRUZ/Instituto René Rachou, 2007.
- SCHOLTE RG, GOSONI L, MALONE JB, CHAMMARTIN F, UTZINGER J, VOUNATSOU P. Predictive risk mapping of schistosomiasis in Brazil using Bayesian geostatistical models. *Acta Tropica*, 132: 57-63; 2014.
- SCHWARTZ C, FALLON PG. *Schistosoma* "Eggs-lting" the Host: Granuloma Formation and Egg Excretion. *Frontiers in Immunology*, 29 (9): 2492; 2018.
- SECOR WE. Pattern of oogram and ovacount in infected mice with *S. mansoni*. *Journal of Infectious Diseases*, 174: 1131; 1996.
- SENNA L. *Chenopodium* in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 2010.
- SÉRVIO EML, ARAÚJO KS, NASCIMENTO LRS, COSTA CLS, MENDES LMS, FILHO ALMM, SANTOS IMSP. Cicatrização de feridas com a utilização do extrato de *Chenopodium ambrosioides* (mastruz) e cobertura secundária estéril de gaze em ratos. *ConScientiae Saúde*, 10 (3): 441-448; 2011.
- SHAHEEN AA, EL-FATTAH A, EBEID FA. Effect of praziquantel treatment on lipid peroxide levels and superoxide dismutase activity in tissue of healthy and *Schistosoma mansoni* infected mice. *Drug Research*, 44: 94-96; 1994.
- SHAMRI R, XENAKIS JJ, SPENCER LA. Eosinophils in innate immunity: an evolving story. *Cell and Tissue Research*, 343: 57-83; 2011.
- SHOKOUH-AMIRI MH, KHARAZAMI A, RAHIMI-SABER S, HANSEN CP, JENSEN SL. Phagocyte function after splenic autotransplantation. *Archives of Surgery*, 125: 595-7; 1990.
- SILVA AGS. Avaliação do efeito do extrato hidroalcoólico das folhas de *Chenopodium ambrosioides* L. sobre *Schistosoma mansoni* SAMBON, 1907. 71f. 2012. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade Estadual do Maranhão, 2012.
- SILVA DLF, BRAGA FILHO JAF, SOUSA AKS, FORTES T, AMARAL FMM, SILVA LA, GUERRA RNM, GONÇALVES FILHO A, PEREIRA WS, NASCIMENTO FRF. Potencial anti-inflamatório das folhas de *Chenopodium ambrosioides* L. No modelo de cistite hemorrágica em camundongos. *Revista Ciências da Saúde*, 17 (1): 25-32; 2015.
- SILVA-SOUZA N, VASCONCELOS SD. Histopathology of *Holochilus brasiliensis* (Rodentia: Cricetidae) infected with *Schistosoma mansoni* (Schistosomatida: Schistosomatidae). *Revista de Patologia Tropical*, 34 (2): 145-150; 2005.
- SILVEIRA-LEMOES D, TEIXEIRA-CARVALHO A, MARTINS-FILHO OA, ALVES OLIVEIRA LF, COSTA-SILVA MF, MATOSO LF, DE SOUZA LJ, GAZZINELLI A,

CORRÊA-OLIVEIRA R. Eosinophils activation status, cytokines and liver fibrosis in *Schistosoma mansoni* infected patients. *Acta Tropica*, 108: 150-159; 2008.

SIQUEIRA-BATISTA R, RAMOS JÚNIOR AN, FARINAZZO RJM. O *Schistosoma mansoni*. In: Huggins DW, Siqueira-Batista R, Medeiros LB, et al, (editores). *Esquistossomose mansoni*. São Paulo: Grupo Editorial Moreira Jr: 26-32, 1998.

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

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

SONG M, LEE S, KIM D. Antidiabetic effect of *Chenopodium ambrosioides*. *Phytopharmacology*, 1 (2): 12-15; 2011.

SOUZA LH, RIOS CE, ASSUNÇÃO AK, FIALHO EM, COSTA GC, NASCIMENTO FR. Avaliação da ação analgésica do extrato hidroalcoólico de *Chenopodium ambrosioides* L. em ensaios pré-clínicos. *Revista de Ciências da Saúde*, 14 (1): 73-82; 2012.

SOUZA MP, MATOS FJA, MATOS MEO, MACHADO MIL, CRAVEIRO AA. *Constituintes químicos de plantas medicinais brasileiras*. Fortaleza: UFC, 1991. 416p.

