

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Instituto Aggeu Magalhães

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO AGGEU MAGALHÃES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA EM
SAÚDE

Rhaíssa Evelyn Moraes Ramos

**Avaliação da ação dos imunomoduladores P-MAPA e da silimarina na
esquistossomose crônica em modelo murino**

Recife

2022

RHAÍSSA EVELYN MORAES RAMOS

Avaliação da ação dos imunomoduladores P-MAPA e da silimarina na esquistossomose crônica em modelo murino

Tese de Doutorado em Biociências e Biotecnologia em Saúde apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biociências e Biotecnologia em Saúde do Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciências.

Orientador: Dr. Fábio Lopes de Melo

Coorientador: Dr. Bruno de Melo Carvalho

Recife

2022

Título do trabalho em inglês: Action assessment of P-MAPA and silymarin immunomodulators in chronic schistosomiasis in a murine model.

O presente trabalho foi realizado com apoio de Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) - Código de Financiamento 001.

R175a Ramos, Rhaíssa Evelyn Moraes.
Avaliação da ação dos imunomoduladores P-MAPA e da silimarina na esquistossomose crônica em modelo murino / Rhaíssa Evelyn Moraes Ramos.
-- 2022.
121 f. : il. color.

Orientador: Fábio Lopes de Melo.
Coorientador: Bruno de Melo Carvalho.
Tese (Doutorado em Programa de Pós-graduação em Biociências e Biotecnologia em Saúde), Recife, 2022.
Bibliografia: f. 106-112.

1. Esquistossomose. 2. Schistosoma mansoni. 3. Silimarina. I. Título.
CDU 577

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da Rede de Bibliotecas da Fiocruz com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Bibliotecário responsável pela elaboração da ficha catalográfica: Adagilson Batista Bispo da Silva - CRB-1239
Biblioteca Luciana Borges Abrantes dos Santos

Rhaíssa Evelyn Moraes Ramos

Avaliação da ação dos imunomoduladores P-MAPA e da silimarina na esquistossomose crônica em modelo murino

Tese de Doutorado em Biociências e Biotecnologia em Saúde apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biociências e Biotecnologia em Saúde do Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciências.

Aprovado em: 11 de Novembro de 2022

BANCA EXAMINADORA

Dr. Fábio Lopes de Melo (orientador)

Instituto Aggeu Magalhães/Fundação Oswaldo Cruz

Dr. Christian Robson de Souza Reis

Instituto Aggeu Magalhães/Fundação Oswaldo Cruz

Dr. Danilo Elias Xavier

Instituto Aggeu Magalhães/Fundação Oswaldo Cruz

Dra. Elis Dionísio da Silva

Instituto de Saúde e Biotecnologia/Universidade Federal do Amazonas

Dra. Maria Danielly Lima de Oliveira

Programa de Inovação Terapêutica/Universidade Federal de Pernambuco

Aos meus avós José Calixto Ramos (in memoriam),

Geni Ramos (in memoriam) e

Rosa de Moraes (in memoriam)

Por toda luta e exemplo incansáveis por dias melhores.

Obrigada por serem meus avós e minha ancestralidade.

AGRADECIMENTOS

Ogum Iê! Eparrey Oyá! Obá Siré! Kaô Kabiecilê! Ora yê yê! Epá Babá Ifá!

Todos os meus agradecimentos ao sagrado que sustenta minha cabeça, que ilumina meus caminhos, que me dá força, discernimento, calma e que me proporcionou a conclusão em mais essa etapa.

Aos meus pais, **Jorge** e **Valéria**, por sempre acreditarem e investirem em mim, concordando ou não com as minhas escolhas de estudo/trabalho. À minha esposa **Babi**, pelas doses de incentivo, por ouvir todas as minhas reclamações e lamentações de bom grado e sem cara feia. Por todos os risos, sorrisos, tolerância aos eternos mau-humores, ausências, bem como todo o cuidado e atenção dedicados a mim nesse tempo.

Aos meus orientadores **Fábio** e **Bruno** pela confiança, por acreditarem em meu potencial, por todo o apoio e pelas nossas conversas que proporcionaram o meu desenvolvimento científico. Aos meus parceiros de experimentos: Beatriz, Sarah, Ralph, Keylla, Douglas e Juliana por toda ajuda e guia nos experimentos e análises. A Rubens, meu co-ori-extra-oficial por toda paciência e dedicação ímpares.

Aos meus amigos e parceiros de laboratórios: Walter, Mércia, Manu, Amandinha, Amandona, Pablo e Raul por toda ajuda, conversa, Tinas, dúvidas sanadas, trocas de palavras, bolinhos, água alcalinizada, cafés veganos, e pela simples companhia no dia-a-dia.

As minhas migles Bárbara e Maíra, por todas as conversas, correções, sugestões e aleatoriedades da vida adulta.

À FIOCRUZ – Fundação Oswaldo Cruz, instituição financiadora e onde desenvolvi minhas atividades de pesquisa como bolsista e aluna de Doutorado. A Farmabrazilis pela parceria nos experimentos. E a todos que me ajudaram direta ou indiretamente.

“Esù ónà / Exú dos caminhos

***Esù ónà mo tire lode elégbàrà* / Exú dos caminhos, lá fora ele é poderoso**

***Bara ni iye, bi ónà oke wa o”* / Bara é a vida, é o caminho que nos leva ao topo**

(Laroyê!)

RESUMO

RAMOS, Rhaíssa Evelyn Moraes. Avaliação da ação dos imunomoduladores P-MAPA e da silimarina na esquistossomose crônica em modelo murino. 2022. Tese (Doutorado em Biociências e Biotecnologia em Saúde) – Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2022.

A esquistossomose é uma doença causada por trematódeos do gênero *Schistosoma*, endêmica em países tropicais e subtropicais, como o Brasil. Atualmente, o tratamento é feito com Praziquantel (PZQ), considerado eficaz apenas contra o verme adulto, mas com intensa toxicidade, necessidade de aplicação de doses elevadas e reações adversas fortes, bem como a presença de cepas refratárias ao tratamento. O P-MAPA demonstrou eficácia significativa em estudos com sistemas celulares, modelos animais e humanos em várias doenças; e a silimarina (SILI) possui ação hepatoprotetora e regeneradora, antioxidante, antifibrótica e anti-inflamatória já consolidadas. O objetivo foi avaliar ações ovicida, vermícida e hepatológicas dos imunomoduladores P-MAPA e da Silimarina, isolados ou combinados (1:1:1), em camundongos infectados pelo *S. mansoni* em fase crônica da doença. Para tal, os camundongos foram tratados com Praziquantel 50 mg/kg/5 dias por gavagem; P-MAPA 100mg/kg/dose única via intraperitoneal; e Silimarina 10 mg/kg a cada 48h por 10 doses, via gavagem. Nos experimentos *in vitro*, foi avaliada a ação vermícida por ação direta e os danos causados ao tegumento por microscopia eletrônica de varredura. Nos experimentos *in vivo*, avaliou-se contagem geral de ovos, cheever, oograma e histologia. Utilizou-se microscopia eletrônica de varredura para avaliar o tegumento dos vermes recuperados *in vivo* e *in vitro*. As combinações Silimarina/Praziquantel e Praziquantel/P-MAPA/Silimarina reduziram o quantitativo total de ovos e os de cheever tanto no fígado como no intestino. Com relação ao Oograma, o P-MAPA apresentou a maior quantidade de ovos inviáveis. O principal achado da histologia, foi a redução dos tamanhos e quantidades dos granulomas nos grupos de SILI. Com relação as análises por microscopia eletrônica de varredura, tanto no *in vivo* como *in vitro*, PZQ e P-MAPA isolados, PZQ/P-MAPA combinados e PZQ/P-MAPA/SILI juntos causaram graves lesões e destruição do tegumento. Conclui-se que os protocolos utilizados envolvendo a combinação das três drogas foi efetivo com relação a ação ovicida, vermícida e hepatológica da esquistossomose crônica em modelo murino.

Palavras-chave: esquistossomose; *Schistosoma mansoni*; silimarina.

ABSTRACT

RAMOS, Rhaíssa Evelyn Moraes. Action assessment of P-MAPA and silymarin immunomodulators in chronic schistosomiasis in a murine model. 2022. Thesis. (Doctorate in Bioscience and Health Biotechnology) – Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2022.

Schistosomiasis is a disease caused by trematodes of the genus *Schistosoma*, endemic in tropical and subtropical countries, such as Brazil. Currently, the treatment is done with Praziquantel (PZQ), considered effective against the adult worm, but with high toxicity, the need to apply higher doses on patients, intense adverse reaction issues, as well as the presence of strains refractory to treatment. P-MAPA has demonstrated significant efficacy in studies with cellular systems, animal models and humans in various diseases; and silymarin (SILI) has a well-established hepatoprotective and regenerating, antioxidant, antifibrotic and anti-inflammatory action. The objective was to evaluate ovicidal, vermicide and hepatologic actions of the immunomodulators P-MAPA and Silymarin, alone or in combination, in mice infected with *S. mansoni* in the chronic phase of the disease. For this, the mice were treated with Praziquantel 50 mg/kg/5 days by gavage; P-MAP 100mg/kg/single dose intraperitoneally; and Silymarin 10 mg/kg every 48 hours for 10 doses, via gavage. In the *in vitro* experiments, the vermicide action by direct action and the damage caused to the tegument by scanning electron microscopy were evaluated. In the *in vivo* experiments, the general egg count, cheever, oogram and histology were evaluated. Scanning electron microscopy was used to evaluate the integument of the worms recovered *in vivo* and *in vitro*. The combinations Silymarin/Praziquantel and Praziquantel/P-MAPA/Silymarin reduced the total amount of eggs and cheever in both liver and intestine. Regarding the Oogram, the P-MAPA presented the highest amount of unviable eggs. The main histological finding was the reduction in the sizes and quantities of granulomas in the SILI groups. Regarding the analysis by scanning electron microscopy, both *in vivo* and *in vitro*, PZQ and P-MAPA alone, PZQ/P-MAPA combined and PZQ/P-MAPA/SILI together caused severe lesions and destruction of the tegument. It is concluded that the protocols used involving the combination of the three drugs were effective in relation to the ovicidal, vermicide and hepatological action of chronic schistosomiasis in a murine model.

Keywords: schistosomiasis; *Schistosoma mansoni*; silymarin.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	Distribuição mundial da Esquistossomose Mansônica	23
Figura 2 –	Distribuição da esquistossomose segundo a média do percentual de positividade por município. Brasil, 2009-2020	24
Figura 3 –	Ciclo biológico do <i>S. mansoni</i> (adaptado CDC)	26
Figura 4 –	Microscopia eletrônica de varredura de cercária de <i>Schistosoma mansoni</i>	27
Figura 5 –	Macho e fêmea de <i>S. mansoni</i> acasalados	28
Figura 6 –	Imagens de microscópio confocal de varredura a laser de fêmeas de <i>S. mansoni</i>	29
Figura 7 –	Imagens de microscópio confocal de varredura a laser de machos <i>S. mansoni</i>	30
Figura 8 –	Ovo de <i>S. mansoni</i> maduro com miracídio em seu interior.....	30
Figura 9 –	Miracídio de <i>S. mansoni</i>	31
Figura 10 –	Fórmula Estrutural do Praziquantel	35
Figura 11 –	Placa de semeio com <i>Aspergillus oryzae</i>	37
Figura 12 –	Fórmula Estrutural Proposta do P-MAPA.....	37
Figura 13 –	Estruturas de silibinas e isossilibinas	41
Figura 14 –	Estruturas da silicristina, isossilicristina, silidianina e taxifolina	42
Figura 15 –	Fluxograma de experimentos <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> baseado nas drogas isoladas e combinadas.....	46
Quadro 01 –	Grupos experimentais e doses terapêuticas	47
Quadro 02 –	Cronograma de aplicação das drogas	48
Figura 16 –	Placa de experimento <i>in vitro</i>	49
Figura 17 –	Fotomicrografia eletrônica de varredura de vermes adultos de <i>S. mansoni</i>	55
Figura 18 –	Fotomicrografia eletrônica de varredura de vermes adultos de <i>S. mansoni</i> tratados com Praziquantel.....	56
Figura 19 –	Fotomicrografia eletrônica de varredura de vermes adultos de <i>S. mansoni</i> tratados com P-MAPA.....	57

Figura 20 –	Fotomicrografia eletrônica de varredura de vermes adultos de <i>S. mansoni</i> tratados com Praziquantel/ P-MAPA	58
Figura 21 –	Fotomicrografia eletrônica de varredura de vermes adultos de <i>S. mansoni</i> tratados com Silimarina	59
Figura 22 –	Fotomicrografia eletrônica de varredura de vermes adultos de <i>S. mansoni</i> tratados com Silimarina/Praziquantel	60
Figura 23 –	Fotomicrografia eletrônica de varredura de vermes adultos de <i>S. mansoni</i> tratados com Silimarina/P-MAPA	61
Figura 24 –	Fotomicrografia eletrônica de varredura de vermes adultos de <i>S. mansoni</i> tratados com Praziquantel/ P-MAPA/Silimarina	62
Figura 25 –	Curva de Sobrevivência dos animais infectados	63
Figura 26 –	Média de pesos dos fígados	64
Figura 27 –	Média de pesos dos Intestinos	66
Figura 28 –	Média de pesos dos Baços	68
Figura 29 –	Contagem geral de ovos no fígado	70
Figura 30 –	Contagem geral de ovos no intestino	72
Figura 31 –	Cheever de Fígado	74
Figura 32 –	Cheever de Intestino	76
Figura 33 –	Oograma	77
Figura 34 –	Ovos viáveis	78
Figura 35 –	Ovos inviáveis	80
Figura 36 –	Quantidade e Médias de Áreas dos Granulomas	82
Figura 37 –	Fotomicrografia de histologia hepática do grupo infectado e tratado com Praziquantel	84
Figura 38 –	Fotomicrografia de histologia hepática do grupo infectado e tratado com P-MAPA	85
Figura 39 –	Fotomicrografia detalhada de histologia hepática do grupo infectado e tratado com P-MAPA	85
Figura 40 –	Fotomicrografia de histologia hepática do grupo infectado e tratado com Praziquantel/P-MAPA	86
Figura 41 –	Fotomicrografia de histologia hepática do grupo infectado e tratado com Silimarina	87

Figura 42 –	Fotomicrografia de histologia hepática do grupo infectado e tratado com Silimarina/Praziquantel	88
Figura 43 –	Fotomicrografia de histologia hepática do grupo infectado e tratado com Silimarina/P-MAPA	89
Figura 44 –	Fotomicrografia de histologia hepática do grupo infectado e tratado com Praziquantel/P-MAPA/Silimarina	90
Figura 45 –	Fotomicrografia eletrônica de varredura de vermes adultos de <i>S. mansoni</i>	91
Figura 46 –	Fotomicrografia eletrônica de varredura de vermes adultos de <i>S. mansoni</i> tratados com Praziquantel.....	92
Figura 47 –	Fotomicrografia eletrônica de varredura de vermes adultos de <i>S. mansoni</i> tratados com P-MAPA.....	93
Figura 48 –	Fotomicrografia eletrônica de varredura de vermes adultos de <i>S. mansoni</i> tratados com Praziquantel/ P-MAPA	94
Figura 49 –	Fotomicrografia eletrônica de varredura de vermes adultos de <i>S. mansoni</i> tratados com Silimarina	95
Figura 50 –	Fotomicrografia eletrônica de varredura de vermes adultos de <i>S. mansoni</i> tratados com Silimarina/Praziquantel	96
Figura 51 –	Fotomicrografia eletrônica de varredura de vermes adultos de <i>S. mansoni</i> tratados com Silimarina/P-MAPA	97
Figura 52 –	Fotomicrografia eletrônica de varredura de vermes adultos de <i>S. mansoni</i> tratados com Praziquantel/ P-MAPA/Silimarina	98

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Score de mobilidade após 24h de incubação	54
Tabela 2 –	Quantitativo de vermes recuperados	63
Tabela 3 –	Comparações dois a dois para cada tipo e combinação de drogas para todas as variáveis no peso do fígado	65
Tabela 4 –	Comparações dois a dois para cada tipo e combinação de drogas para todas as variáveis no peso do intestino	67
Tabela 5 –	Comparações dois a dois para cada tipo e combinação de drogas para todas as variáveis no peso do baço	68
Tabela 6 –	Comparações dois a dois para cada tipo e combinação de drogas para o quantitativo total de ovos recuperados no fígado...	70
Tabela 7 –	Comparações dois a dois para cada tipo e combinação de drogas para o quantitativo total de ovos recuperados no intestino	72
Tabela 8 –	Comparações dois a dois para cada tipo e combinação de drogas para todas as variáveis no cheever do fígado	73
Tabela 9 –	Comparações dois a dois para cada tipo e combinação de drogas para todas as variáveis no cheever do intestino	76
Tabela 10 –	Comparações dois a dois para cada tipo e combinação de drogas para todas as variáveis no oograma de ovos viáveis	79
Tabela 11 –	Comparações dois a dois para cada tipo e combinação de drogas para todas as variáveis no oograma de ovos inviáveis	80
Tabela 12 –	Quantidades e médias de áreas dos granulomas por grupo experimental	82
Tabela 13 –	Comparações post-hoc de Dunn com correção de Bonferroni dois a dois para cada tipo e combinação de drogas para todas as variáveis no tamanho dos granulomas	83

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C	grau Celcius
ADCC	Citotoxicidade celular dependente de anticorpos
BRA	Brasil
C	Carbono
CDC	Center for Disease Control and Prevention
CEUA	Comitê em Ética no Uso de Animais
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de experimentação Animal
CTRL	Controle
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desorribonucleico
dpi	Dias pós infecção
FBS	Soro fetal bovino
FDA	Food and Drug Administration
Fiocruz	Fundação Oswaldo Cruz
G	Grupo
GC	Células germinativas (GC)
H	Hidrogênio
h	Horas
H&E	Hematoxilina e eosina
IAM	Instituto Aggeu Magalhães
IFN- γ	Interferon gama
IL	Interleucina
kg	Quilo
KOH	Hidróxido de Potássio
LD50	dose letal 50
LE	Leandro Evangelista
Mg	Magnésio
μ g	Microgramas
μ m	Micrometros
Mg	Miligramas
mL	Mililitros

N	Nitrogênio
NFkB	Fator nuclear Kappa B
NK	Células natural killer
Nrf2	Fator nuclear eritróide 2
O	Ovário (O)
O	Oxigênio
OMS	Organização Mundial da Saúde
OV	Oviduto (OV)
P.A.	Para análise
PBS	Tampão fosfato-salino
PLURÔ	Pluronic F-127
P-MAPA	Anidrido polimérico de fosfolinoleato de magnésio e amônio e proteína
PZQ	Praziquantel
RMR	Região Metropolitana do Recife
RNA	Ácido ribonucleico
RNAr	RNA ribossomal
RPMI 1640	Roswell Park Memorial Institute
S	Enxofre
S.	Schistosoma
SILI	Silimarina
Th	Linfócito T helper
TL	Lobo testicular (TL)
TLR	Receptores celulares do tipo toll-like
TNF	fator de necrose tumoral
UI	Unidades Internacionais
USA	Unites States of América – Estados Unidos da América
VG	Glândula vitelina (VG)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
2 OBJETIVOS	21
2.1 OBJETIVO GERAL	21
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
3 REFERENCIAL TEÓRICO CONCEITUAL	22
3.1 O <i>SCHISTOSOMA MANSONI</i> E A ESQUISTOSSOMOSE	22
3.2 CICLO BIOLÓGICO E TRANSMISSÃO	25
3.3 IMUNOPATOGENESE	32
3.4 PRAZQUANTEL (PZQ)	34
3.5 P-MAPA	36
3.6 SILIMARINA (SILI)	39
4 MATERIAL E MÉTODOS	45
4.1 POPULAÇÃO DO ESTUDO	45
4.2 DESENHO DE ESTUDO	45
4.3 AVALIAÇÃO LABORATORIAL	46
4.3.1 Grupos e protocolos de tratamento	46
4.3.2 Animais e infecção	47
4.3.2.1 Experimentos <i>in vivo</i>	47
4.3.2.2 Experimentos <i>in vitro</i>	48
4.3.3 Contagem e classificação de ovos	50
4.3.4 Análise histológica	51
4.3.5 Microscopia Eletrônica de Varredura	51
4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA	51
5 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	53
6 RESULTADOS	54
6.1 EXPERIMENTOS <i>IN VITRO</i>	54
6.1.1 Avaliação da atividade vermícida	54
6.1.2 Microscopia eletrônica de varredura dos vermes adultos	54
6.1.2.1 Microscopia eletrônica de varredura sem tratamento (DMSO)	54