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

SOUZA JR, MORAIS CN, AROUCHA ML, MIRANDA PJ, BARBOSA CS, DOMINGUES AL, CARVALHO JÚNIOR LB, ABATH FG, MONTENEGRO SM. Treatment of human acute schistosomiasis with oxamniquine induces an increase in interferon-gamma response to *Schistosoma mansoni* antigens. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 102: 225-228; 2007.

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. *The Lancet Infectious Diseases*, 6 (7): 411-25; 2006.

STOLARSKA M, STOLARSKI B, KEWIN P, MURPHY G, CORRIGAN CJ, YING S, PITMAN N, MIRCHANDANI A, RANA B, VAN ROOIJEN N, SHEPHERD M, MCSHARRY C, MCINNES IB, XU D, LIEW FY. IL-33 amplifies the polarization of alternatively activated macrophages that contribute to airway inflammation. *The Journal of Immunology*, 183: 6469-6477; 2009.

STRAUSS-AYALI D, CONRAD SM, MOSSER DM. Monocyte subpopulations and their differentiation patterns during infection. *Journal of Leukocyte Biology*, 82: 244-252.

TAKEOKA GR, DAO LT. Antioxidante constituent of almond [*Prunus dulcis* (Mill.) D.A. Webb.] hulls. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 51: 496-501; 2003.

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

TEIXEIRA CF, NEUHAUSS E, BEM R, ROMANZINI J, GRAEFF-TEIXEIRA C. Detection of *Schistosoma mansoni* Eggs in Feces through their Interaction with Paramagnetic Beads in a Magnetic Field. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 1:e73; 2007.

THÉRON. A.; POINTIER, J. P.; MORAND, S.; IMBERT-ESTABLET, D.; BOREL, G. Long-term dynamics of natural populations of *Schistosoma mansoni* among *Rattus rattus* in patchy environment. *Parasitology*, 104: 291-298; 1992.

THORNHILL J, RABBIT PM, MCVEIGH P, MAULE A, JURBERG AD, KUSEL JR. *Schistosoma mansoni* cercariae experience influx of macromolecules during skin penetration. *Parasitology*, 136: 1257-67; 2009.

TISCHENDORF, F. On the evolution of the spleen. *Experientia*, 41: 145-152, 1985.

TRIVELLATOGRASSI L, MALHEIROS A, MEYRE-SILVA C, BUSS ZS, MONGUILHOTT ED, FRÖDE TS, SOUZA MM. From popular use to pharmacological validation: a study of the anti-inflammatory, anti-nociceptive and healing effects of *Chenopodium ambrosioides* extract. *Journal of Ethnopharmacology*, 145 (1): 12738; 2013.

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, GÄRTNER F, COSTA JMC. Praziquantel for Schistosomiasis: Single Drug Metabolism Revisited, Mode of Action, and Resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 61: e02582-16; 2017.

VAN DER WERF MJ, VLAS SJ, BROOKER S, LOOMAN CW, NAGELKERKE NJ, HABBEMA JD, ENGELS D. Habbema and Dirk Engels. Quantification of clinical morbidity associated with schistosome infection in sub-Saharan Africa. *Acta Tropica*, 89 (2-3): 125-139; 2003.

VAN LIESHOUT L, POLDERMAN AM, DEELDER AM. Immunodiagnosis of Schistosomiasis by determination of the circulating antigens CAA and CCA, in particular in individuals with recent or light infections. *Acta Tropica*, 77: 69–80; 2000.

VANNELLA KM, RAMALINGAM TR, BORTHWICK LA, BARRON L, HART KM, THOMPSON RW, KINDRACHUK KN, CHEEVER AW, WHITE S, BUDELSKY AL, COMEAU MR, SMITH DE, WYNN TA. Combinatorial targeting of TSLP, IL-25, and IL-33 in type 2 cytokine-driven inflammation and fibrosis. *Science Translational Medicine*, 8(337): 337ra65; 2016.

VARGAS IA, ARAUJO BERNAL S, MARTINEZ TELLEZ MA, ORTEGA NIEBLAS M. Effect of plant extracts on the growth and aflatoxin production of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. *Revista Mexicana de Fitopatologia*, 15 (2): 91-5; 1997.