6.1.2.2 Microscopia eletrônica de varredura de vermes adultos tratados com Praziquantel	55
6.1.2.3 Microscopia eletrônica de varredura de vermes adultos tratados com P-MAPA	56
6.1.2.4 Microscopia eletrônica de varredura de vermes adultos tratados com Praziquantel/P-MAPA.....	57
6.1.2.5 Microscopia eletrônica de varredura de vermes adultos tratados com Silimarina	58
6.1.2.6 Microscopia eletrônica de varredura de vermes adultos tratados com Silimarina/Praziquantel.....	59
6.1.2.7 Microscopia eletrônica de varredura de vermes adultos tratados com Silimarina/P-MAPA.....	60
6.1.2.8 Microscopia eletrônica de varredura de vermes adultos tratados com Praziquantel/P-MAPA /Silimarina	61
6.2 EXPERIMENTOS <i>IN VIVO</i>	62
6.2.1 Curva de sobrevivência dos camundongos	62
6.2.2 Quantitativo de vermes recuperados dos animais infectados	63
6.2.3 Pesos dos órgãos.....	63
6.2.3.1 Fígado	64
6.2.3.2 Intestino.....	66
6.2.3.3 Baço	68
6.2.4 Efeitos in vivo do Praziquantel, P-MAPA e Silimarina, isolados e combinados, no número total de ovos recuperados	69
6.2.4.1 Fígado	69
6.2.4.2 Intestino.....	71
6.2.5 Efeitos in vivo do Praziquantel, P-MAPA e Silimarina, isolados e combinados, no número de ovos / g de tecido (Cheever).....	73
6.2.5.1 Cheever de Fígado.....	73
6.2.4.2 Cheever de Intestino	75
6.2.5 Efeitos in vivo do Praziquantel, P-MAPA e Silimarina, isolados e combinados, na viabilidade de ovos de <i>S. mansoni</i> - Oograma.....	77
6.2.5.1 Ovos viáveis	78

6.2.5.2 Ovos inviáveis	79
6.2.6 Análise histohepática.....	81
6.2.6.1 Histologia de tratamento com Praziquantel	83
6.1.6.2 Histologia de tratamento com P-MAPA	84
6.2.6.3 Histologia de tratamento com Praziquantel/P-MAPA	86
6.2.6.4 Histologia de tratamento com Silimarina	86
6.2.6.5 Histologia de tratamento com Silimarina/Praziquantel	87
6.2.6.6 Histologia de tratamento com Silimarina/P-MAPA	88
6.2.6.7 Histologia de tratamento com Praziquantel/P-MAPA/Silimarina.....	89
6.2.7 Microscopia eletrônica de varredura dos vermes adultos	81
6.2.7.1 Microscopia eletrônica de varredura de vermes adultos sem tratamento.....	90
6.2.7.2 Microscopia eletrônica de varredura de vermes adultos tratados com Praziquantel	91
6.2.7.3 Microscopia eletrônica de varredura de vermes adultos tratados com P-MAPA.....	92
6.2.7.4 Microscopia eletrônica de varredura de vermes adultos tratados com Praziquantel/P-MAPA.....	93
6.2.7.5 Microscopia eletrônica de varredura de vermes adultos tratados com Silimarina	94
6.2.7.6. Microscopia eletrônica de varredura de vermes adultos tratados com Silimarina/Praziquantel.....	95
6.2.7.7 Microscopia eletrônica de varredura de vermes adultos tratados com Silimarina/P-MAPA.....	96
6. 2.7.8 Microscopia eletrônica de varredura de tratamento com Praziquantel/P-MAPA /Silimarina.....	97
7 DISCUSSÃO	99
8 CONCLUSÃO	105
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	106
APÊNDICE A – ARTIGO PUBLICADO	113
ANEXO A – PARECER DE APROVAÇÃO DA CEUA	121

1 INTRODUÇÃO

A esquistossomose é uma doença negligenciada, causada por trematódeos do gênero *Schistosoma*, de ocorrência endêmica em diversos países nas regiões tropicais e subtropicais do planeta. De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), estima-se que cerca de 230 milhões de pessoas estejam infectadas.

No Brasil, destacam-se os estados de Sergipe, Pernambuco, Alagoas, Minas Gerais e Bahia. Em Pernambuco, aproximadamente 55% dos municípios existentes registraram casos da doença, sendo a maioria localizada nas regiões da Zona da Mata, Agreste e Região Metropolitana do Recife (RMR), com casos de transmissão encontrados em regiões próximas ao litoral, como Porto de Galinhas.

Dentro do grupo das doenças negligenciadas, a esquistossomose, representa um sério problema de saúde pública no Brasil e nos países em desenvolvimento, e com opções terapêuticas pouco eficazes no mercado, sendo unicamente baseada na quimioterapia em massa com o praziquantel, desenvolvido na década de 1970. O que traz preocupações quanto à ocorrência de resistência/tolerância devido às intensas pressões seletivas que ocorrem por conta do tratamento de dezenas de milhões de pessoas anualmente. Os residentes em áreas endêmicas estão sujeitos à reinfeção e à repetição do tratamento devido à falta de opções, bem como exposta a toxicidade que o mesmo causa.

Por, no momento, a única droga utilizada ser o praziquantel, alguns estudos têm revelado a resistência de algumas cepas do parasito ao uso rotineiro deste medicamento. Além disso, a quimioterapia não pode ser utilizada em alguns grupos populacionais como crianças, idosos, gestante, não previne a reinfeção, e é eficaz apenas na fase adulta dos vermes. Na esquistossomose experimental, a resistência ao praziquantel em helmintos imaturos é extraordinária, sendo necessária uma dose cerca de 30 vezes maior que a utilizada no tratamento de estágios larvais e adultos para se obter uma mortalidade de 50%. Além das limitações terapêuticas, estudos mostram que a incidência de efeitos colaterais, como dor de cabeça, náusea, dores abdominais, sangue nas fezes, vômitos em pelo menos um terço da população tratada demonstra a toxicidade do tratamento de escolha atual, além de uma aparente queda na eficácia de tratamento em área endêmica.

Nesse sentido, a interação entre o parasita e seus hospedeiros tem sido constante alvo de estudo, destacando-se os elementos de sinalização como fatores

chave para o entendimento da interação parasita-hospedeiro. Por apresentar poucas opções terapêuticas eficazes no mercado, o desenvolvimento de novos fármacos que possam ser utilizados como esquistossomicida e também como adjuvantes à quimioterapia, podem dar uma contribuição muito significativa para o controle dessa parasitose, aumentando a eficácia dos tratamentos existentes, minimizando o surgimento de parasitos resistentes a droga atualmente utilizada, diminuindo significativamente a morbidade e a proliferação da doença.

Nesse ponto, o desenvolvimento de fármacos que possam atacar o parasita diretamente ou por meio de atuação no sistema imune do hospedeiro, utilizados como adjuvantes à quimioterapia pode dar uma contribuição muito significativa para o controle dessa parasitose, aumentando a eficácia dos tratamentos existentes, minimizando o surgimento de parasitos resistentes e diminuindo significativamente a morbidade, o risco de reinfecção e proliferação da doença. Assim, há uma grande necessidade de se desenvolver novas drogas com efeito anti-esquistossomótico com largo espectro de atividade contra todos os estágios de desenvolvimento do helminto ou que possuam grandes potenciais imunomodulatórios.

Como o P-MAPA, que é um agregado polimérico produzido pela fermentação de *Aspergillus oryzae*, em desenvolvimento pela Farmabrazilis, uma organização não-governamental sem finalidades lucrativas e uma rede internacional de pesquisas. O P-MAPA demonstrou possuir valiosas propriedades biológicas quando utilizado em sistemas celulares, modelos animais e em estudos preliminares com seres humanos acometidos por vários processos patológicos como leishmaniose, câncer, infecções virais, estudos de imunologia usando modelos de sangue total, zika vírus e na própria Esquistossomose.

A Silimarina é um composto extraído da *Silybum marianum*, e a literatura é vasta em estudos corroborando as demonstrações da atividade do *Silybum marianum* em doenças hepáticas agudas e crônicas. Inclusive em infecções experimentais por *S. mansoni*, com sua função já estabelecida de hepatoproteção de modo a melhorar o esquema terapêutico e/ou controlar a morbidade desencadeada pelo *Schistosoma*.

Nesse sentido, o objetivo de avaliar a interação das três drogas se volta para, não apenas, uma ação vermícida única, mas também dar mais força a resposta imunológica do paciente, bem como beneficiar a função hepática – principal órgão afetado pela doença.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar as ações ovicidas, vermícidas e hepatoprotetoras dos imunomoduladores P-MAPA e da Silimarina, isolados ou combinados, em contraposição ao Praziquantel, camundongos infectados pelo *S. mansoni* em fase crônica da doença.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Analisar as alterações morfológicas *in vitro* dos vermes adultos tratados e não tratados através de microscopia eletrônica de varredura;
- b) Mensurar a ação das drogas na oviposição hepática e intestinal pós-tratamento com P-MAPA, Silimarina e Praziquantel isolados ou combinados.
- c) Classificar os ovos no intestino pós-tratamento com P-MAPA, Silimarina e Praziquantel isolados ou combinados no oograma.
- d) Avaliar a estrutura hepática de camundongos infectados com *Schistosoma mansoni* na fase crônica da infecção após os tratamentos por histologia;
- e) Avaliar *in vivo*, as alterações tegumentares, do P-MAPA e da silimarina, isolados e combinados, na forma adulta do *Schistosoma mansoni* em comparação ao Praziquantel através de microscopia eletrônica de varredura.
- f) Analisar *in vitro*, as alterações tegumentares, as alterações morfológicas *in vitro* dos vermes adultos tratados e não tratados com P-MAPA e Silimarina, isolados e combinados, na forma adulta do *Schistosoma mansoni* em comparação ao Praziquantel através de microscopia eletrônica de varredura.

3 REFERENCIAL TEÓRICO CONCEITUAL

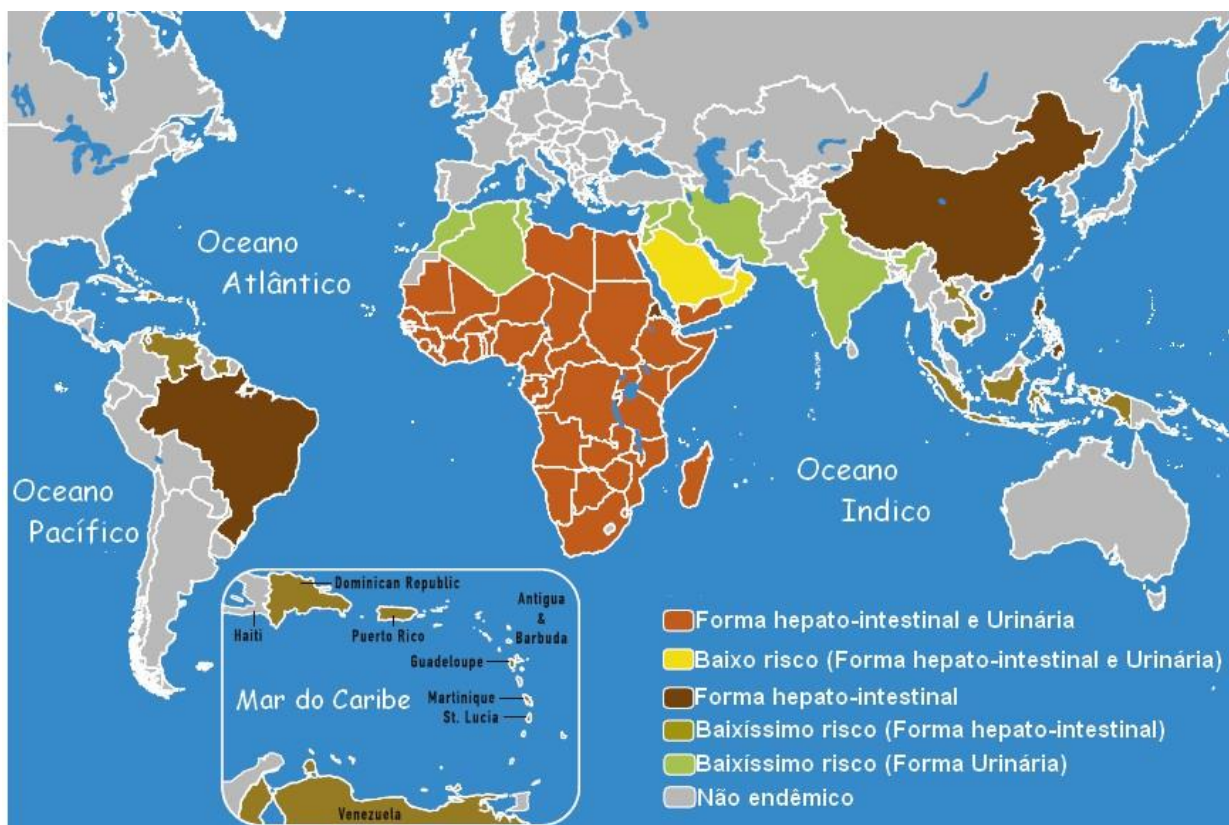
3.1 O *Schistosoma mansoni* E A ESQUISTOSSOMOSE

A esquistossomose é classificada como uma das doenças negligenciadas de maior importância em condição de morbidade e mortalidade, a Esquistossomose é uma velha conhecida de todo o mundo. Encontrada em múmias egípcias e japonesas há milênios antes de Cristo, acredita-se que as esquistossomoses são originárias das bacias dos rios Nilo, na África, e do Yangtze, na Ásia (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1998; BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014; MCMANUS et al., 2018). Seus precursores são o egípcio Theodor Bilharz em 1852, Katsurada em 1904, Sambon em 1907, e Mason e Pirajá da Silva em 1908. Estes, descreveram inicialmente duas espécies: o *S. haematobium* e o *S. mansoni*. Mais recentemente, três outras espécies foram descobertas: o *S. intercalatum* em 1934, o *S. mekongi* em 1978 e o *S. malayensis*, em 1986 (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE; SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, 2014).

Dos seis gêneros descritos que parasitam o homem, o *S. haematobium*, *S. japonicum* e *S. mansoni* são as três principais espécies infectantes, sendo a primeira a principal responsável pela forma urogenital e, as demais, pelas formas hepato-intestinais da doença (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE., 1998; BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE; SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, 2014; LOVERDE, 2019a; MCMANUS et al., 2018)

A esquistossomose difundiu-se pelo mundo à medida que os meios de transporte foram se desenvolvendo e permitindo grandes fluxos migratórios de pessoas. De ocorrência endêmica em mais de 78 países nas regiões tropicais e subtropicais do planeta, com cerca de 230 milhões de pessoas infectadas (COLLEY et al., 2014; LOVERDE, 2019; PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2014; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2020). O *S. mansoni* é o principal responsável por casos na África, Índia e América do Sul (Figura 1) (LOVERDE, 2019; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2020), onde destaca-se a Venezuela, o Suriname e o Brasil (PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2014; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2020).

Figura 1 – Distribuição global da Esquistossomose



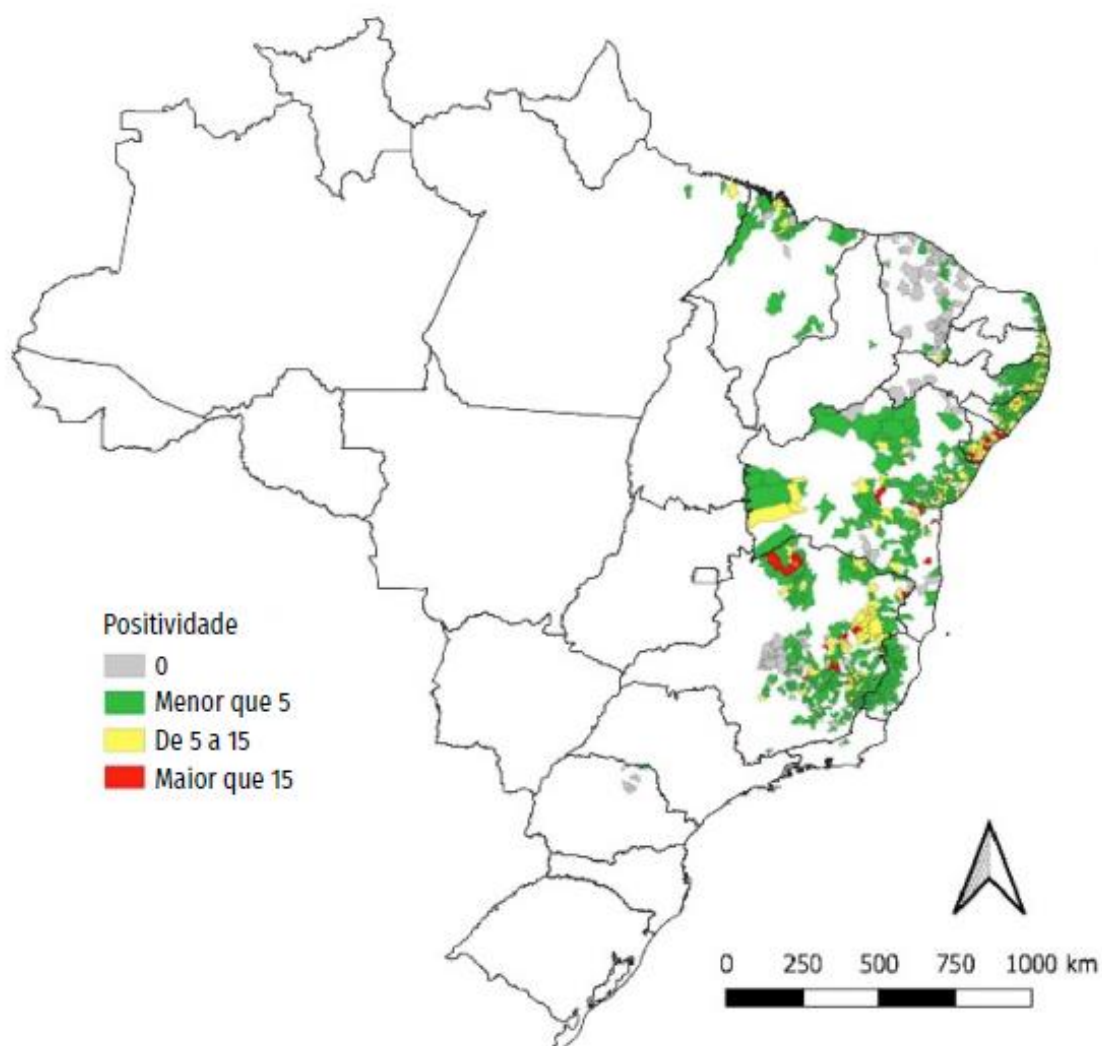
Fonte: Centers for Disease Control and Prevention *apud* BARSOUM, 2014.

No país, acredita-se que a esquistossomose se deu principalmente pelos portos de Recife e Salvador por meio do tráfico de escravos originários da costa ocidental da África para trabalharem nas lavouras de cana-de-açúcar, onde rapidamente a transmissão se expandiu entre os demais estados do Nordeste. Com o passar dos tempos, o conseqüente declínio da produção açucareira e migração das pessoas, foi levada ao Centro Oeste do país e de lá para o Sul e Sudeste. Constituindo, hoje, uma doença de magnitude importante para a saúde pública nacional, especialmente nas regiões Nordeste e Sudeste do País (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE; SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, 2014; DA SILVA et al., 2021; ROCHA et al., 2021).