VEIGA-BORGEAUD T, LEMOS-NETO RC, PETER F, BASTOS OC. Constatções sobre a importância dos roedores silvestres (*Holochilus brasiliensis nanus*. Thomas, 1981) na epidemiologia da esquistossomose própria da Pré-Amazônia. *Caderno de Pesquisa*, 2 (1): 86-99; 1986.

VERLOOVE FA. New combination in Oxybasis (Amaranthaceae). *New Journal of Botany*, 3 (1): 59-60; 2013.

VITORINO RR, SOUZA FPC, COSTA AP, FARIA-JÚNIOR FC, SANTANA LA, GOMES AP. Esquistossomose mansônica: diagnóstico, tratamento, epidemiologia, profilaxia e controle. *Revista Brasileira de Clínica Médica*, 10 (1): 39-45; 2012.

WARREN KS. The secret of the immunopathogenesis of schistosomiasis: in vivo models. *Immunological Reviews*, 61: 189-213; 1982.

WEERAKOON KGAD, GOBERT GN, CAI P, MCMANUS DP. Advances in the Diagnosis of Human Schistosomiasis. *Clinical Microbiology Reviews*, 28 (4): 939–967; 2015.

WHITFIELD PJ, BARTLETT A, KHAMMO N, BRAIN AP, BROWN MB, MARRIOTT C, CLOTHIER R. Delayed tail loss during the invasion of human skin by schistosome cercariae. *Parasitology*, 126: 135-140; 2003.

WHO, World Health Organization. Elimination of schistosomiasis from low-transmission areas: report of a WHO informal consultation, Salvador, Bahia, Brazil, p. 18-19 August 2008, 2009.

WHO, World Health Organization. Investing to overcome the Global Impact of Neglected Tropical Diseases. Geneva, 2015. 191 p.

WHO, World Health Organization. Schistosomiasis: Situation and trends, 2017.

WHO. World Health Organization. Schistosomiasis fact sheet 115. 2014.
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs115/en/>

WILSON MS, MENTIK-KANE MM, PESCE JT, RAMALINGAM TR, THOMPSON R, WYNN TA. Immunopathology of schistosomiasis. *Immunology & Cell Biology*, 85: 148-154; 2007.

WOLMARANS CT, DE KOCK KN, STRAUSS HD, BORNMAN M. Daily emergence of *Schistosoma mansoni* and *S. haematobium* cercariae from naturally infected snails under field conditions. *Journal of Helminthology*, 76 (3): 273-277; 2002.

WYNN TA, BARRON L. Macrophages: master regulators of inflammation and fibrosis. In *Proceedings of The Seminars in Liver Disease*, 245-257; 2010.

WYNN TA, THOMPSON RW, CHEEVER AW, MENTINK-KANE MM. Immunopathogenesis of schistosomiasis. *Immunological Reviews*, 201: 156–167; 2004.

XIAO S, SHEN B, UTZINGER J, CHOLLET J; TANNER M. Alterações ultraestruturais no *Schistosoma mansoni* adulto causado por artemeter. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 97: 717-724; 2002.

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. *Thrombosis research*, 128 (3): 237-242; 2011.

ZAIA GM. Efeito da *Mentha piperita* L. durante a infecção experimental por *Schistosoma mansoni*. 73 f. Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2015.

ZAMILPA A, GARCÍA-ALANÍS C, LÓPEZ-ARELLANO ME, HERNÁNDEZ-VELÁZQUEZ 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.

ZARETSKY AG, TAYLOR JJ, KING IL, MARSHALL FA, MOHRS M, PEARCE EJ. T follicular helper cells differentiate from Th2 cells in response to helminth antigens. *Journal of Experimental Medicine*, 206 :991–999; 2009.

ZHANG P, MUTAPI F. IgE: a key Antibody in *Schistosoma* Infection. *Electronic Journal of Biology*, 2 (1): 11-14; 2006.

ZHANG QW, LIU L, GONG CY, SHI HS, ZENG YH, WANG XZ, ZHAO YW, WEI YQ. Prognostic significance of tumor-associated macrophages in solid tumor: a meta-analysis of the literature. *PLOS One*, 7 (12): e509-46; 2012.