No Brasil, a esquistossomose é presente em 19 unidades federadas (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE; SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, 2014). Os estados com as taxas de positividade mais elevadas são, respectivamente, os estados de Alagoas, Bahia, Pernambuco, Rio Grande do Norte, Paraíba, Sergipe, Espírito Santo e Minas Gerais nas áreas com população até 500 mil habitantes, de acordo com o Inquérito Nacional de Prevalência da Esquistossomose e das Geo-helmintoses,

realizado no período de 2010 a 2014 (KATZ, 2018). Há registros de casos também nos estados do Pará, Maranhão, Piauí, Ceará, Rio de Janeiro, São Paulo, Santa Catarina, Paraná, Rio Grande do Sul, Goiás e no Distrito Federal. Porém, nestes locais, a transmissão é focal, não atingindo grandes áreas (Figura 2).

Figura 2 – Distribuição da esquistossomose segundo a média do percentual de positividade por município. Brasil, 2009-2020



Fonte: Sistema de Informação do Programa de Controle da Esquistossomose – ISPCE/SVS/MS. *apud* SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2021.

Em Pernambuco, dos 185 municípios existentes foram registrados casos em 102, a maioria localizada nas regiões da Zona da Mata, Agreste e RMR (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011; OLIVEIRA et al., 2018). Novas áreas de transmissão foram encontradas em regiões próximas ao litoral, como Porto de Galinhas

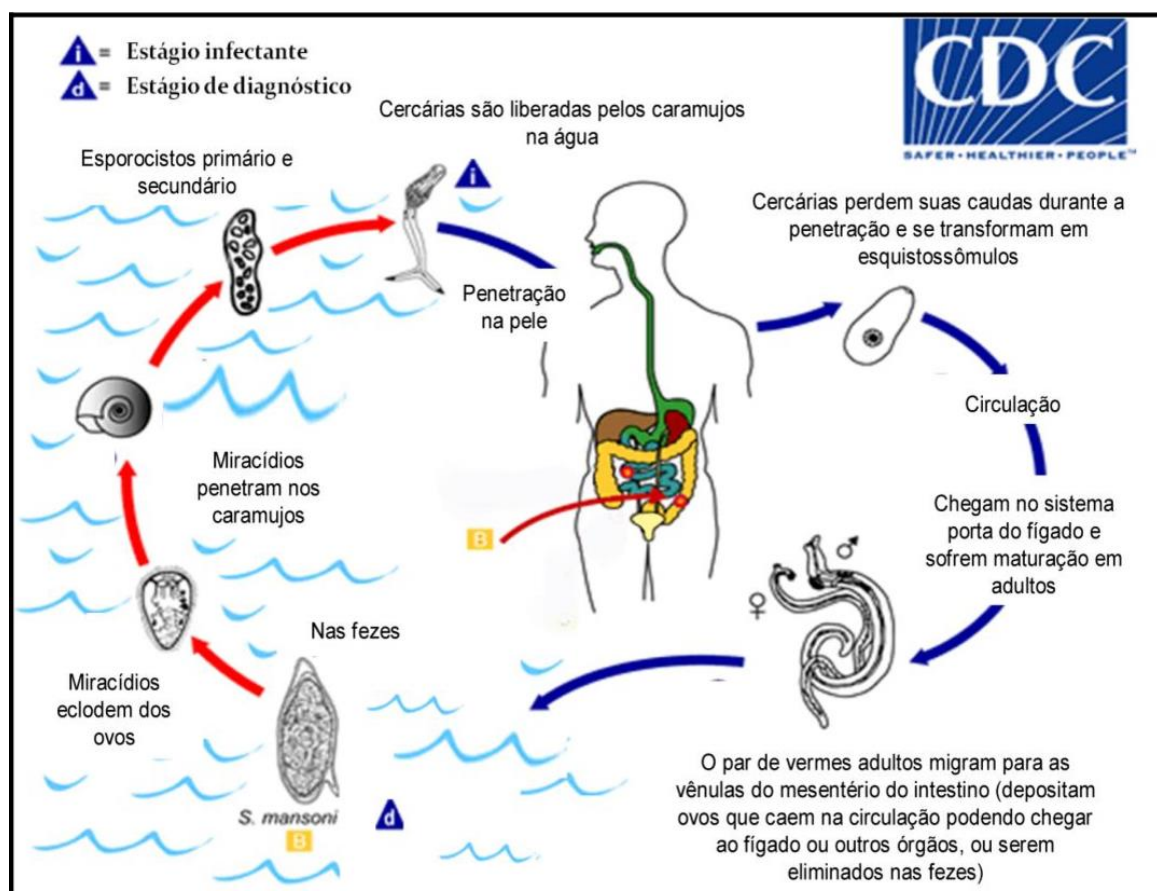
(BARRETO; DE SOUZA GOMES; BARBOSA, 2016), Itamaracá e Serrambi (BARBOSA et al., 2017) demonstrando a expansão da Esquistossomose (PEREIRA et al., 2010).

Tudo isso vêm desafiando os programas de controle da esquistossomose, aumentando os índices de morbimortalidade, reduzindo a expectativa de vida das pessoas e a demanda por uma reorganização dos serviços de saúde para o enfrentamento da doença (GOMES; DOMINGUES; BARBOSA, 2017)

3.2 CICLO BIOLÓGICO E TRANSMISSÃO

O *Schistosoma mansoni* é um verme platelminto com simetria bilateral e corpo achatado, pertencente à classe Trematoda, Digenea, que tem como principais características a presença de ventosas de fixação oral e ventral e corpo não segmentado (MELO; COELHO, 2005). São endoparasitas que se caracterizam por dimorfismo sexual, apresentam um ciclo de vida heteroxênico, tendo o homem como hospedeiro definitivo e um molusco de água doce – caramujo do gênero *Biomphalaria*, como hospedeiro intermediário (BEZERRA, 2005).

A transmissão do *S. mansoni* ocorre mediante liberação das cercárias, a forma infectante para o humano, em coleções hídras de poucas correntezas como córregos, lagoas, lagos e canais de drenagem e de irrigação contendo caramujos infectados (GRYSEELS, 2012). A liberação de cercárias pelo caramujo acontece no horário de maior incidência solar devido à presença de luz e calor, ou seja, entre 11h e 15h (GOMES; DOMINGUES; BARBOSA, 2017) (Figura 3).

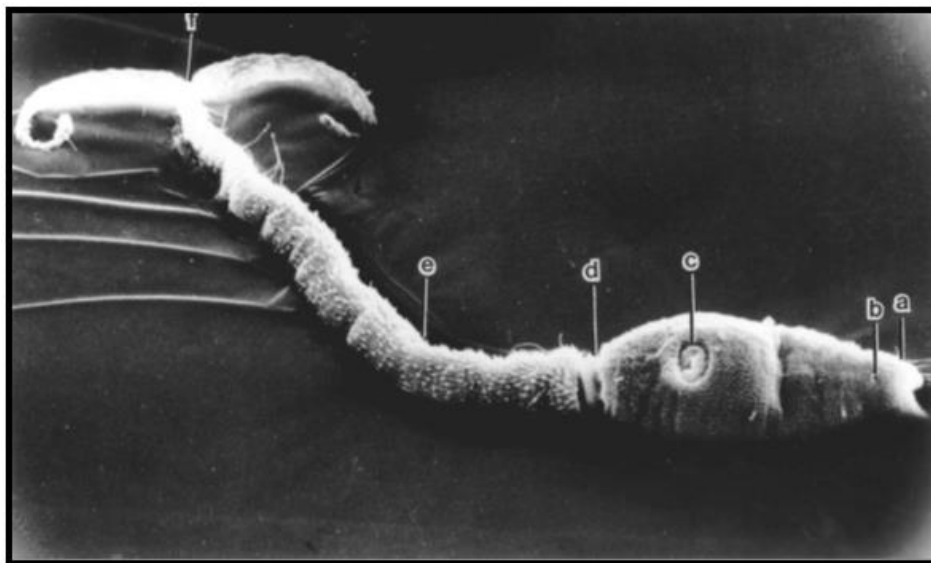
Figura 3 – Ciclo biológico do *S. mansoni* (adaptado CDC)

Fonte: Center for Disease Control and Prevention (2017, tradução de Gomes; Domingues e Barbosa).

As cercárias (Figura 4) possuem cerca de 500 µm de comprimento, uma cauda bifurcada muscular, um corpo ovoide e achatado, e uma cabeça com duas ventosas que facilitarão no momento de fixação ao folículo piloso na pele do hospedeiro (COLLEY et al., 2014b; REY, 2008). Devido à presença e ação das secreções histolíticas liberadas pelas glândulas de penetração, as proteases liberadas lisam a pele e facilitam a penetração do parasito no hospedeiro (REY, 2008; SOUZA et al., 2011). Este processo ocorre em poucos minutos e causa irritação local, chamada de dermatite cercariana (REY, 2008).

As cercárias também penetram através da mucosa bucal em caso de ingestão e desenvolvem-se normalmente. As que chegam ao estômago são destruídas pela ação do suco gástrico (SOUZA et al., 2011).

Figura 4 - Microscopia eletrônica de varredura de cercária de *Schistosoma mansoni*.



Fonte: UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA

Legenda: Cercária de *S. mansoni*. A - Ventosa oral, B - Boca, C - Acetábulo, E - Junção do talo, E – Talo; e F - Bifurcação do talo.

As cercárias perdem a cauda no processo de penetração na pele, tornando-se vermiforme – chamada esquistossômulo. Esta fase representa a fase juvenil do verme adulto (seja macho ou fêmea) e, apesar de não poder mais viver em meio aquático, é capaz de resistir ao poder lítico do soro, capaz de destruir cercárias (REY, 2008). O esquistossômulo migra da epiderme para a circulação venosa, percorre pela circulação pulmonar e sistêmica até chegar ao seu sítio de preferência: o sistema porta intra-hepático. É aqui onde o esquistossômulo se alimenta e se torna verme adulto, seja ele macho ou fêmea (MELO; COELHO, 2005; REY, 2008).

Os vermes adultos são longos, delgados, apresentando na porção anterior duas ventosas (oral e ventral) que funcionam como órgãos de adesão, fixação e nutrição (MELO; COELHO, 2005; REY, 2008). Uma membrana basal forra a face interna da camada sincicial de células anucleadas, enquanto que a camada externa do *Schistosoma* é heptalamelar espessa, o que equivale a uma dupla membrana celular, possuindo 10 nm de espessura. A superfície exterior apresenta uma camada poliônica rica em carboidratos, o glicocálix. Esse revestimento encontra-se em contínuo processo de renovação, pois quando há a descamação da camada superficial, uma nova camada é formada internamente (REY, 2008).

O aparelho digestivo é simples e rudimentar, comunicando-se com o meio exterior exclusivamente através da boca, pois não possui ânus. A excreção é realizada por células especializadas denominadas solenócitos, e os produtos não aproveitáveis

na digestão são eliminados pela boca. Nutrem-se do sangue humano, consumindo em média de 300 mil hemácias por hora e não possuem aparelho circulatório, independentemente do sexo (SOUZA et al., 2011).

O verme macho mede cerca de um centímetro, tem cor esbranquiçada, tegumento recoberto por tubérculos grosseiros, e duas ventosas: uma oral e o acetábulo. O aparelho genital masculino compreende 6 a 8 massas testiculares pequenas, situadas dorsalmente, no início do segmento posterior - de onde parte o canal ginecóforo. De cada testículo parte um canal eferente, em conexão com o deferente único que se dilata para constituir um reservatório, a vesícula seminal, antes de se abrir para o exterior através de um poro genital situado no início do canal ginecóforo. Este canal é constituído por uma fenda formada a partir da dobra lateral do corpo no sentido longitudinal que tem a finalidade de albergar a fêmea e fecundá-la exatamente através da passagem dos espermatozóides pelos canais deferentes (MELO; COELHO, 2005; REY, 2008).

Por sua vez, a fêmea tem corpo cilíndrico, mede 1,5 cm e apresenta coloração mais escura devido ao ceco com sangue semidigerido e tegumento mais liso e com menos tubérculos do que o do macho (MELO; COELHO, 2005; REY, 2008). Elas também são mais finas, o que facilita o acasalamento e a oviposição nos capilares da parede intestinal (MELO; COELHO, 2005). As duas ventosas são pequenas, estando a ventosa acetabular muito perto da oral. O ovário é oblongo, ligeiramente lobado, e fica na porção anterior do corpo. Um oviduto curto conduz ao oótipo, que se continua com o tubo uterino com poucos ovos em trânsito, cerca de um ou dois. O poro genital feminino abre-se ventralmente para que os ovos saiam e a cópula aconteça quando o macho liberar os espermatozoides no canal quando acasalados (Figura 5) (REY, 2008).

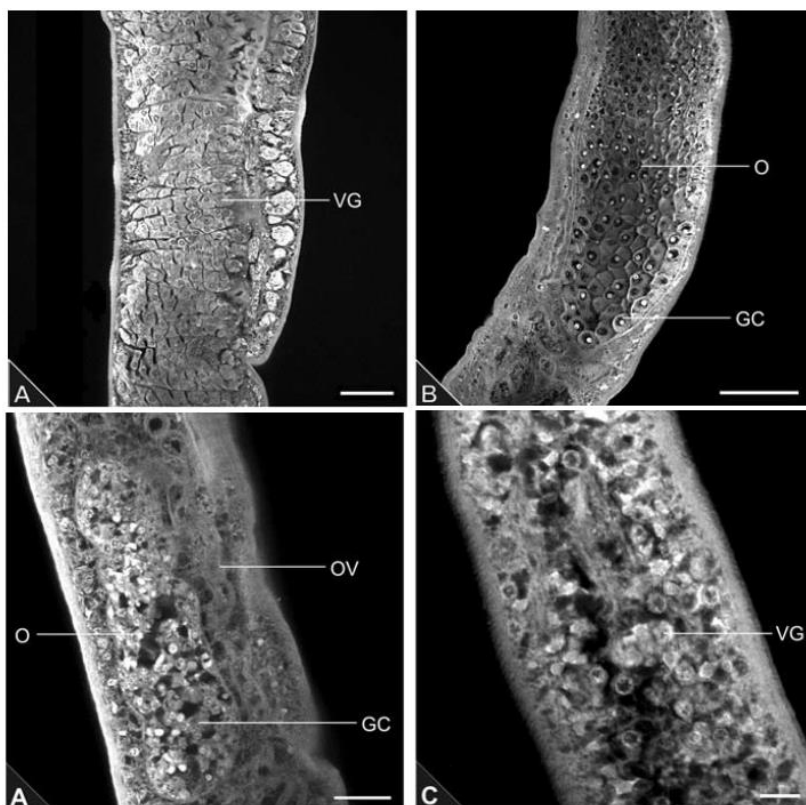
Figura 5 - Macho e fêmea de *S. mansoni* acasalados



Fonte: Gomes; Domingues e Barbosa (2017) *apud* <https://br.pinterest.com/pin/47780446020113040>.

Há também casos de infecções unissexuais. Quando há apenas com fêmeas, estas permanecem juvenis e atroficas, no interior do sistema porta intra-hepático e não seguem para o sistema porta-hepático (GOMES; DOMINGUES; BARBOSA, 2017) (Figura 6).

Figura 6 - Imagens de microscópio confocal a laser de fêmeas de *S. mansoni*

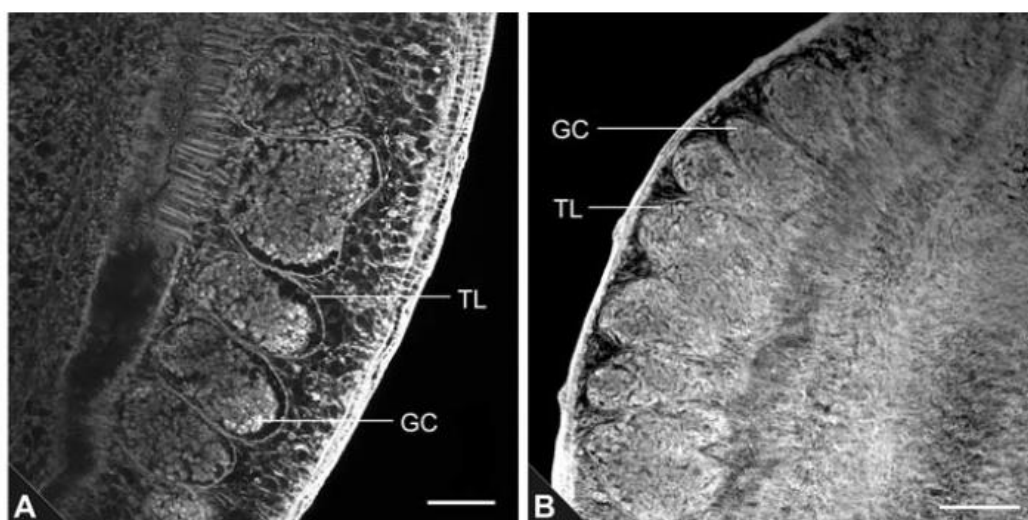


Fonte: Adaptado de Neves *et al.* (2005).

Legenda: Comparação do tecido do aparelho reprodutor do verme fêmea em infecção mistas (A e B), bar 50 µm e em unissexual (A e C) bar 25 µm e 10 µm. Glândula vitelina (VG), Ovário (O), células germinativas (GC), oviduto (OV).

Nas infecções unissexuais com machos apenas, áreas livres ao redor das células dos lobos testiculares puderam ser visualizadas (Figura 7) (MELO; COELHO, 2005). Observa-se, também, certa proporção deles com caracteres hermafroditos, variando o grau de desenvolvimento do aparelho genital feminino (REY, 2008). Em outros casos, houve acasalamento entre machos e, os que estavam albergados no canal, eram menores e com menos lobos testiculares (MELO; COELHO, 2005).

Figura 7 - Imagens de microscópio confocal de varredura a laser de machos *S. mansoni*



Fonte: Neves et al. (2005).

Legenda: Comparação tecidual do aparelho reprodutor do verme macho em infecção unissexual (A) ou mistas (B). Lobo testicular (TL) e células germinativas (GC), bar 25 µm.

Uma vez acasalados na circulação de indivíduos infectados (Figura 5), os vermes migram contra a corrente sanguínea para as veias mesentéricas inferiores, onde liberam seus ovos imaturos nos capilares venosos que irrigam o intestino (MELO; COELHO, 2005; SOUZA et al., 2011). Uma fêmea libera de 300 a 400 ovos por dia nas paredes de capilares e vênulas, a depender da idade de cada fêmea, e esses ovos podem tanto chegar na corrente sanguínea, como ficar na luz intestinal. Os ovos (Figura 8) colocados nos tecidos levam cerca de uma semana para tomarem-se maduros (miracídio formado) para, a partir daí, seguirem da mucosa para à luz intestinal e então serem eliminados nas fezes do hospedeiro definitivo, dando início a um novo ciclo de transmissão (MELO; COELHO, 2005).

Figura 8 - Ovo de *S. mansoni* maduro com miracídio em seu interior



Fonte: Gomes; Domingues e Barbosa (2017) *apud* José Roberto Machado e Silva – UERJ, Renata Heisler Neves e Delir Corrêa Gomes – IOC (2008).

O miracídio (que é a forma embrionária do *S. mansoni*) apresenta um formato cilíndrico, superfície ciliada e na extremidade anterior encontra-se o terebratorium (papila apical que pode se amoldar como uma ventosa), onde podem ser encontradas glândulas adesivas e de penetração que, ao liberar enzimas digestivas, auxiliam na fixação e penetração do miracídio no tegumento do molusco vetor (Figura 9). Ao penetrar no caramujo, o miracídio perde seu revestimento ciliado e se transforma numa estrutura sacular denominada esporocisto. Após seguidas multiplicações e transformações, ocorre a migração para as glândulas digestivas ou para o hepatopâncreas do molusco, onde as células germinativas se diferenciarão em cercárias. Ao ser eliminado no ovo nas fezes, eclode do ovo quando em contato com água, podendo gerar até 300 mil cercárias do mesmo sexo. Vale ressaltar que o caramujo uma vez infectado, mantém-se infectado e produzindo cercárias ao longo de sua vida pois as células germinativas darão origem a novos esporocistos que iniciam novamente o processo de multiplicação celular (MELO; COELHO, 2005; SOUZA et al., 2011).

Figura 9 - Miracídio de *S. mansoni*



Fonte: Gomes; Domingues e Barbosa (2017) apud http://www.isradiology.org/tropical_diseases/tmcr/chapter2/epidemiology3.htm.

Caso os ovos não consigam atingir a luz intestinal, haverá a morte dos miracídios e estes ovos poderão ficar presos na mucosa intestinal ou serem arrastados para o fígado (MELO; COELHO, 2005). Vale ressaltar que os ovos são muito sensíveis às variações de temperatura, à água salgada e à urina, por exemplo. Assim, em precárias condições ambientais, o ovo não eclode e o miracídio morre rapidamente.

3.3 IMUNOPATOGENESE

Repostas imunológicas causadas pela infecção pelo *S. mansoni* dependem basicamente da interação humano-helminto e podem ser detectadas bem no início da infecção, antes mesmo dos sintomas. Em relação a infecções causadas por helmintos, fatores como cepa, fase evolutiva, intensidade e número de infecções são questões primordiais para evolução da doença. Já com relação ao hospedeiro, constituição genômica, órgão predominantemente lesado, padrão alimentar, etnia, tratamento realizado, infecções associadas e, sobretudo, o perfil imunitário antes, durante e após a infecção são os fatores determinantes no processo de evolução das formas anatomoclínicas da doença (SOUZA et al., 2011).

Algumas horas após a penetração das cercarias, ainda durante o processo reativo inflamatório da dermatite cercariana, já há ação das células mononucleares e polimorfonucleares causando a destruição de cercarias e esquistossômulos a nível local. Esse processo apresenta-se clinicamente como um exantema maculopapular pruriginoso e é considerada a primeira defesa contra a infecção ao *Schistosoma*. Na continuação do processo de infecção, quando há a passagem pela epiderme e derme, uma reação de hipersensibilidade do tipo imediata ocorre e ativa vários componentes da resposta imune inata. Em poucos dias, um infiltrado de polimorfonucleares, mononucleares e células de Langerhans, além de produção local de quimiocinas e citocinas, que seguem com um influxo de linfócitos pró-inflamatórios T CD4+ e produção de IL-12p40, IFN- γ (gama interferon) e IL-4. Nesta fase, a resposta imunológica dominante é a do tipo T helper 1 (Th1) (LOVERDE, 2019a; SOUZA et al., 2011).

Nas múltiplas semanas seguintes, a medida que os esquistossômulos migram, passam por outros órgãos, maturam, acasalam e, principalmente, começam a ovipor nas vênulas do mesentério; há uma intensa liberação de antígenos e há, também, alterações a níveis bioquímicos que conferem a ele um escape contra o sistema imune do hospedeiro em cada fase de maturação. Então, a resposta Th1 diminui e entra em ação a resposta do tipo Th2 e início dos sintomas clínicos característicos da esquistossomose aguda dividindo-se em duas fases: pré-patente (antes da oviposição) e pós-patente (após início da oviposição) (LOVERDE, 2019; SOUZA et al., 2011).

Na fase pré-patente, as manifestações clínicas características da fase aguda são causadas tipicamente pelos grandes níveis circulatórios de fator de necrose tumoral (TNF) e de interleucinas 2 e 6, característicos da resposta Th1. Acredita-se que essa resposta imune seja a responsável pelas lesões teciduais e manifestações clínicas características da fase aguda exatamente por ser um processo inflamatório exacerbado. Outro fator importante sobre a citotoxicidade celular, é o evento chamado de citotoxicidade celular dependente de anticorpos (ADCC), que possui ação efetora apenas sobre esquistossômulos, mas aparentemente é inofensiva para os helmintos adultos (LOVERDE, 2019; SOUZA et al., 2011).

Com o início da oviposição e da fase pós-patente, o principal evento da esquistossomose se inicia com a intensa liberação de antígenos solúveis do ovo. A formação do granuloma hepático e a fibrose hepática peri-portal é iniciada pela mobilização de macrófagos, eosinófilos, linfócitos, plasmócitos, TNF, e células CD4+ Th1; evoluindo para o perfil CD4+ Th2 com a produção das citocinas IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13 bem como linfócitos T CD8+. Essa intensa resposta inflamatória é causada pelos ovos que não atingem a luz do intestino e ficam retidos nos sinusoides hepáticos liberando antígenos pró-inflamatórios (LOVERDE, 2019; SOUZA et al., 2011).

A fibrose é formada pela ação dos macrófagos em contato com o ovo, formando massas sinciciais multinucleadas onde algumas destas células transformam-se em fibroblastos que, por sua vez, orientam a organização de camadas concêntricas em toda a espessura do granuloma, causando uma intensa produção de colágeno. Esta desorganização da arquitetura tecidual leva ao processo de hipertensão portal. E, em casos mais avançados, leva a chamada fibrose de Symmers (LOVERDE, 2019; SOUZA et al., 2011).

Outros órgãos podem ser acometidos pela esquistossomose mansônica, seja de forma definitiva com formação de granulomas por depósito de ovos, seja de forma transitória com a passagem dos esquistossômulos. Pulmões, baço, pâncreas, bexiga, rins e sistema nervoso podem afetados causando a chamada esquistossomose ectópica (LOVERDE, 2019; SOUZA et al., 2011).

O *S. mansoni* pode ser considerado um helminto extremamente adaptado ao ser humano pois, evolutivamente, desenvolveu distintos mecanismos de escape ao sistema imune. Seja com a capacidade de aderir antígenos do hospedeiro à sua própria membrana plasmática dificultando seu reconhecimento como corpo estranho; seja substituindo as porções mais exteriores do tegumento por novas camadas de

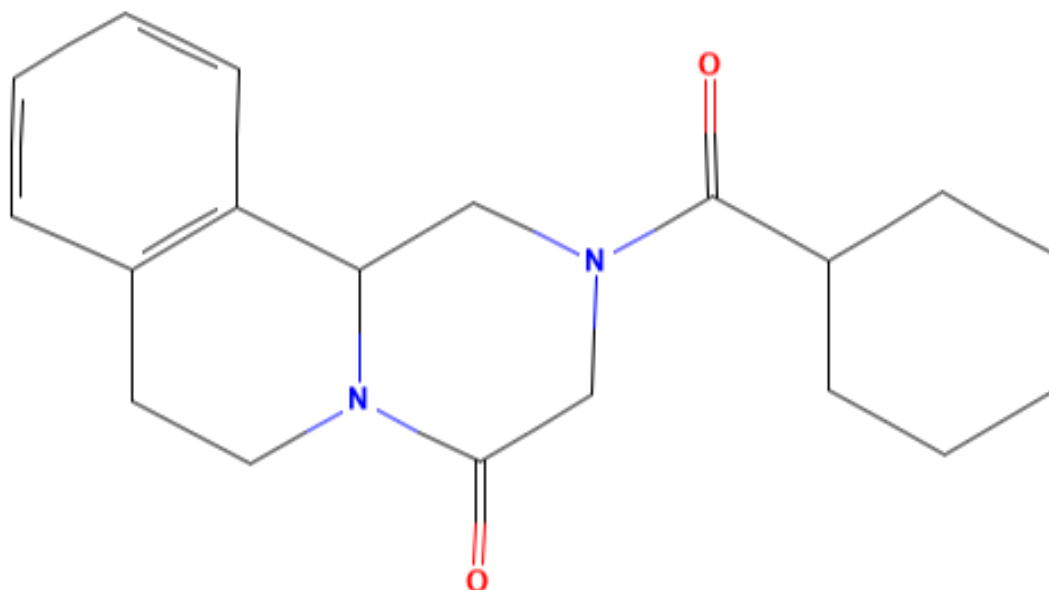
membrana celular, bem como a produção de interleucinas, protease e enzimas que clivam imunoglobulinas e inativam macrófagos, há um retardamento do processo de reconhecimento do helminto e conseqüente atraso no processo de resposta imunológica (LOVERDE, 2019; SOUZA et al., 2011).

3.4 PRAZQUANTEL (PZQ)

O Praziquantel (2-ciclohexilcarbonil-1,2,3,6,7,11b-hexahidro4H-pirazino{2,1-a}isoquinolina-4-ona) é um derivado pirazinoisoquinolina descoberto em conjunto por Merck e Bayer em 1972 (ANDREWS et al., 1983; NOVAES; DE SOUZA; DE ARAÚJO, 1999). É um pó cristalino esbranquiçado, de forte sabor amargo, com ponto de fusão entre 136° C a 140° C com decomposição química (ANDREWS et al., 1983) e fórmula molecular C₁₉-H₂₄-N₂-O₂ (BETHESDA (MD): NATIONAL INSTITUTE OF DIABETES AND DIGESTIVE AND KIDNEY DISEASES, 2020). É estável em condições normais de temperatura e pressão, praticamente insolúvel em água, pouco solúvel em etanol e solúvel em solventes orgânicos como clorofórmio e dimetilsulfóxido (DMSO) (CIOLI; PICA-MATTOCCIA, 2003). Tornou-se o tratamento de escolha para Esquistossomose devido eficácia contra as espécies de *Schistosoma*, por possuir menor custo e menor toxicidade em relação aos outros compostos (ANDREWS et al., 1983; NOVAES; DE SOUZA; DE ARAÚJO, 1999).

O PZQ (Figura 10) tem sido estudado experimentalmente em animais desde 1975, mostrando-se altamente eficaz contra infestações de várias espécies de trematódeos e cestódeos, principalmente: *S. mansoni*, *S. haematobium*, *S. japonicum*, *S. intercalatum*, *S. matheei*, *S. bovis*, *Taenia solium*, *Taenia saginata*, *Hymenolepis nana*, *Hymenolepis diminuta* e *Diphyllobothrium latum*, *Cysticercus bovis* e *Cysticercus cellulosae*, *Echinochasmus fujianensis*, *Opisthorchis viverrini*, atuando contra os vermes maduros, imaturos e na fase larval dos cestódeos (NOVAES; DE SOUZA; DE ARAÚJO, 1999). Nos trematódeos, atua na fase de verme adulto (VALE et al., 2017), e é a droga de escolha da Organização Mundial da Saúde no tratamento da Esquistossomose. No Brasil, é a única droga de escolha para uso desde 1996 (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE; SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, 2014).

Figura 10 – Fórmula Estrutural do Praziquantel



Fonte: *LiverTox: Clinical and Research Information on Drug-Induced Liver Injury* (2022).

Acredita-se que a ação anti-helmíntica do PZQ se deva a um conjunto de ações chefiado pela sua capacidade de desregulação da bomba de sódio-potássio presente nas células do tegumento do helminto. Ao inibir a bomba, o PZQ aumenta a permeabilidade da membrana do helminto a determinados íons, principalmente ao íon de cálcio, o que leva a um aumento da atividade muscular, seguida por contração, paralisia espasmódica e vacuolização do tegumento. Como consequência, vários processos vitais são interrompidos como a absorção de nutrientes, secreção de metabólitos, equilíbrio osmótico e defesa contra parasitas do sistema imune do hospedeiro (MATOS-ROCHA et al., 2016). Por fim, os vermes acabam se soltando dos tecidos do hospedeiro e são rapidamente deslocados das veias mesentéricas para o fígado, enquanto os helmintos intestinais são expelidos (CIOLI; PICA-MATTOCCIA, 2003; NOVAES; DE SOUZA; DE ARAÚJO, 1999).

As reações adversas causadas pela toxicidade do PZQ podem ser consideradas leves e transitórias, quando ocorrem (VALE et al., 2017). Contudo, há também registros de casos de reações adversas mais severas que vão de náuseas, vômitos, desconforto abdominal, anorexia e diarreia; há casos de cefaleias, tonturas e sonolência e em alguns casos, erupções cutâneas e urticárias, associadas a um quadro de febre e fadiga intensa (DA SILVA et al., 2017). Essas reações podem

acontecer porque as doses de PZQ administradas nos pacientes são doses elevadas, pois aproximadamente 80% do PZQ é eliminado na urina no fenômeno de primeira passagem no fígado (MCMANUS et al., 2018). Com isso, doses de tratamento elevadas são necessárias para garantir uma quantidade mínima de droga no sistema do paciente para que um tratamento eficaz aconteça, dessa forma aumentam-se os riscos de toxicidade colateral. A frequência e a intensidade desses efeitos, como diarreia sanguinolenta, estão relacionadas com os metabólitos liberados pela morte dos vermes (VALE et al., 2017).

Outro grande problema é o relato do aparecimento de cepas refratárias ao tratamento com PZQ. Há registro de casos de resistência datados dos anos 1990 (COELI et al., 2013; FALLON, 1998; MWANGI et al., 2014; SANCHEZ et al., 2019), quando em tratamento com sete doses do PZQ a 300mg/kg houve sobrevivência de mais de 90% dos vermes adultos no modelo murino (FALLON, 1998). No Brasil não há casos de resistência confirmados, no entanto, existe a necessidade de uma atenção diferenciada aos casos dos pacientes que tenham sido tratados múltiplas vezes e permanecem com infecção recorrente não apresentando cura (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE; SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, 2014; COELI et al., 2013; MWANGI et al., 2014). Além das cepas refratárias, há estudos que dissertam sobre a ineficácia da ação do PZQ em formas juvenis do *S. mansoni* (KASINATHAN; MORGAN; GREENBERG, 2010; MATOS-ROCHA et al., 2016; SANCHEZ et al., 2017). Dessa forma, há uma demanda iminente e uma necessidade urgente de que outras substâncias sejam estudadas, a fim de que não ocorra um atraso no tratamento.

3.5 P-MAPA

P-MAPA é a sigla para *Protein aggregate magnesium-ammonium phospholinoleate-palmitoleate anhydride immunomodulator*, ou seja, anidrido polimérico de fosfolinoleato de magnésio e amônio e proteína (FARMABRASILIS, 2006a, 2008). Consiste em um biopolímero com aplicações farmacológicas produzido por fermentação pelo fungo *Aspergillus oryzae* (Figura 11) e considerado um dos produtos mais avançados e versáteis na sua categoria farmacêutica (FARMABRASILIS, 2006a).

É uma molécula original de pesquisa da Farmabrilis, uma organização brasileira, não-governamental sem fins lucrativos, com a missão de desenvolver medicamentos e tecnologias em benefício de populações afetadas por doenças negligenciadas (FARMABRASILIS, 2006b).

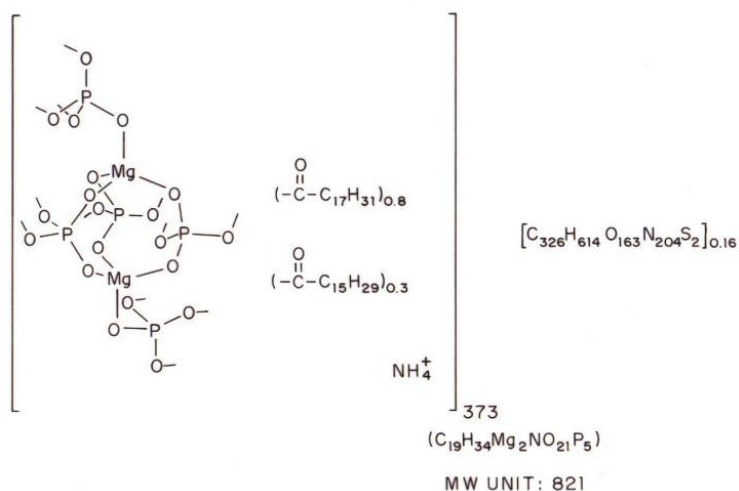
Figura 11 – Placa de semeio com *Aspergillus oryzae*



Fonte: <https://br.depositphotos.com/446507982/stock-photo-close-aspergillus-oryzae-filamentous-fungus.html> (2022)

Os principais componentes do P-MAPA consistem em diversos aminoácidos, fosfatos, magnésio, lipídeos, amônios, ácidos linoleico e palmítoleico e proteínas. A fórmula empírica é $C_{326}H_{614}O_{163}N_{204}S_2$ (Figura 12) (FARMABRASILIS, 2006a).

Figura 12 – Fórmula Estrutural Proposta do P-MAPA



Fonte: FARMABRASILIS (2008).

O P-MAPA demonstrou possuir valiosas propriedades biológicas quando utilizado em sistemas celulares, modelos animais e em estudos preliminares com seres humanos acometidos por vários processos patológicos (FARMABRASILIS, 2006a).

O mecanismo de ação proposto do P-MAPA conhecido até o momento sobre os componentes do sistema imunológico incluem a estimulação de receptores celulares do tipo *toll-like* (TLR-2 e TLR-4) a estimulação da produção de Linfócitos T, o estímulo à produção de citocinas, principalmente da Interleucina-2 (IL-2) e do Interferon-gama ocasionando o aumento da atividade das células NK (natural killer), e finalmente estimulando a produção e liberação de NO por macrófagos (DURÁN et al., 2009; FÁVARO et al., 2012).

Isto sugere que a atuação do P-MAPA possivelmente está relacionada a mecanismos imunoterapêuticos, uma vez que o IFN-gama, por exemplo, uma das citocinas cuja produção é estimulada pelo composto, sabidamente exerce atividades imunoregulatórias, antivirais e antitumorais. As células NK e os linfócitos T, que também se mostraram estimulados pelo P-MAPA nos experimentos com o produto utilizando modelos animais, são elementos do sistema imune com capacidade de destruir células cancerosas ou infectadas por vírus atuando diretamente sobre as mesmas (DURÁN et al., 2009; FÁVARO et al., 2012; KAWARABAYASHI et al., 2000; PAWLOTSKY; MCHUTCHISON, 2004).

Em modelos animais para estudo de câncer, o P-MAPA demonstrou tanto capacidade de melhorar o estado de imunossupressão induzido pelo processo tumoral, como também de promover melhora histológica. Desta forma, há um efeito significativo no impacto terapêutico na doença primária ou nos processos metastáticos (FÁVARO et al., 2022; GONÇALVES et al., 2020; KAWARABAYASHI et al., 2000; PAWLOTSKY; MCHUTCHISON, 2004).

A reversão da depressão imune, associada a utilização do P-MAPA também foi observada em modelos experimentais para doenças infecciosas, resultando em proteção do hospedeiro e ainda em elevadas taxas de sobrevivência dos animais, mesmo naqueles infectados experimentalmente com doses letais de agentes infecciosos (DURÁN et al., 2009; FÁVARO et al., 2012; SILVA et al., 2021).

Os estudos com o P-MAPA ocorrem há mais de uma década e já comprovou sua eficácia em doenças como Leishmaniose canina (MELO et al., 2014; SANTIAGO et al., 2013), Punta Toro vírus (DURÁN et al., 2009), câncer de ovário (DE ALMEIDA

CHUFFA et al., 2018; LUPI JÚNIOR et al., 2019; LUPI et al., 2020), câncer de bexiga (DE ALMEIDA CHUFFA et al., 2018; FÁVARO et al., 2022; GARCIA et al., 2015), e tuberculose (FÁVARO et al., 2012). Recentemente, já iniciou estudos com Esquistossomose (SILVA et al., 2021), Zika Vírus (LIMA et al., 2021), e em estudos de imunologia usando modelos de sangue total (GONÇALVES et al., 2020). Todos esses elementos tomados em conjunto, indicam que os efeitos do P-MAPA podem ser claramente relacionados a mecanismos imunoterapêuticos.

Em 2020, o P-MAPA recebeu o termo de '*orphan drug*' pela agência de alimentos e medicamentos dos Estados Unidos (FDA), com base em estudos de caracterização da ação *in vitro* e *in vivo* (FARMABRASILIS et al., 2020; SILVA et al., 2021; SILVA; LOPES; CARVALHO, 2020). Este termo designa as drogas indicadas para o tratamento de doenças raras, que possuem baixa frequência ou negligenciadas. O P-MAPA é o primeiro medicamento totalmente brasileiro a obter este título (FARMABRASILIS et al., 2020; SILVA; LOPES; CARVALHO, 2020).

O estudo publicado em 2021, por Silva e colaboradores, abordou a Esquistossomose em modelo murino por infecção experimental, com tratamento em três doses distintas do P-MAPA (5, 50, e 100 µg/mL). *In vivo*, o P-MAPA reduziu o número de ovos no fígado e no intestino. Além disso, os granulomas foram reduzidos, e houve um aumento no número de ovos mortos e uma redução dos níveis séricos de aspartato aminotransferase também. Esses dados sugeriram que a atividade do P-MAPA ajudou a melhorar o tratamento da esquistossomose e a qualidade de vida dos pacientes (SILVA et al., 2021).