APÊNDICES

APÊNDICE A

Tabela 7. Composição química do extrato hidroalcoólico de *Dysphania ambrosioides*

	(M-H) ⁻	MS ⁿ	Compostos
1	191	173; 127; 85	Ácido quínico
2	193	135	Ácido glucorônico
3	285	257	Kaempferol
4	295	163	Ácido <i>p</i> -coumaroil-xilose
5	301	285; 267; 241; 173	Hesperetina
6	431	285	Kaempferol-3-O-alfa-L-raminosideo
7	463	301	Quercetina-3-O-glicosideo
8	563	431;285;151	Kaempferol-O-raminosideo-pentosideo
9	579	447; 301	Quercetina-O-raminosideo-pentosideo
10	579	447; 301	Naringin
11	593	285	Kaempferol-3-Glucoside-3 " - Rhamnoside
12	595	301; 151	Quercetina-3-O-arabinoglucosideo
13	609	463; 301	Quercetina-3-O-rutinosideo
14	623	447; 301	Isoramnetina-3-O-rutinosideo
15	739	593; 285	Kaempferol-3-Glucoside-2 " – Rhamnoside-7-Rhamnoside
16	725	285	Kaempferol-O-pentosideo-2 " - ramnosideo-hexosideo

Análise realizada por espectrometria de massas. M-H (massa do composto menos um H) e MSⁿ (Íon filho)