3.6 SILIMARINA (SILI)

É o nome genérico de um extrato lipofílico isolado de um grupo de compostos naturais (silibina, silidianina e silicristina) extraída do fruto da planta medicinal *Carduus marianus* (PHARMANOSTRA, [s.d.]) ou *Silybum marianum* pertencente à família Asteraceae/Compositaceae, nativa do Mediterrâneo (MATA-SANTOS, 2010). Foi descrita por Lineu e Gaertn., e publicada em *De Fructibus et Seminibus Plantarum 2* em 1791 (THE PLANT LIST, 2010). Popularmente é conhecido no Brasil como Cardo-mariano, Cardo-de-leite, Cardo-leiteiro, Cardo-branco, Cardo-de-Santa-Maria, Cardo-de-Nossa-Senhora e Cardo-Santo (OFICINA DE ERVAS, 2022).

As plantas medicinais são utilizadas desde as mais antigas civilizações. Os conhecimentos empíricos de suas atividades foram transmitidos para grupos étnicos de acordo com a própria necessidade humana. Com o desenvolvimento da ciência e da tecnologia, as plantas medicinais tornaram-se objetos de análise. Utilizada há mais de 2.000 anos, sua primeira aplicabilidade foi tratar de disfunção hepática.

O *Silybum marianum* é citado como um dos medicamentos mais antigos, sendo utilizado para o tratamento de veneno de cobra. Posteriormente, foi descrito como sendo excelente para problemas hepáticos e biliares, incluindo colestase, icterícia, cirrose, lesão hepática induzida por toxinas, hepatopatia alcoólica, hepatite viral aguda e crônica, transtornos dispépticos: úlceras gástricas e duodenais, distúrbios gastrintestinais, neoplasias primárias ou como terapia de suporte para doenças inflamatórias crônicas, além de doenças de pele, peritonite, hemorragia, bronquite, e varizes (GAZÁK; WALTEROVÁ; KEN, 2007; LADAS; KROLL; KELLY, 2004; LINO, 2012; MITCHELL, 2014; PHARMANOSTRA, [s.d.]; ŠIMÁNEK et al., 2000).

Faz parte da Medicina Tradicional Chinesa. Encontrada na Europa, Estados Unidos, América do Sul e Ásia. Tradicionalmente, as folhas têm sido usadas em saladas e o fruto torrado utilizado como substituto do café (AVELAR, 2016).

O extrato das sementes maduras e folhas contém 70 a 80% de silimarina, uma mistura de flavanolignanas¹, da qual a silibinina é o constituinte mais biologicamente ativo. A silibina está presente no composto da Silimarina em 30,1%, e é uma mistura de dois diastereoisômeros² (silibina A e silibina B) (Figura 13) em proporção de aproximadamente 1:1. Os outros compostos são a isosilibina (isosilibina A e isosilibina B) em 9,1%, a silicristina (e a isosilicristina) em 12% e a silidianina com 14,9%. Há também um pouco do flavonóide³ taxifolina. Os outros 20 a 30% do composto Silimarina são polímeros e polifenóis oxidados com uma variedade de efeitos regulatórios metabólicos (LADAS; KROLL; KELLY, 2004; LUPER, 1998; ŠIMÁNEK et

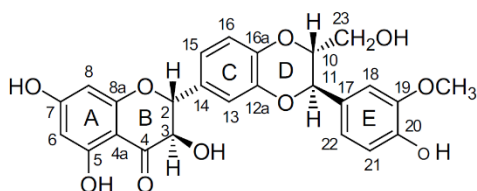
¹ São parte de outras estruturas que contenham flavonoides (BEHLING et al., 2004).

² São isômeros cujos ligantes mudam de posição no espaço, mas permanecem ligados aos mesmos átomos; que não são imagens especulares entre si.

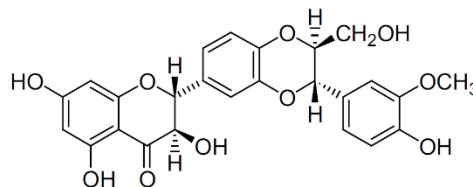
³ São compostos bioativos com propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias.

al., 2000b). As sementes do *S. marianum* também contêm ácidos graxos essenciais e betaína, um comprovado hepatoprotetor (LUPER, 1998).

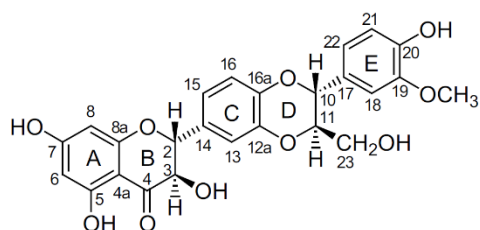
Figura 13 – Estruturas de silibinas e isossilibinas



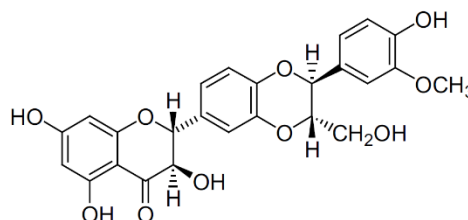
Silibina A



Silibina B



Isosilibina A



Isosilibina B

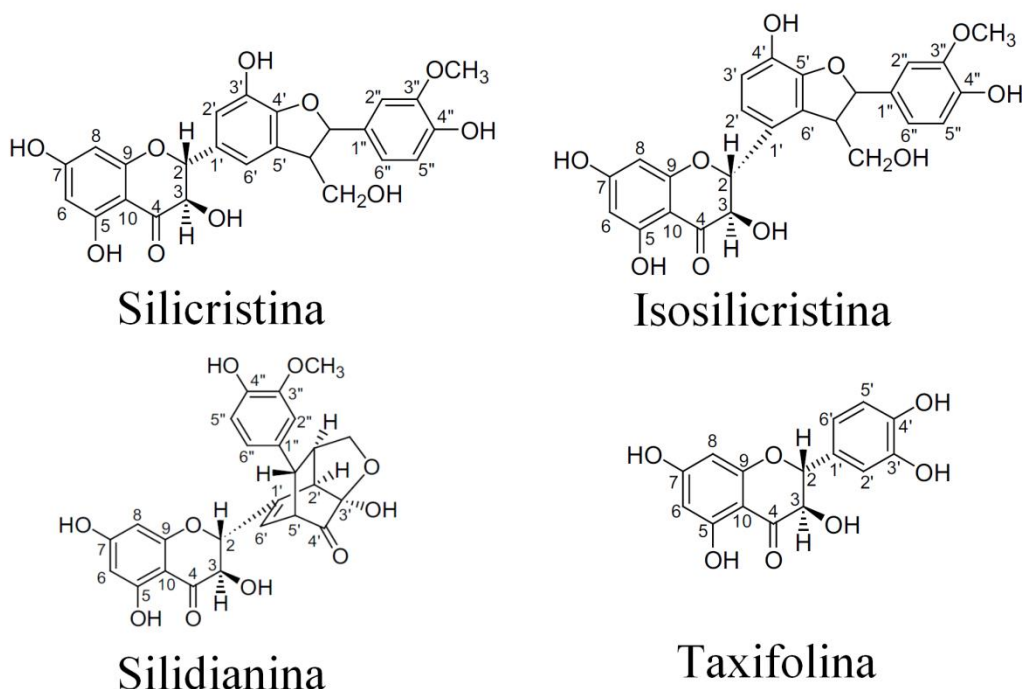
Fonte: Traduzido de LADAS; KROLL; KELLY, 2004 apud KIM et al., 2003.

Legenda: Estruturas de silibinas e isossilibinas. O flavanolignano primário presente na silimarina é a silibinina, uma mistura diastereomérica 1:1 de silibina A e silibina B. A isosilibina é uma mistura diastereomérica 1:1 de isosilibina A e isosilibina B, cada uma das quais difere de sua silibina correspondente apenas na troca de substituintes nas posições C-10 e C-11 (LADAS; KROLL; KELLY, 2004 apud KIM et al., 2003).

Silicristina, isosilicristina e silidianina (Figura 14) compartilham a mesma fórmula química e o mesmo peso molecular (482) das silibinas e isossilibinas. Apesar dessa semelhança, a silidianina é a mais potente eliminadora de radicais livres de todo o composto (LADAS; KROLL; KELLY, 2004; ŠIMÁNEK et al., 2000). Enquanto que a silibina em conjunto com a silicristina melhoram a atividade metabólica das células renais (ŠIMÁNEK et al., 2000).

Na última década, a silimarina vem sendo utilizada como controle positivo de função hepatoprotetora em estudos de avaliação de novos fármacos (CHANNABASAVARAJ; BADAMI; BHOJRAJ, 2008; MATA-SANTOS, 2010).

Figura 14 – Estruturas da silicristina, isosilicristina, silidianina e taxifolina



Fonte: Traduzido de LADAS; KROLL; KELLY, 2004 apud KIM et al., 2003.

Legenda: Estruturas de silicristina, isosilicristina, silidianina e taxifolina. As três flavonolignanas e o flavonóide, taxifolina, estão presentes apenas na silimarina. A silicristina, isosilicristina e silidianina compartilham a mesma fórmula química e peso de fórmula (482) que as silibinas e isosilibinas (LADAS; KROLL; KELLY, 2004 apud KIM et al., 2003).

A silimarina tem diversas aplicações descritas na literatura: hepatoprotetora, antioxidante, antiinflamatória e regenerativa, estabilizadora de membrana e reguladora da permeabilidade celular, citoprotetora, reguladora metabólica, bem como colagoga e colerética. Inclusive é eficaz em infecções experimentais com *Schistosoma mansoni* (AVELAR, 2016; LADAS; KROLL; KELLY, 2004b; LINO, 2012a; PHARMANOSTRA, [s.d.]

Também é sabido que o complexo de silimarina frequentemente se comporta de maneira diferente no organismo, baseado na composição individual do complexo utilizado. Isso também influencia nas variações de biodisponibilidade (ŠIMÁNEK et al., 2000b). Estudos sugerem que a silibinina é absorvida diretamente pela via portal do trato intestinal. Em seguida, sofre extenso metabolismo hepático, conforme evidenciado pela presença de conjugados de sulfato e/ou glicuronídeos no sangue. Uma vez no fígado, a silibinina pode ser embalada em micelas lipídicas e transportada para tecidos extra-hepáticos. Esta hipótese foi levantada após a observação de silibinina radiomarcada em micelas ter suas quantidades crescentes de acordo com

lipolificidade em tecidos com maiores concentrações em triglicerídeos e lipoproteínas de densidades muito baixas. Aproximadamente 80% da silibinina é excretada na bile, com apenas 3% excretada na urina, (LADAS; KROLL; KELLY, 2004) caracterizando sua ação hepática.

A silimarina interage diretamente com a fração lipídica, mantendo a fluidez característica e protegendo a integridade e a função hepática da membrana celular. Sua ação hepatoprotetora ocorre pelo aumento das concentrações endógenas de enzimas com efeito antioxidante como glutathione redutase, glutathione peroxidase, superóxido dismutase e catalase. Desta forma, aumenta a capacidade de captura dos radicais livres produzidos por eventos diversos das células, evitando que a peroxidação lipídica dos ácidos graxos poli-insaturados da dupla membrana lipídica celular aconteça e, conseqüentemente, evitando lesão à membrana e às estruturas intracelulares importantes (DNA, RNA). Protege também de eventuais substâncias tóxicas de origem exógenas tais como tetracloreto de carbono, galactosamina, acetaminofeno, etanol, entre outras moléculas (LINO, 2012b; LUPER, 1998; PHARMANOSTRA, [s.d.]).

Trabalhos experimentais evidenciaram que esse composto também é capaz de prevenir a formação de espécies reativas de oxigênio, pela inibição de enzimas responsáveis por essa produção nas mitocôndrias ou pela manutenção da integridade da cadeia transportadora de elétrons mitocondrial, em condições de stress. Estes efeitos poderiam evitar disfunções mitocondriais, uma vez que os radicais livres induzem modificações protéicas, peroxidação lipídica e dano ao DNA mitocondrial (AVELAR, 2016; CAMINI; COSTA, 2020; LADAS; KROLL; KELLY, 2004; LINO, 2012; PHARMANOSTRA, [s.d.]; ŠIMÁNEK et al., 2000)

A silimarina estimula também antioxidantes não enzimáticos capazes de modular via de fatores de transcrição como NFκB (fator nuclear Kappa B) e Nrf2 (Fator nuclear eritróide 2). A via Nrf2 resulta no aumento da expressão de genes que codificam moléculas citoprotetoras que estão envolvidas no aumento da regulação de sistemas de defesas antioxidantes e no aumento da expressão de genes codificadores de enzimas de detoxificação, causando uma reparação nas moléculas danificadas durante o stress oxidativo. Já via NFκB, induz fatores de transcrição associados a regulação de vários processos celulares, incluindo inflamação e estresse oxidativo e a silimarina parece inibir a expressão de genes regulados por essa via levando assim a uma redução da inflamação e do estresse oxidativo (AVELAR, 2016; CAMINI;

COSTA, 2020; LADAS; KROLL; KELLY, 2004; LINO, 2012; PHARMANOSTRA, [s.d.]; ŠIMÁNEK et al., 2000)

Há também ação anti-inflamatória devido ao fato de ser inibidora da produção de leucotrienos e de reduzir TNF- α , IL-1 α , IL-6, IL-2 e IL-4, citocinas que contribuem com a formação do granuloma e da fibrose hepática (EL-SAYED et al., 2016; MATA-SANTOS, 2010; MITCHELL, 2014).

Outra ação relevante é a hepatoregeneração, no qual ela atua na RNA polimerase, aumentando a formação de ribossomos 28S, 18S e 5,8S, acelerando a incorporação do RNAr nos ribossomos, desta forma, estimulando a síntese de DNA e proteínas (LINO, 2012; MITCHELL, 2014).

A silimarina apresenta recirculação enterohepática, o que resulta em uma concentração nas células hepáticas maiores do que no plasma. Porém, isto não é um problema pois, baseado em observações clínicas que demonstraram que a silimarina apresenta valores muito altos de dose letal 50 (LD50), ela não é hepatotóxica (FLORA et al., 1998). O uso da silimarina é seguro, com raras ocorrências de efeitos adversos, como o uso de 1,5 g em humanos pode provocar efeito laxativo devido ao aumento do fluxo e secreção biliar (ACHÉ, [s.d.]; LUPER, 1998; PHARMANOSTRA, [s.d.]) (LUPER, 1998; ŠIMÁNEK et al., 2000a). Por ser um produto de origem vegetal, pode sofrer quimio-variações em relação ao período do ano e ao continente em que é cultivado, modificando a composição da molécula (CHAMBERS et al., 2017).

É contraindicada a pessoas com hipersensibilidade aos componentes. Não recomendado para mulheres grávidas, por falta de estudos específicos. Obstrução mecânica das vias biliares (ÍNDICE, [s.d.]; MITCHELL, 2014b; PHARMANOSTRA, [s.d.]) Os efeitos adversos são poucos e geralmente leves: náuseas, diarreia, plenitude ou dor abdominal, flatulência e anorexia podem ocorrer em pacientes que utilizam de preparações orais. Calor suave e sensação de rubor são comumente relatados durante a infusão intravenosa. Pode causar a reação alérgica em indivíduos sensíveis à erva-de-santiago ou margaridas, incluindo erupções cutâneas, urticária, prurido e até anafilaxia (ÍNDICE, [s.d.]; MITCHELL, 2014b PHARMA, [s.d.]; PHARMANOSTRA, [s.d.]

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 POPULAÇÃO DO ESTUDO

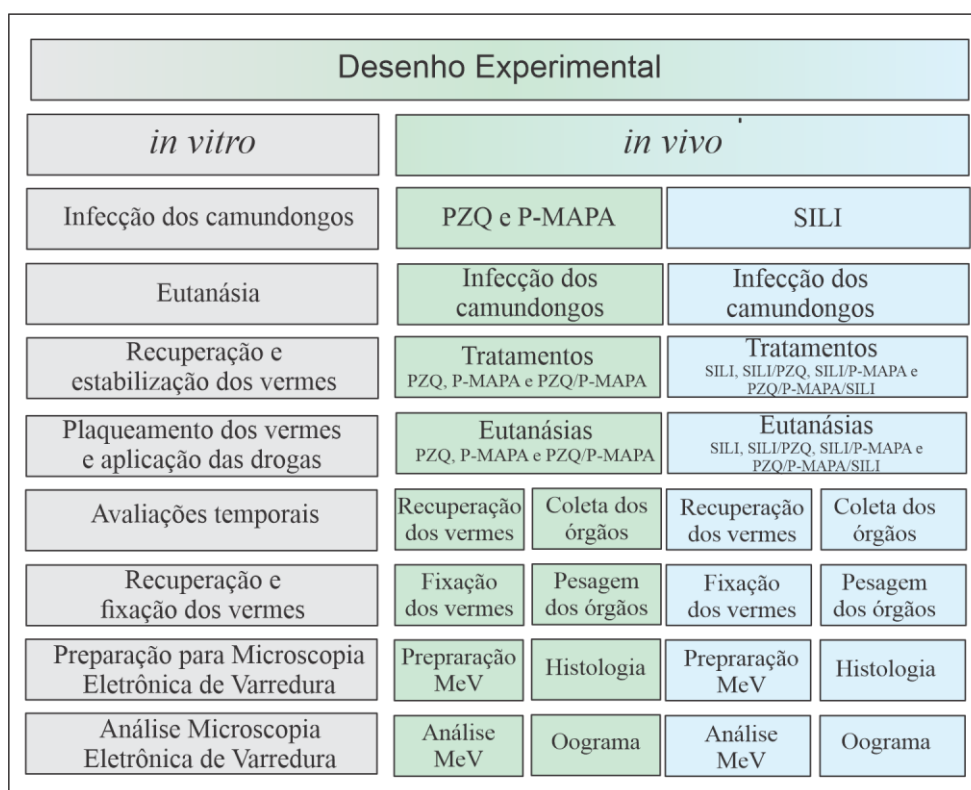
O estudo foi desenvolvido com 142 camundongos albinos machos, Swiss Webster, pesando entre 28-30 gramas, com 28 dias de idade, provenientes do Biotério de Criação e mantidos no Biotério de Experimentação, ambos do Instituto Aggeu Magalhães (IAM) da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ). Os animais foram alocados em micro-isoladores em estantes ventiladas e ambiente controlado com ciclo claro:escuro (12h/12h), temperatura controlada em cerca de 22 °C, ração específica para roedores e água *ad libitum*.

4.2 DESENHO DE ESTUDO

Estudo do tipo experimental, que se dividiu entre *in vivo* e *in vitro*, pois os experimentos foram feitos em dois momentos distintos. Um momento *in vitro* para avaliação da ação das drogas e presença de danos nos vermes através de Microscopia Eletrônica de Varredura.

E o segundo momento dividiu-se em dois lotes *in vivo*, separados por drogas devido manejo e acomodação dos animais no Biotério de Experimentação. O primeiro lote *in vivo* consistiu em 58 animais divididos nos grupos controle infectado não tratado, controle saudável, e os que foram tratados com PZQ, P-MAPA, e PZQ/P-MAPA. Já o segundo lote *in vivo*, seguiu com 64 animais que tiveram a Silimarina incluída no tratamento de forma isolada ou combinada ao PZQ e ao P-MAPA. Os vermes recuperados nos dois momentos do *in vivo* também foram submetidos a análise de danos por Microscopia Eletrônica de Varredura (Figura 15).

Figura 15 – Fluxograma de experimentos *in vitro* e *in vivo* baseado nas drogas isoladas e combinadas



Fonte: A autora.

Legenda: Fluxograma de como o experimento foi realizado de acordo com os grupos experimentais. PZQ= praziquantel; SILI= Silimarina.

4.3 AVALIAÇÃO LABORATORIAL

4.3.1 Grupos e protocolos de tratamento

Os grupos experimentais *in vivo*, utilizando um total de 122 camundongos, foram divididos de acordo com a(s) droga(s) e suas combinações e o tipo de tratamento, se tratado ou sem tratamento (Quadro 01).

Os protocolos de tratamentos adotados foram: Praziquantel (VETRANAL lote BCCD7939, Sigma-Aldrich, USA) a 50 mg/kg/5 dias consecutivos por gavagem; P-MAPA (lote S20, Farmabrazilis, BRA) 100mg/kg/dose única via intraperitoneal (SILVA et al., 2021); e Silimarina (S0292 lote BCBT9170 contendo silibina em $\geq 30\%$, Sigma-Aldrich, USA) a 10 mg/kg a cada 48h por 10 doses (MATA-SANTOS, 2010), via gavagem. Quando associadas, as contrações das drogas foram conservadas as mesmas mantendo-se uma proporção de 1:1:1.

QUADRO 01 – Grupos experimentais e doses terapêuticas

GRUPOS	Nº de animais
G0 - CS – Controle saudável sem infecção e sem tratamento	04
G1 - CDC – Controle doente infectado e sem tratamento	06
G2 - PZQ – Praziquantel infectado e tratado com 50mg/kg	12
Praziquantel não infectado e tratado com 50mg/kg	04
G3 - P-MAPA – P-MAPA infectado e tratado com 100mg/kg	12
P-MAPA não infectado e tratado com 100mg/kg	04
G4 - PZQ/P-MAPA – Praziquantel/P-MAPA infectado e tratado com 50mg/kg/100mg/kg	12
Praziquantel/P-MAPA não infectado e tratado com 50mg/kg/100mg/kg	04
G5 - SILI – Silimarina infectado e tratado com 10mg/kg	12
Silimarina não infectado e tratado com 10mg/kg	04
G6- SILI/PZQ – Silimarina/Praziquantel infectado e tratado com 10 mg/kg/50mg/kg	12
Silimarina/Praziquantel não infectado e tratado com 50 mg/kg/10mg/kg	04
G7 - SILI/P-MAPA – Silimarina/P-MAPA infectado e tratado com 10 mg/kg/100mg/kg	12
Silimarina/P-MAPA não infectado e tratado com 10 mg/kg/100mg/kg	04
G8 - PZQ/P-MAPA/SILI – Praziquantel/P-MAPA/Silimarina infectado e tratado com 50mg/kg/100mg/kg/10mg/kg	12
Praziquantel/P-MAPA/Silimarina não infectado e tratado com 50mg/kg/100mg/kg/10mg/kg	04

Fonte: A autora.

As três drogas e todas as combinações foram diluídas em Dimetilsulfóxido (DMSO) (Lote SHBK0789 Sigma-Aldrich, USA) com tampão fosfato-salino (PBS) 1x a 1,5%, bem como os animais não infectados também foram tratados com DMSO.

4.3.2 Animais e infecção

4.3.2.1 Experimentos *in vivo*

Os camundongos foram infectados com aproximadamente 80 cercarias de *S. mansoni* por indivíduo, por imersão caudal, obtidas de diferentes caramujos previamente infectados e cedidos pelo Laboratório de Referência em Esquistossomose do Instituto Aggeu Magalhães. A cepa utilizada foi a LE (Leandro Evangelista originária de BH).

Cada animal foi alocado individualmente em um recipiente de vidro contendo aproximadamente 10ml de água destilada adicionada da solução contendo as cercarias, de modo que as patas traseiras e a calda permaneceram em contato constante com a solução aquosa. Os recipientes foram deixados sob luz incandescente por uma hora, com sua posição modificada de forma aleatória após 30 minutos de modo a evitar viés de luminosidade. Após o processo de infecção, os

animais foram alocados em micro-isoladores nos grupos infectados de forma aleatória. Os animais dos grupos não infectados foram alocados de forma aleatória em micro-isoladores e diretamente guardados nas estantes ventiladas.

Os tratamentos começaram 60 dias após a infecção, com as drogas administradas em diferentes momentos quando em combinação (Quadro 02). As eutanásias ocorreram três dias após o fim dos tratamentos e foram realizadas por um profissional veterinário. As diferenças nos tempos de aplicação do P-MAPA e PZQ quando combinadas a Silimarina, ocorreram para que as mesmas permanecessem no organismo dos animais pelo mesmo tempo do primeiro lote. As eutanásias mais longas da Silimarina se deram devido seu protocolo de tratamento mais longo.

Quadro 02 – Datas de aplicação das drogas e eutanásia

GRUPOS	DROGAS	INICIO APLICAÇÃO	EUTANÁSIA
PZQ	PZQ	61dpi	68 dpi
P-MAPA	MAPA	61dpi	68 dpi
PZQ/P-MAPA	PZQ	61dpi	68 dpi
	MAPA	61dpi	
SILI	SILI	61dpi	83 dpi
SILI/PZQ	SILI	61dpi	83 dpi
	PZQ	76dpi	
SILI/P-MAPA	SILI	61dpi	83 dpi
	MAPA	76dpi	
PZQ/P-MAPA/SILI	PZQ	76dpi	83dpi
	MAPA	76dpi	
	SILI	61dpi	

Fonte: A autora.

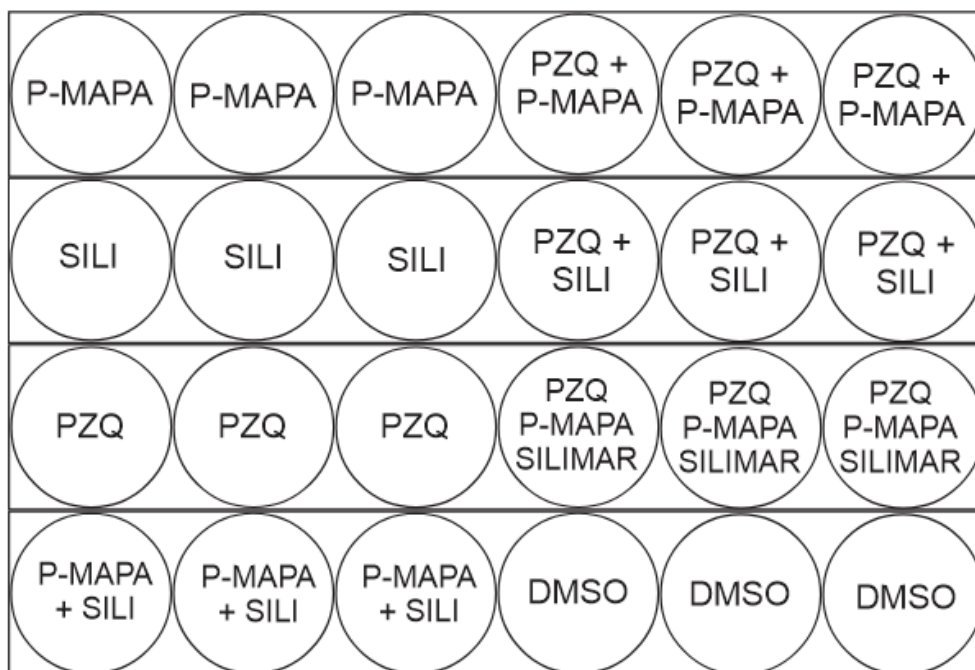
Legenda: dpi = dias pós infecção; PZQ= praziquantel; SILI= Silimarina.

4.2.2.2 Experimentos *in vitro*

Este grupo foi estabelecido para remoção de vermes adultos e análise da ação das drogas no tegumento dos vermes. Os 20 animais do grupo *in vitro* foram infectados com aproximadamente 300 cercarias por indivíduo de *S. mansoni*, seguindo o mesmo protocolo do experimento *in vivo* exceto que, após o processo de infecção, os animais foram alocados em duas caixas grandes devidamente identificadas em caixa 1 e caixa 2, para repetição do experimento. Ao final de 45 dias, os camundongos foram eutanasiados por sobredose anestésica. A remoção dos parasitas infectantes do intestino foi feita com a ajuda de uma cureta. Os vermes foram então alocados em meio RPMI 1640 completo (suplementado com 20 mM HEPES, pH 7,5, 100 UI/mL penicilina, 100 µg/mL estreptomicina e 10% FBS), deixados por 2

horas em incubadora a 37°C e 5% de CO₂ para adaptação. Em seguida, pares de parasitas foram alocados em placa de poliestireno de 24 poços e então submetidos aos tratamentos com P-MAPA e Silimarina, e o Praziquantel, como controle positivo, individual e combinados, para avaliação da viabilidade dos exemplares de *S. mansoni* (Figura 16).

Figura 16 – Placa de experimento *in vitro*



Fonte: A autora.

Legenda: PZQ= Praziquantel; SILI= Silimarina; NEG= negativo; DMSO= Dimetilsulfóxido

O poço apresenta um volume total de 2ml e, para cada um, foi adicionado o equivalente a concentração utilizada no protocolo *in vivo*, ou seja: PZQ: 100µM/ml, P-MAPA: 200µM/ml e SILI: 20µM/ml. Praziquantel, P-MAPA e Silimarina foram diluídos em DMSO 1,4%. A avaliação ocorreu nos tempos de até 30 minutos, 60 minutos e 24 horas em microscópio óptico invertido por 5 minutos para observação de fatores como mobilidade do verme e oviposição. Todos os vermes recuperados foram colocados em fixador karnovsky, onde foram examinados por microscopia eletrônica de varredura, para a observação do tegumento do parasita ao final das 24h.

Para avaliação dos resultados, foram utilizados os seguintes scores de motilidade:

3 – Vermes ativos com movimentos corporais normais;

2 – Vermes lentos com atraso nos movimentos corporais, podendo apresentar apenas movimentos nas extremidades da região anterior ou posterior;

- 1 – Vermes muito lentos, com movimento ocasional das extremidades ou intestino;
 0 – Vermes mortos com total ausência de movimentos.

4.3.3 Contagem e classificação de ovos

Fígado e intestino foram digeridos em KOH a 4% à temperatura ambiente de acordo com o método descrito por Cheever e Anderson (Cheever e Anderson, 1971) para contagem de ovos por grama de tecido. Para o cálculo da quantidade média de ovos por grama de tecido, multiplica-se quantidade de ovos encontrados em 1ml pelo volume total da solução. Então, divide-se o valor pelo peso do órgão. Da seguinte forma:

$$\frac{\text{Quantidade de ovos}}{1\text{ml}} \times \text{Volume de KOH} = X$$

$$\frac{X}{\text{Peso do órgão}} = \text{Média de ovos por grama de tecido}$$

Exemplo hepático:

$$\frac{383}{1\text{ml}} \times 25 = 9,575$$

$$\frac{9,575}{2,560\text{g}} = \mathbf{3,74 \text{ de ovos por grama de tecido}}$$

O oograma (PELLEGRINO E FARIA, 1965) consiste em um exame microscópico de três fragmentos da porção média do intestino delgado, comprimido entre lâminas, que permite a contagem e classificação dos ovos de *Schistosoma mansoni* para avaliação da eficácia terapêutica no tratamento da doença, através do estudo da viabilidade dos ovos (maduros, imaturos e mortos). Foram contados 100 ovos por lâmina, em triplicata, e a classificação foi feita da seguinte forma: ovos maduros viáveis - o embrião ocupava toda a sua área interna; ovos imaturos viáveis - o embrião não era visível ou não ocupava a área interna do ovo; ovos mortos ou imaturos mortos - miracídio retraído ou ausente, presença de vacúolos.

4.3.4 Análise histológica

Fígados foram excisados de camundongos eutanasiados, fixados instantaneamente em formalina a 10% em PBS e embebidos em parafina a posteriori. Em seguida, cortes de tecido (4 μm) foram feitos e corados com hematoxilina e eosina (H&E) para examinar tamanhos e composição celular dos granulomas. Para cada animal, foi avaliada toda a lâmina do tecido histológico e feitas quatro micrografias em objetiva de 4x primordialmente da região central do tecido. Foram contados todos os granulomas de cada micrografia, e os granulomas confluentes foram contabilizados como um único granuloma. As áreas e a média dos tamanhos dos granulomas foram calculadas a partir das fotomicrografias com o programa *Image J* (NIH, Bethesda, MD, EUA). As imagens foram feitas no Microscópio Nikon Eclipse 80i acoplado a câmera Nikon DW-Fi1-U2/L2, utilizando o programa de processamento Nis-Elements F 2.20 (Nikon Corporation, Tóquio, Japão) no laboratório do Serviço de Referência em Filariose. Todas as medidas foram realizadas em micrômetros (μm).

4.3.5 Microscopia Eletrônica de Varredura

Os vermes recuperados durante os processos de eutanásias *in vivo* e *in vitro* foram fixados no fixador Karnovsky e armazenados sob refrigeração até o processamento. Os vermes foram lavados três vezes com uma solução tampão (cacodilato de sódio, pH = 7,2), em seguida aplicado o tetróxido de ósmio 1% à temperatura ambiente por uma hora. Após, lava-se duas vezes com água destilada e inicia-se o processo de desidratação com etanol de 30%, 50%, 70%, e 100%. No ponto crítico, os vermes são secos em CO₂ líquido, e metalizados em seguida. As imagens foram feitas utilizando o JEOL JSM- Microscópio eletrônico de 5600 (Jeol Ltd., Tóquio, Japão) no Laboratório de Imunopatologia Keiso Asami (LIKA), UFPE. Todas as medidas foram realizadas em micrômetros (μm).

4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados numéricos são apresentados como Mediana (Intervalo Inter Quartil) por não apresentarem distribuição normal. O teste não paramétrico de Kruskal-Wallis foi utilizado para comparar os valores de cada combinação de drogas. O teste post-

hoc de Dunn com correção de Bonferroni foi utilizado para fazer a comparação pareada. O nível de significância adotado foi de 5% ($p < 0.05$ representa uma diferença significativa). As análises foram realizadas em R e os gráficos construídos com o GraphPad Prism 5.02.

5 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

O projeto original desta tese, intitulado "Avaliação imuno e fisiopatológica dos efeitos terapêuticos do imunomodulador P-MAPA e do fitoterápico Silimarina em camundongos infectados experimentalmente por *Schistosoma mansoni*", teve aprovação no Comitê em Ética no Uso de Animais do Instituto Aggeu Magalhães/Função Oswaldo Cruz (CEUA/IAM) sob protocolo nº 137/2018 (Anexo). O nome da tese foi modificado após as ponderações feitas na Banca de Qualificação.

6 RESULTADOS

Os resultados dividem-se em Experimentos *in vitro* e Experimentos *in vivo*.

6.1 EXPERIMENTOS *IN VITRO*

6.1.1 Avaliação da atividade vermícida

Para avaliação *in vitro* de ação vermícida das drogas, Praziquantel e P-MAPA isolados e a combinação Praziquantel/P-MAPA/Silimarina apresentaram 100% de ação vermícida nos grupos (Tabela 01).

Tabela 01 – Score de mobilidade após 24h de incubação

GRUPOS	Score de mobilidade (%)			
	0	1	2	3
DMSO				100
PZQ	100			
PMAPA	100			
PZQ/P-MAPA	100			
SILI				100
SILI/PZQ		100		
SILI/P-MAPA			100	
PZQ/P-MAPA/SILI	100			

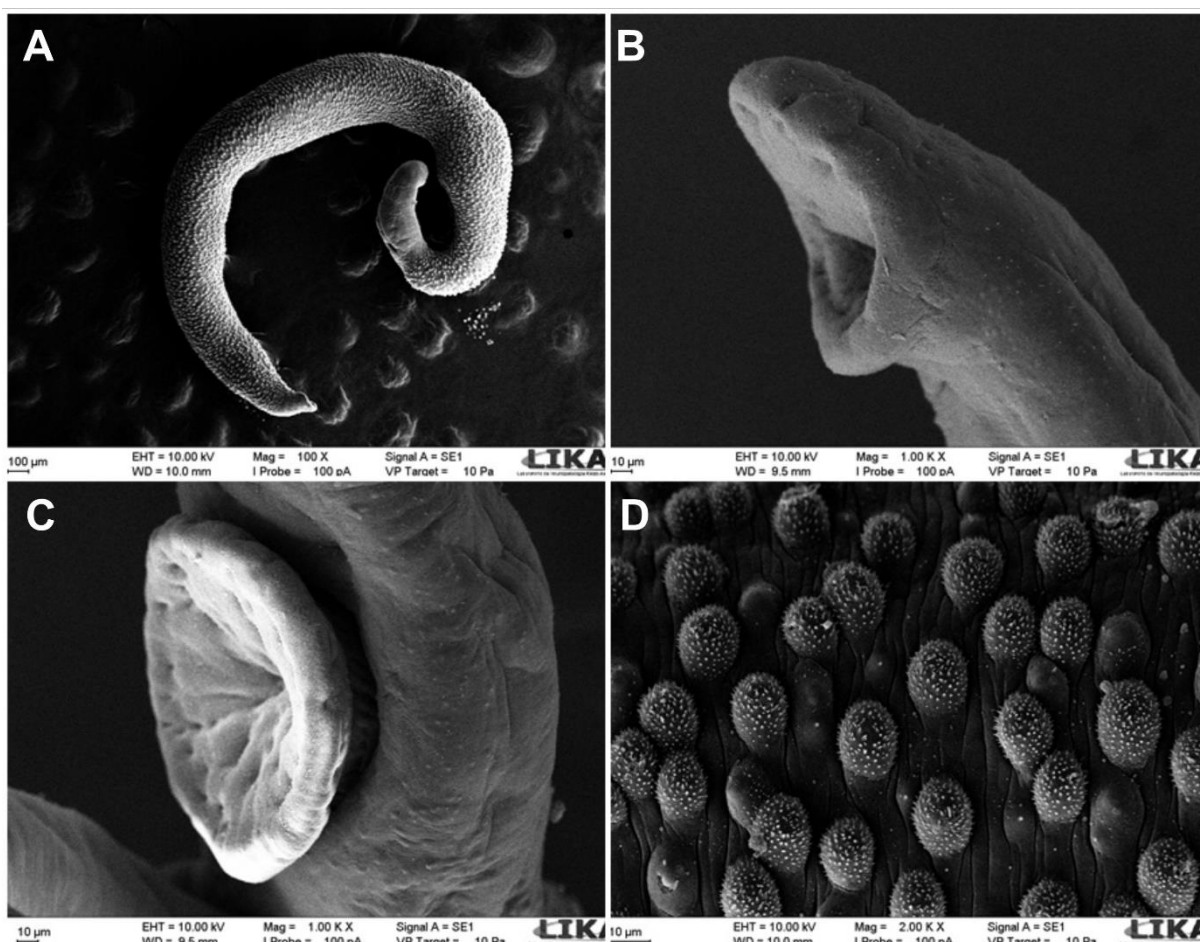
Legenda: 3 – Vermes ativos com movimentos corporais normais; 2 – Vermes lentos com atraso nos movimentos corporais, podendo apresentar apenas movimentos nas extremidades da região anterior ou posterior; 1 – Vermes muito lentos, com movimento ocasional das extremidades ou intestino; 0 – Vermes mortos com total ausência de movimentos.

6.1.2 Microscopia eletrônica de varredura dos vermes adultos

6.1.2.1 Microscopia eletrônica de varredura sem tratamento (DMSO)

O grupo foi tratado com o DMSO, que foi o veículo de diluição das drogas. As imagens mostram que o DMSO não causou danos aos vermes, pois não foram observadas lesões no tegumento, ausência de ação de destruição sobre os tubérculos ou espículas (Figura 17). Bem como não houve presença de tumorações ou aprofundamentos.