APÊNDICE B

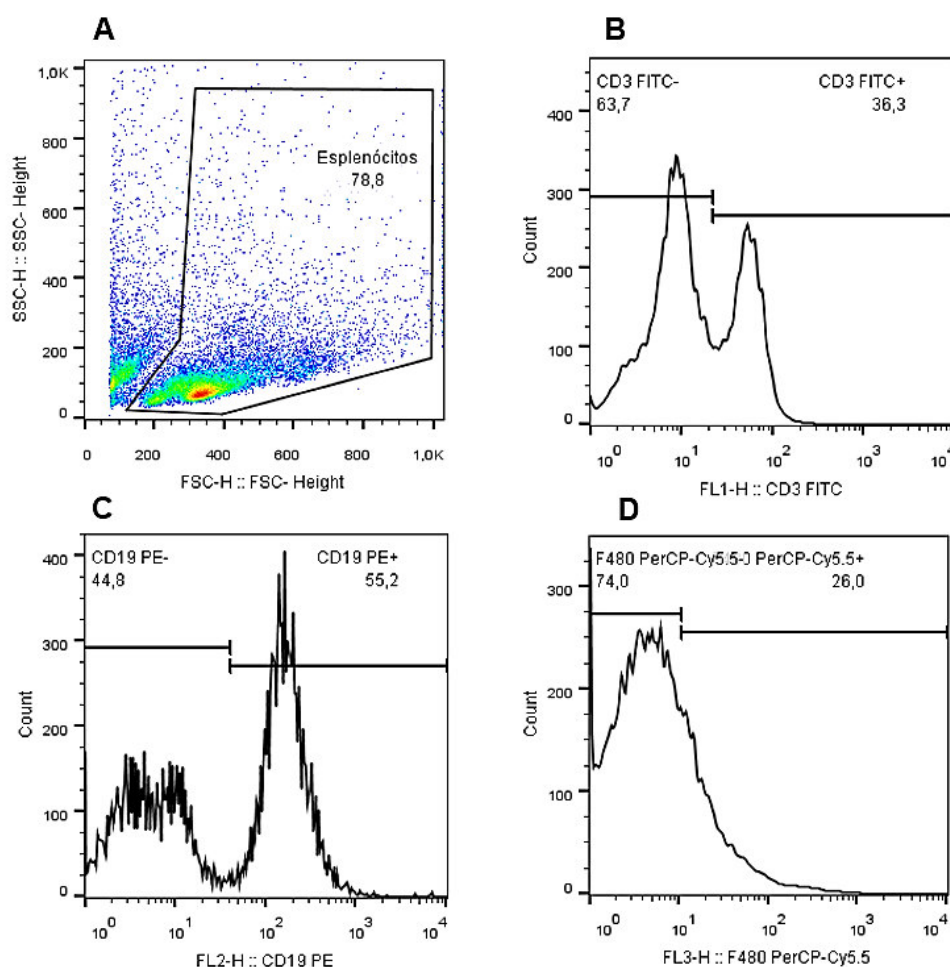


Figura 19. Estratégia de análise para identificação de linfócitos T, linfócitos B e macrófagos do baço dos animais. As células do baço foram obtidas dos animais infectados ou não por *S. mansoni*, e tratados ou não com extrato hidroalcoólico de *D. ambrosioides*. As células foram marcadas com anticorpos específicos para linfócitos T, B e macrófagos. Para análise das células inicialmente, foi feita a seleção da região contendo as células de interesse, característica dos esplenócitos no gráfico baseado em granulosidade (SSC) versus tamanho (FSC) (Figura 18A). Para análise dos linfócitos T foi feita a seleção da região positiva para CD3+ no histograma baseado em CD3 (canal 1) (Figura 18B). Para análise dos linfócitos B foi feita a seleção da região positiva para CD19+ no histograma baseado em CD19 (canal 2) (Figura 18C). Para análise dos macrófagos foi feita a seleção da região positiva para F4/80+ no histograma baseado em F4/80 (canal 3) (Figura 18D).

APÊNDICE C

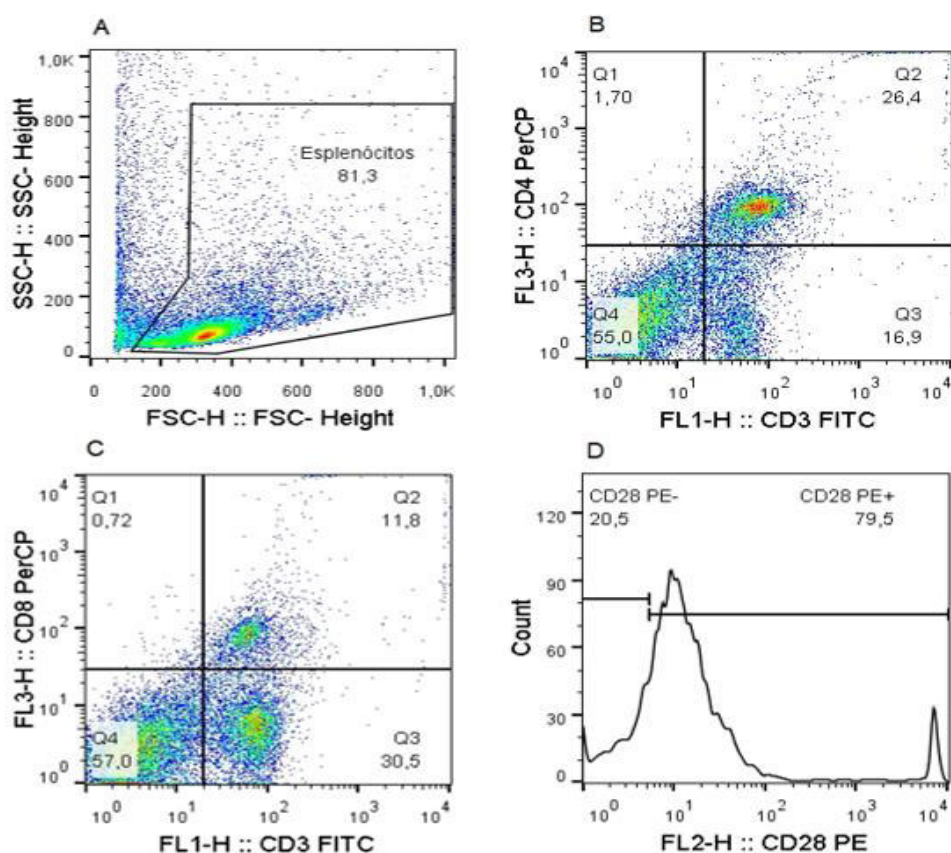


Figura 20. Estratégia de análise para identificação de linfócitos T auxiliares e T citotóxicos do baço dos animais. As células do baço foram obtidas dos animais infectados ou não por *S. mansoni*, e tratados ou não com extrato hidroalcoólico de *D. ambrosioides*. Para análise das células inicialmente, foi feita a seleção da região contendo as células de interesse, característica dos esplenócitos no gráfico baseado em granulosidade (SSC) versus tamanho (FSC) (Figura 19A). Para análise das subpopulações majoritárias de linfócitos T selecionou-se os parâmetros e as regiões duplo-positivas em CD3 (canal 1) versus CD4 (canal 3) para linfócitos T auxiliares (CD3+/CD4+) (Figura 19B) e CD3 (canal 1) versus CD8 (canal 3) para linfócitos T citotóxicos (CD3+/CD8+) (Figura 19C). Para avaliação da expressão das moléculas co-estimuladoras dos linfócitos T auxiliares e citotóxicos foram selecionadas as regiões positivas para o CD28 no histograma baseado em CD28 (canal 2) (Figura 19D).