Figura 17 – Fotomicrografia eletrônica de varredura de vermes adultos de *S. mansoni* sem tratamento



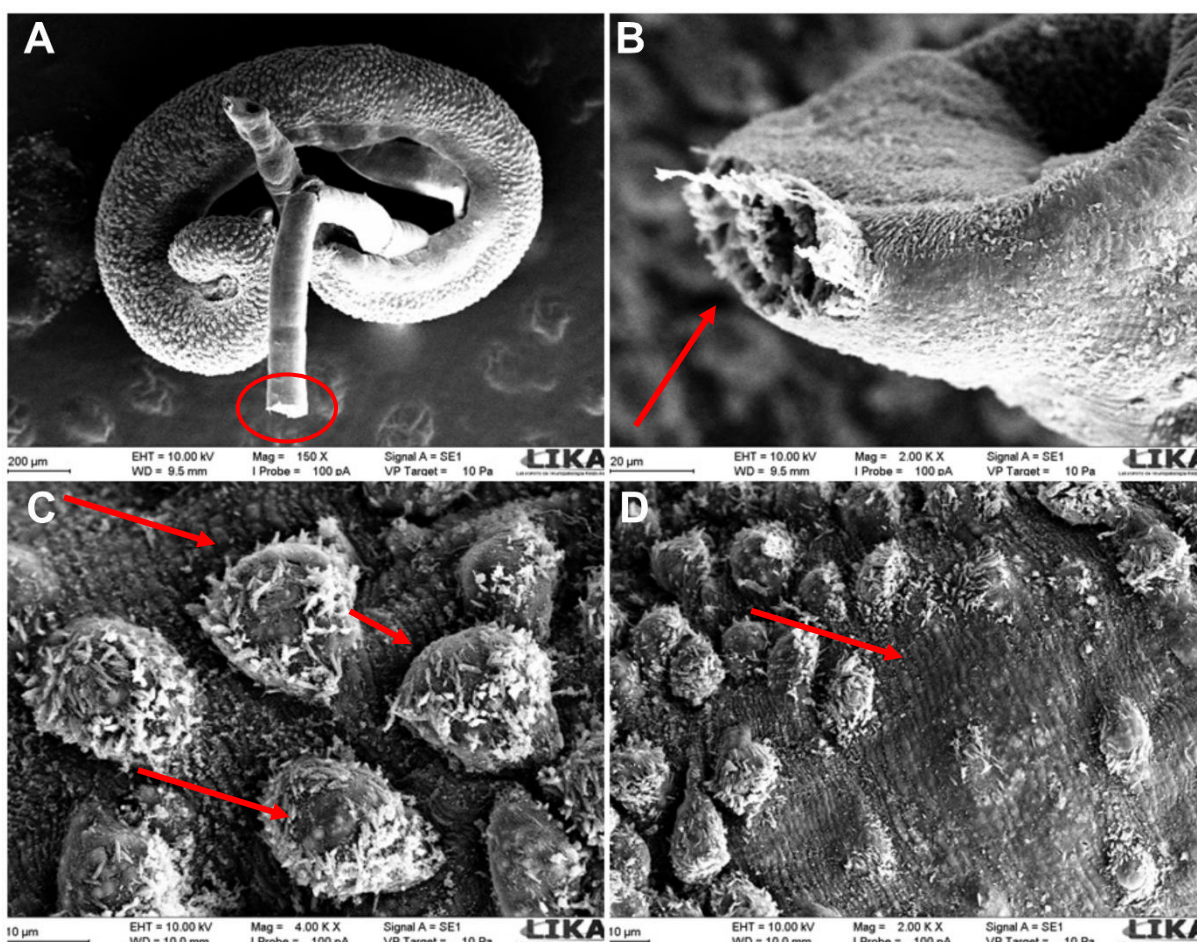
Fonte: A autora.

Legenda: A – Verme inteiro, utilizado apenas salina 0,9% + DMSO; B – Boca do parasito com tegumento íntegro C – Ventosa do parasito com tegumento íntegro D – Tubérculos sem alterações.

6.1.2.2 Microscopia eletrônica de varredura de vermes adultos tratados com Praziquantel

Na Figura 18 observa-se os vermes recuperados no tratamento com o praziquantel, onde houve 100% de ação vermícida. Nas imagens, destaca-se o casal de verme contorcido com uma porção do verme ausente por partição da estrutura (A), fissura na boca do verme (B), destruição das espículas (C) e tubérculos (D). Evidencia-se as alterações pela presença de fendas nos tegumentos.

Figura 18 – Fotomicrografia eletrônica de varredura de vermes adultos de *S. mansoni* tratados com Praziquantel



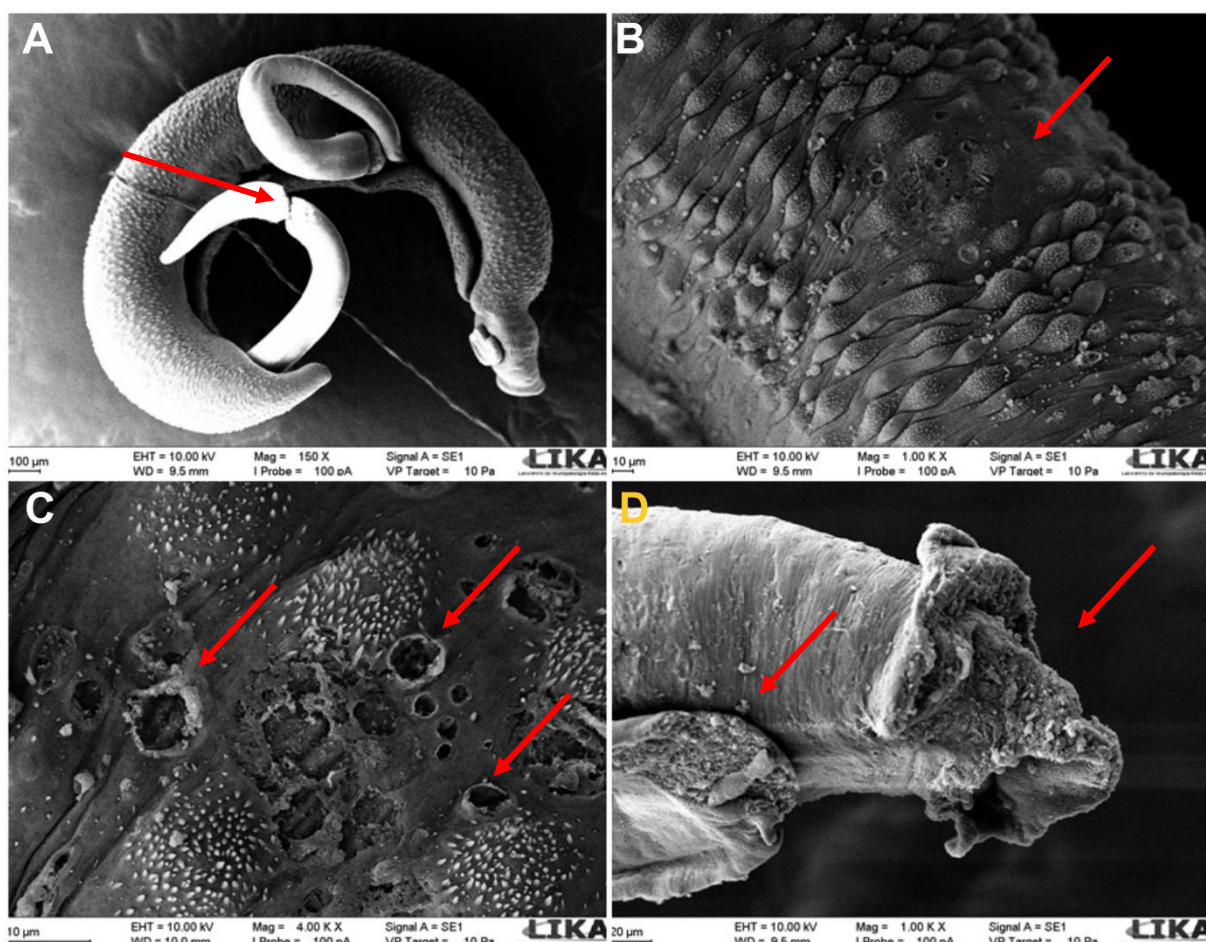
Fonte: A autora.

Legenda: A – casal de verme contorcido com um pedaço partido; B – Fissura na boca do verme; C – Destruição das espículas; D – Tubérculos destruídos.

6.1.2.3 Microscopia eletrônica de varredura de vermes adultos tratados com P-MAPA

Neste grupo, também houve total ação vermícida do P-MAPA. Nota-se pela intensa lesão na fêmea (A), marcada pelo pinçamento tecidual no corpo do verme. Destaca-se também destruição das espículas e tubérculos (B), erosões no tegumento (C) e vasta lesão próxima a região da ventosa (D) (Figura 19) como indicadas na imagens.

Figura 19 – Fotomicrografia eletrônica de varredura de vermes adultos de *S. mansoni* tratados com P-MAPA



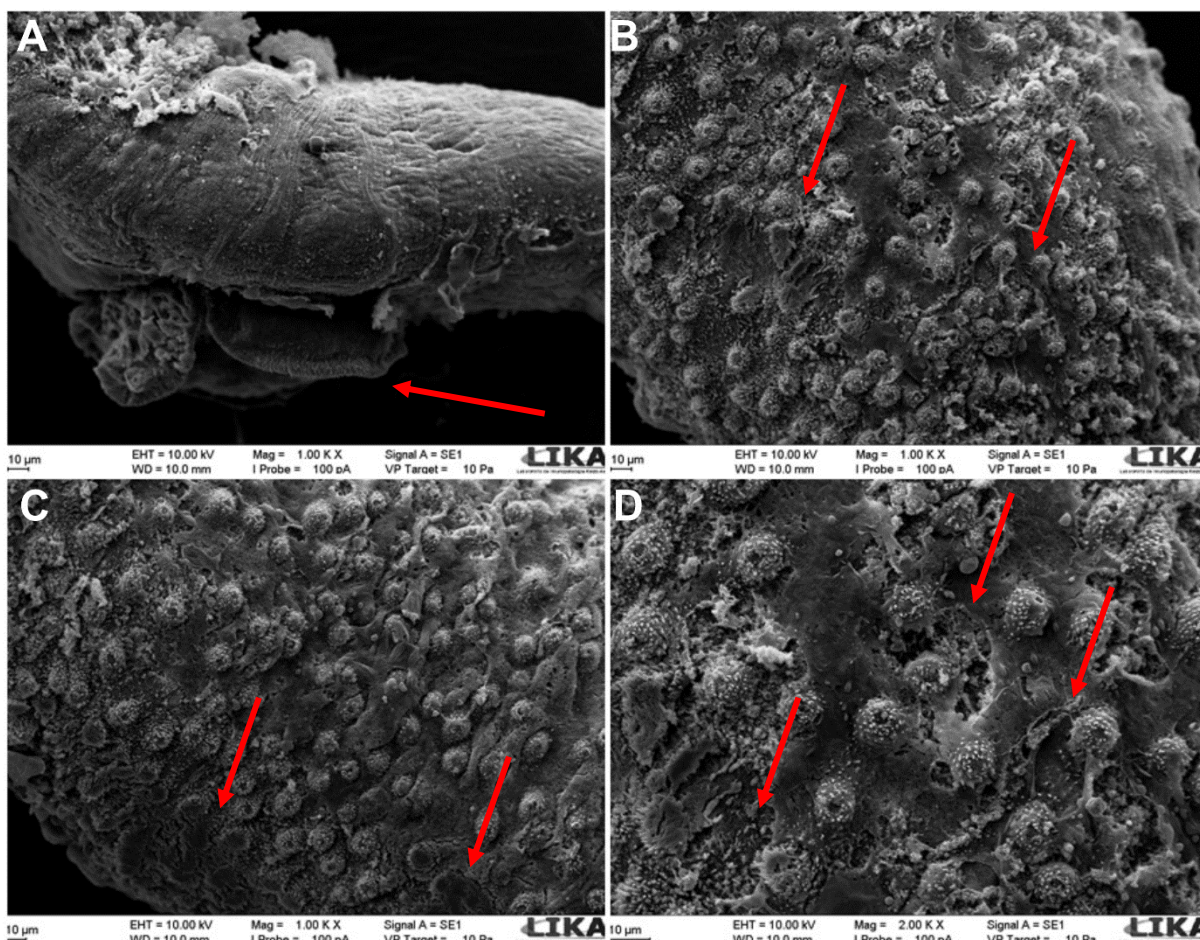
Fonte: A autora.

Legenda: A – casal de verme com lesão na fêmea; B – Destruição das espículas de tubérculos; C – Erosões no tegumento; D – Vasta lesão próxima a região da ventosa.

6.1.2.4 Microscopia eletrônica de varredura de vermes adultos tratados com Praziquantel/P-MAPA

Na Figura 20, destaca-se as intensas lesões tegumentares provocadas pela combinação das drogas PZQ e P-MAPA. Houve erosões e perda de tecido na região da ventosa (A), vasta destruição de espículas e tubérculos (B, C, D), com algumas áreas com erosões no tegumento (D). Bem como aprofundamentos causados por estes danos.

Figura 20 – Fotomicrografia eletrônica de varredura de vermes adultos de *S. mansoni* tratados com Praziquantel/P-MAPA



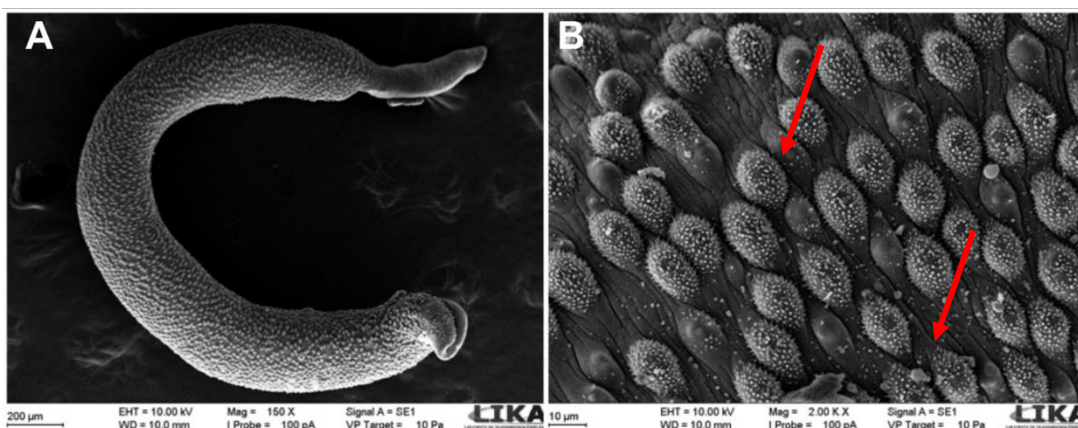
Fonte: A autora.

Legenda: A – Erosões e perda de tecido na região da ventosa; B, C, D – Vasta destruição de espículas e tubérculos; D – Áreas com erosões no tegumento.

6.1.2.5 Microscopia eletrônica de varredura de vermes adultos tratados com Silimarina

No grupo da Silimarina isolada (Figura 21), não houve morte dos vermes na placa após 24h. Destaca-se apenas discretas perdas de espículas (B).

Figura 21 – Fotomicrografia eletrônica de varredura de vermes adultos de *S. mansoni* tratados com Silimarina



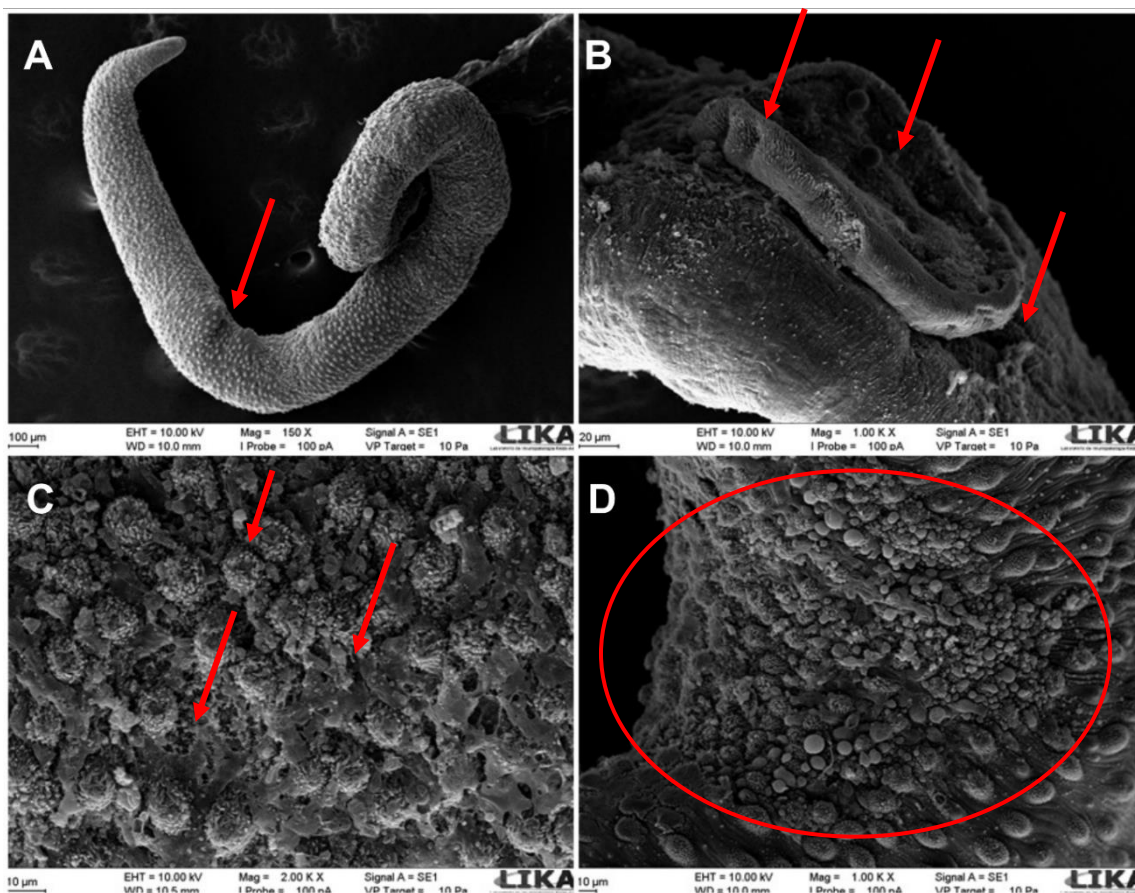
Fonte: A autora.

Legenda: A – Verme inteiro. B – Discreta perda de espículas.

6.1.2.6 Microscopia eletrônica de varredura de vermes adultos tratados com Silimarina/Praziquantel

Neste grupo, os vermes apresentaram score 1, que significa vermes muito lentos, com movimento ocasional das extremidades ou intestino. Estas marcas estão evidenciadas na retração do verme (A), nas tumorações e destruição do tegumento e de tubérculos (B, C), bem como no aprofundamento do tegumento (D) (Figura 22).

Figura 22 – Fotomicrografia eletrônica de varredura de vermes adultos de *S. mansoni* tratados com Silimarina/Praziquantel



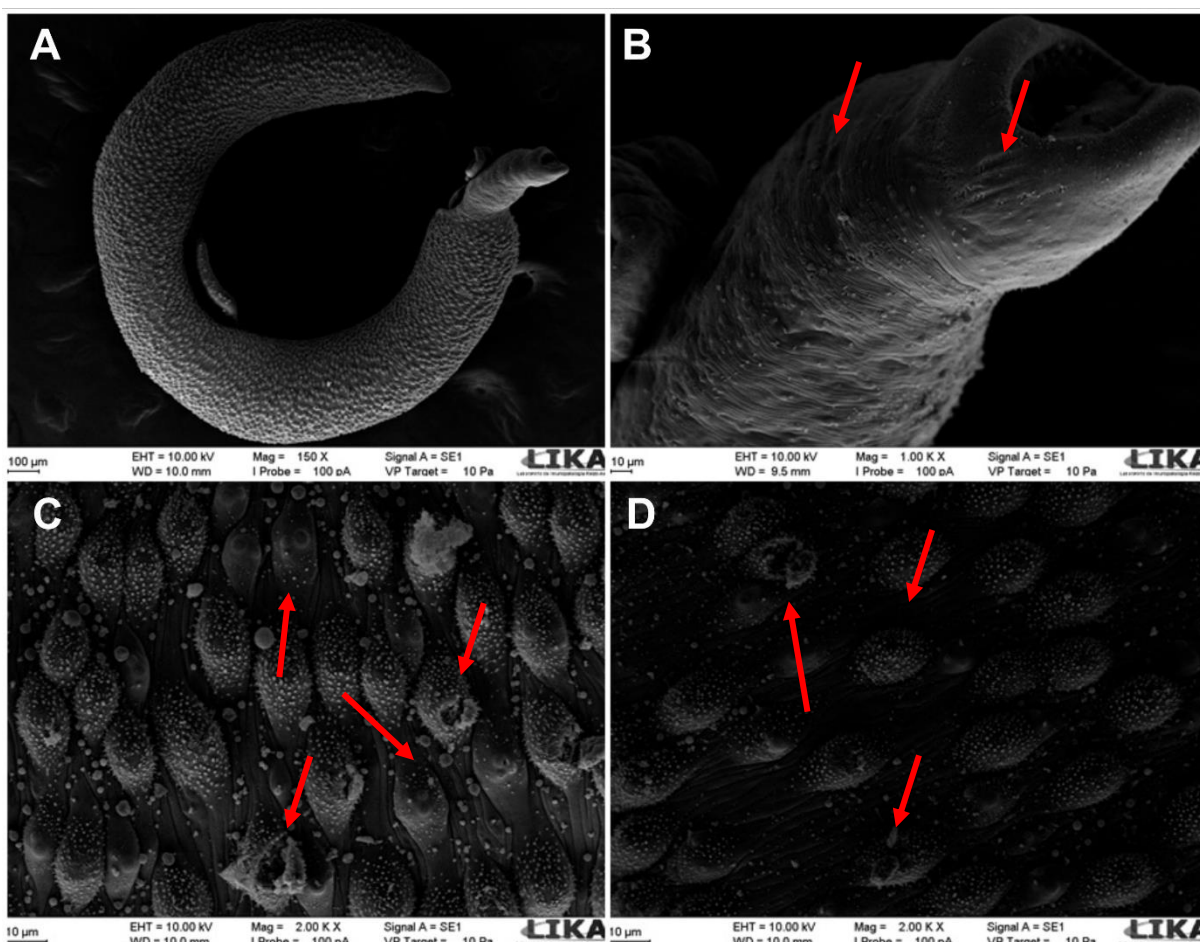
Fonte: A autora.