APÊNDICE D

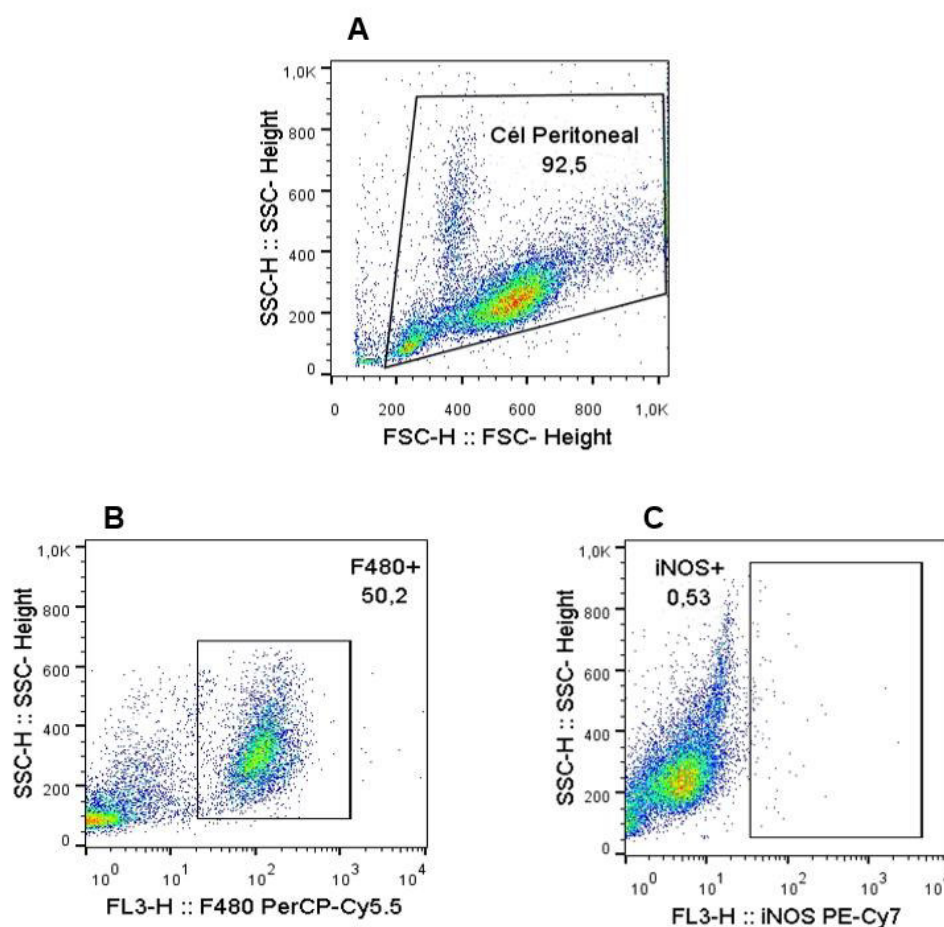


Figura 21. Estratégia de análise para identificação de macrófagos e expressão da iNOS em células peritoneais dos animais. As células peritoneais foram obtidas dos animais infectados ou não por *S. mansoni*, e tratados ou não com extrato hidroalcoólico de *D. ambrosioides*. Para análise das células, inicialmente, foi feita a seleção da região contendo as células de interesse, característica das células peritoneais no gráfico baseado em granulosidade (SSC) versus tamanho (FSC) (Figura 20A). Para análise dos macrófagos foi feita a seleção da região positiva para F4/80+ (canal 3) (Figura 20B). Em seguida foi avaliada a expressão da iNOS na região positiva para iNOS+ (canal 3) (Figura 20C).

ANEXOS

Anexo A

Voucher exsicata *Dysphania ambrosioides* (L.) Mosyakin & Clemants

UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO

Fundação Instituída nos termos da Lei nº 5.152, de 21/10/1966 – São Luís - Maranhão

DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA - CCBS
HERBÁRIO DO MARANHÃO - MAR

São Luís, 10 de Julho de 2017.

CONFIRMAÇÃO DE IDENTIFICAÇÃO

Segue abaixo a confirmação da identificação realizada. Desde já agradecemos o envio do material e informamos que o mesmo estará, em breve, devidamente catalogado no acervo do Herbário MAR.

Nº tombo MAR	Coletor (número)	Família	Espécie
9.349	GOMES, L. N. e E.B. Almeida Jr. (01)	Amaranthaceae	<i>Dysphania ambrosioides</i> (L.) Mosyakin & Clemants

Atenciosamente,

Assinatura manuscrita em azul de Eduardo B. de Almeida Jr.

Prof. Dr. Eduardo B. de Almeida Jr.
Curador do Herbário MAR

ANEXO B

Parecer do comitê de ética



UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
 COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS-CEUA
 CIAEP:01.0341.2014

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "**Avaliação do efeito da polarização de macrófagos por agentes infecciosos, tumores e imunomoduladores naturais sobre a susceptibilidade de hospedeiros em diferentes modelos experimentais**" registrada com o nº 23115.003819/2016-11, sob a responsabilidade de 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 **Aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA- UFMA) da Universidade Federal do Maranhão em reunião de 07/06/2016.

FINALIDADE	() ENSINO (X) PESQUISA () EXTENSÃO
Vigência da autorização	4 ANOS
Espécie/linhagem/raça	<i>Mus musculus</i> (camundongo) / Balb/c C57Bl/6 e Swiss
Nº de animais	600
Peso/Idade	20-30g / 3-4 meses
Sexo	Machos / fêmeas
Origem	Biotério Central da UFMA

Prof. Dra. Lucilene Amorim Silva
 Presidente da Comissão de Ética no uso de animais-CEUA
 UFMA

ANEXO C**Carta de Submissão de Artigo**

Revista: Mediators of Inflammation (Impact Factor 3.549)

1232805: Acknowledging Receipt

Dear Dr. Nascimento,

The Research Article titled "AMPLIFICATION OF M1 MACROPHAGEAL POLARIZATION AND INHIBITION OF TUMOR DEVELOPMENT BY AMINO Guanidine Treatment," by Johnny Nascimento, Ronaldo Ewerton V Neto, Paula Sibelly V Albuquerque, João Gustavo Rodrigues, André A M Vale, Lucilene Amorim Silva, Rosane N. Guerra, Aramys S. dos Reis, Ana Paula Azevedo-Santos and Flávia R. F. do Nascimento has been received and assigned the number 1232805.

The special issue for which the paper is being processed is
"Immune Regulatory Cells in Inflammation, Infection, Tumor, Metabolism, and Other Diseases 2019"

All authors will receive a copy of all the correspondences regarding this manuscript.

Thank you for submitting your work to Mediators of Inflammation.

Best regards,

--

Usha Chandrakumar

Editorial Office

Hindawi

<http://www.hindawi.com>

ANEXO D**Carta de Submissão de Artigo**

Revista: Acta Parasitológica (Impact Factor 1.039)

Acta Parasitologica - Submission Confirmation Spatial and seasonal distribution of natural infection of *Holochilus sciureu...*

Re: "Spatial and seasonal distribution of natural infection of *Holochilus sciureus* for *Schistosoma mansoni* in a wild environment from a endemic area for schistosomosis in Brazil"

Full author list: Carla Fernanda do Carmo-Silva; Andrea Teles-Reis; Raynara Fernanda Silva-Soares; João Gustavo Mendes Rodrigues, M. D.; Maria Gabriela Sampaio Lira, M. D.; Ranielly Araújo Nogueira, M. D.; Davi Viegas-Melo; Diogo Tavares Cardoso, M. D.; Guilherme Silva Miranda, M. D.; Nêuton Silva-Souza, PhD

Dear Sr. João Mendes Rodrigues,

We have just received the submission entitled: "Spatial and seasonal distribution of natural infection of *Holochilus sciureus* for *Schistosoma mansoni* in a wild environment from a endemic area for schistosomosis in Brazil" for possible publication in *Acta Parasitologica*, and you are listed as one of the co-authors.

The manuscript has been submitted to the journal by Prof. Guilherme Silva Miranda who will be able to track the status of the paper through his/her login.

If you have any objections, please contact the editorial office as soon as possible. If we do not hear back from you, we will assume you agree with your co-authorship.

Thank you very much.

With kind regards,

Springer Journals Editorial Office
Acta Parasitologica