Legenda: A – Retração e tumoração do verme. B – Tumorações e destruição do tegumento e de tubérculos; D – Aprofundamento do tegumento.

6.1.2.7 Microscopia eletrônica de varredura de vermes adultos tratados com Silimarina/P-MAPA

A Figura 23 mostra leve enrugamento no tegumento (B), com discreta destruição de espículas e tubérculos (C, D). Este resultado condiz com o teste de placa das drogas, pois evidencia uma leve retração do verme com pouca evidencia de lesão tecidual.

Figura 23 – Fotomicrografia eletrônica de varredura de vermes adultos de *S. mansoni* tratados com Silimarina/P-MAPA



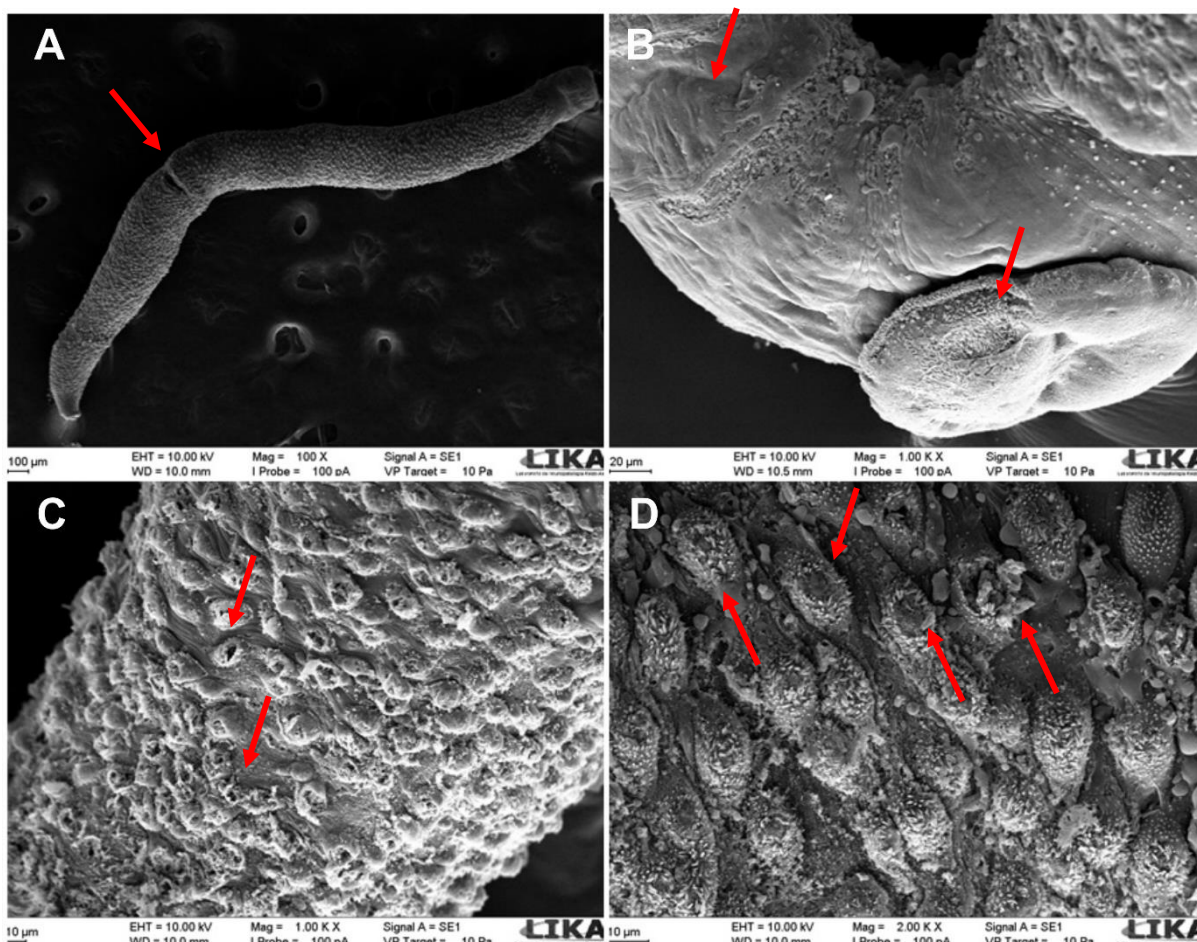
Fonte: A autora.

Legenda: A – Verme íntegro; B – Enrugamento tegumentar; C, D – Discreta destruição de espículas e tubérculos.

6.1.1.8 Microscopia eletrônica de varredura de vermes adultos tratados com Praziquantel/P-MAPA /Silimarina

Juntas, as três drogas causaram a morte de todos os vermes na placa. Este efeito fica evidente na profunda fissura tegumentar (A), lesões na ventosa (B), bem como na intensa destruição de tubérculos e perda de espículas (D) (Figura 24).

Figura 24 – Fotomicrografia eletrônica de varredura de vermes adultos de *S. mansoni* tratados com Praziquantel/P-MAPA /Silimarina



Fonte: A autora.

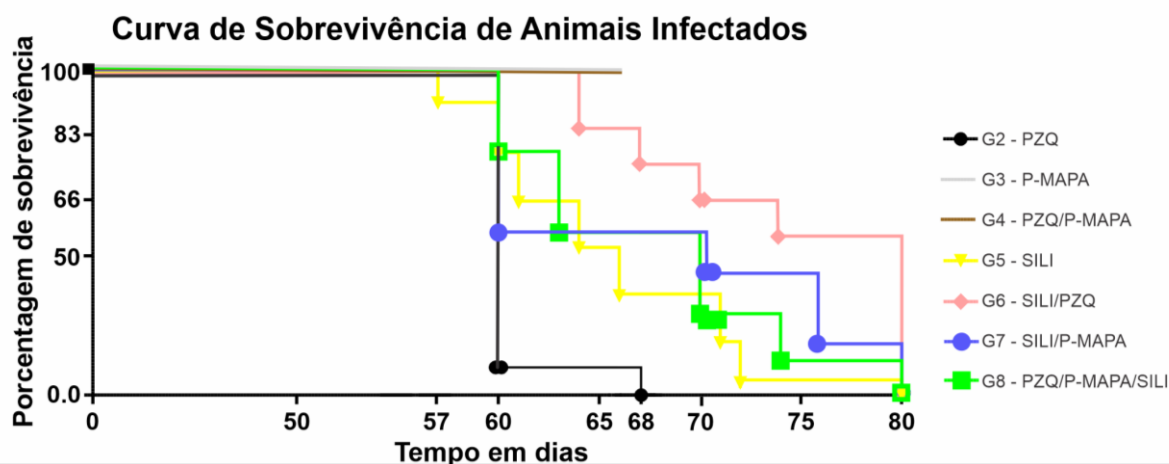
Legenda: A – Fissura no verme; B – Lesão na ventosa; C, – Intensa destruição tubérculos; D – Perda de espículas.

6.2 EXPERIMENTOS *IN VIVO*

6.2.1 Curva de sobrevivência dos camundongos

Independente da data de eutanásia pré-definida (68 ou 83 dpi) foram registradas mortes dos camundongos infectados ao longo dos experimentos (Figura 25). SILI, SILI/PZQ, PZQ/P-MAPA/SILI registraram 50% de óbitos, o que equivale a 6 animais. SILI/P-MAPA 66,66% de óbitos, com morte de 5 animais.

Figura 25 – Curva de sobrevivência dos animais infectados



Fonte: A autora.

Legenda: CDC = controle doente crônico; PZQ = praziquantel; SILI = Silimarina.

Dois animais do grupo tratado com PZQ foram eutanasiados antes do tempo para evitar sofrimento animal.

6.2.2 Quantitativo de vermes recuperados dos animais infectados

Como mostrado na **tabela 02**, os grupos P-MAPA, Silimarina e Silimarina/P-MAPA foram os grupos com os maiores quantitativos de vermes recuperados, respectivamente. Os grupos com o Praziquantel apresentaram os menores valores.

Tabela 02 – Quantitativo de vermes recuperados

GRUPOS	VERMES		
	MACHO	FÊMEA	CASAL
CDC	05	04	10
PZQ	02	01	06
MAPA	04	00	48
PZQ/P-MAPA	01	00	02
SILI	03	01	16
SILI/PZQ	00	00	01
SILI/P-MAPA	01	02	30
PZQ/P-MAPA/SILI	01	01	04

Fonte: A autora.

Legenda: CDC= controle doente crônico; PZQ= praziquantel; SILI= Silimarina.

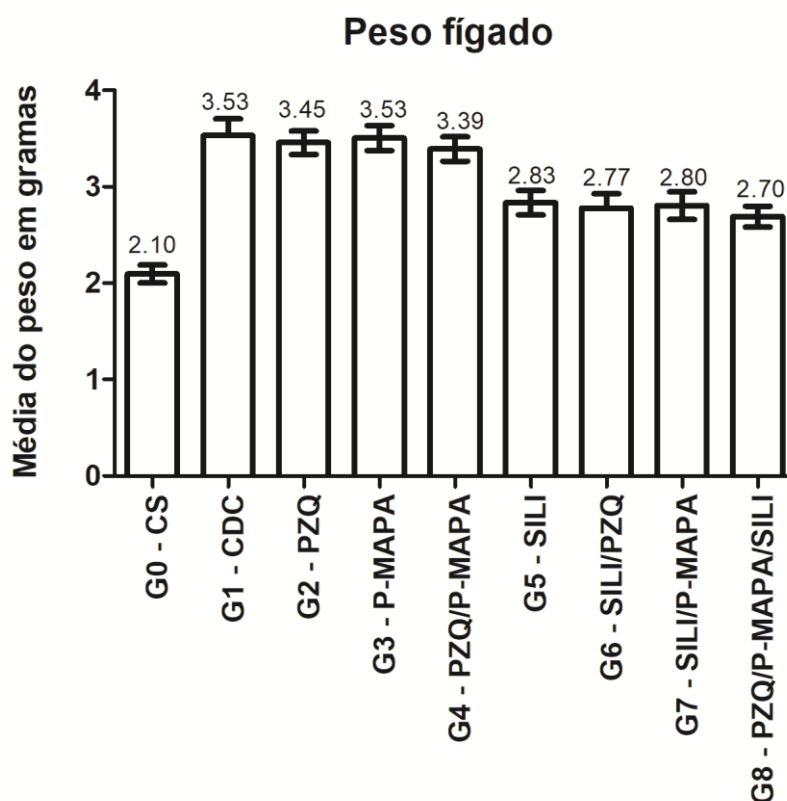
6.2.3 Pesos dos órgãos

A análise dos pesos órgãos ajudam a mensurar a presença ou ausência de hepatoesplenomegalia, bem como aumento ou redução tecidual causados pela doença. Esse aumento no peso pode ser causado pela presença de ovos e granulomas.

6.2.3.1 Fígado

Os grupos tratados com a Silimarina, de forma isolada ou combinada, apresentaram os menores pesos hepáticos, quando avaliados em comparação ao controle doente infectado e aos grupos tratados com o PZQ e o P-MAPA. Destaca-se a combinação das três drogas em questão, PZQ/P-MAPA/SILI, com o menor peso dos grupos infectados em teste (2.700g) (Figura 26).

Figura 26 – Média de pesos dos Fígados



Fonte: A autora.

Legenda: Avaliação da média de pesos dos fígados dos camundongos nos grupos testados. CS= Controle saudável; CDC= controle doente crônico; PZQ= praziquantel; SILI= Silimarina.

Apesar do aumento do peso no grupo PZQ/P-MAPA/SILI, a diferença entre ele e o CS não foi estatisticamente relevante. Isso confere boa ação das drogas combinadas na contenção da expansão dos danos da esquistossomose no fígado.

Como pode ser visto na Tabela 03, no teste post hoc, foram feitas comparações dois a dois em par para verificar as combinações das drogas quanto ao peso do fígado em gramas. Houve hepatomegalia nos grupos tratados com PZQ, P-MAPA e PZQ/P-MAPA.

Tabela 03 – Comparações post-hoc de Dunn com correção de Bonferroni dois a dois para cada tipo e combinação de drogas para todas as variáveis no peso do fígado

Grupos	Diferença na soma dos postos	P < 0.05?
G0 - CS vs G1 - CDC	-47,83	Sim
G0 - CS vs G2 - PZQ	-46,70	Sim
G0 - CS vs G3 - P-MAPA	-46,04	Sim
G0 - CS vs G4 - PZQ/P-MAPA	-40,50	Sim
G0 - CS vs G5 - SILI	-20,33	Não
G0 - CS vs G6 - SILI/PZQ	-17,67	Não
G0 - CS vs G7 - SILI/P-MAPA	-18,25	Não
G0 - CS vs G8 - PZQ/P-MAPA/SILI	-12,25	Não
G1 - CDC vs G2 - PZQ	1,133	Não
G1 - CDC vs G3 - P-MAPA	1,792	Não
G1 - CDC vs G4 - PZQ/P-MAPA	7,333	Não
G1 - CDC vs G5 - SILI	27,50	Não
G1 - CDC vs G6 - SILI/PZQ	30,17	Não
G1 - CDC vs G7 - SILI/P-MAPA	29,58	Não
G1 - CDC vs G8 - PZQ/P-MAPA/SILI	35,58	Não
G2 - PZQ vs G3 - P-MAPA	0,6583	Não
G2 - PZQ vs G4 - PZQ/P-MAPA	6,200	Não
G2 - PZQ vs G5 - SILI	26,37	Não
G2 - PZQ vs G6 - SILI/PZQ	29,03	Não
G2 - PZQ vs G7 - SILI/P-MAPA	28,45	Não
G2 - PZQ vs G8 - PZQ/P-MAPA/SILI	34,45	Sim
G3 - P-MAPA vs G4 - PZQ/P-MAPA	5,542	Não
G3 - P-MAPA vs G5 - SILI	25,71	Não
G3 - P-MAPA vs G6 - SILI/PZQ	28,38	Não
G3 - P-MAPA vs G7 - SILI/P-MAPA	27,79	Não
G3 - P-MAPA vs G8 - PZQ/P-MAPA/SILI	33,79	Sim
G4 - PZQ/P-MAPA vs G5 - SILI	20,17	Não
G4 - PZQ/P-MAPA vs G6 - SILI/PZQ	22,83	Não
G4 - PZQ/P-MAPA vs G7 - SILI/P-MAPA	22,25	Não
G4 - PZQ/P-MAPA vs G8 - PZQ/P-MAPA/SILI	28,25	Não
G5 - SILI vs G6 - SILI/PZQ	2,667	Não
G5 - SILI vs G7 - SILI/P-MAPA	2,083	Não
G5 - SILI vs G8 - PZQ/P-MAPA/SILI	8,083	Não

Grupos	Diferença na soma dos postos	P < 0.05?
G6 - SILI/PZQ vs G7 - SILI/P-MAPA	-0,5833	Não
G6 - SILI/PZQ vs G8 - PZQ/P-MAPA/SILI	5,417	Não
G7 - SILI/P-MAPA vs G8 - PZQ/P-MAPA/SILI	6,000	Não

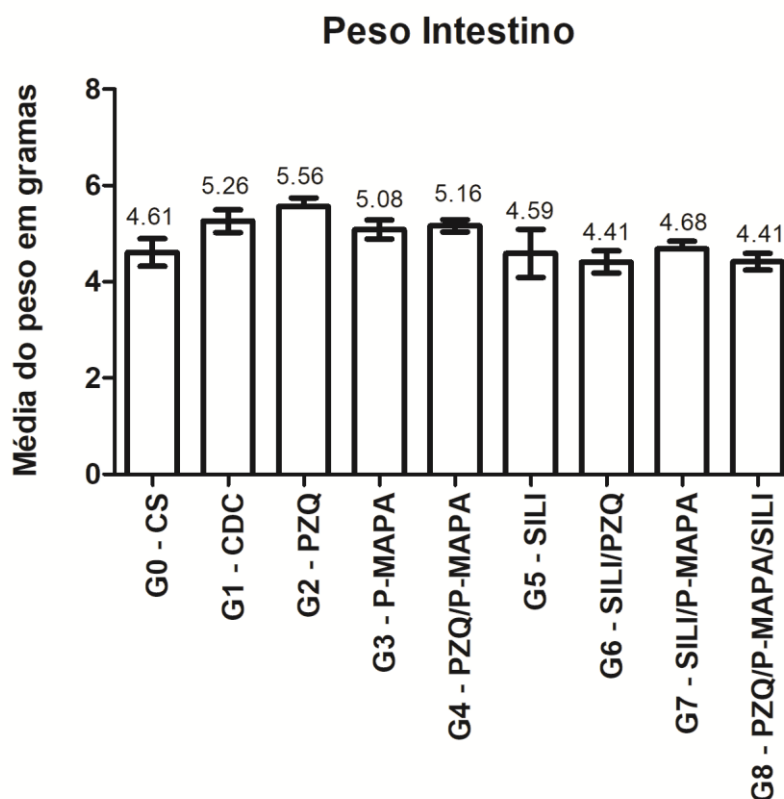
Fonte: A autora.

Legenda: CS= Controle saudável; CDC= controle doente crônico; PZQ= praziquantel; SILI= Silimarina.

6.2.3.2 Intestino

Novamente, os grupos tratados com a Silimarina, isolada e combinada, apresentaram os menores pesos intestinais, quando avaliados em comparação ao controle doente infectado e aos grupos tratados com o PZQ e o P-MAPA. A combinação das três drogas em questão PZQ/P-MAPA/SILI apresentou menor peso dos grupos infectados em teste junto com o SILI/PZQ (4,410g) (Figura 27).

Figura 27 – Média de pesos dos Intestinos



Fonte: A autora.

Legenda: CS= Controle saudável; CDC= controle doente crônico; PZQ= praziquantel; SILI= Silimarina.

Como pode ser visto na Tabela 04, quanto ao peso em grama do intestino, não houve diferença estatística entre nenhum dos grupos testados em comparação aos controles saudável e infectado.

Tabela 04 – Comparações post-hoc de Dunn com correção de Bonferroni dois a dois para cada tipo e combinação de drogas para todas as variáveis no peso do intestino

Grupos	Diferença na soma dos postos	P < 0.05?
G0 - CS vs G1 - CDC	-20,04	Não
G0 - CS vs G2 - PZQ	-28,68	Não
G0 - CS vs G3 - P-MAPA	-15,04	Não
G0 - CS vs G4 - PZQ/P-MAPA	-18,83	Não
G0 - CS vs G5 - SILI	-9,042	Não
G0 - CS vs G6 - SILI/PZQ	6,458	Não
G0 - CS vs G7 - SILI/P-MAPA	-1,375	Não
G0 - CS vs G8 - PZQ/P-MAPA/SILI	7,292	Não
G1 - CDC vs G2 - PZQ	-8,633	Não
G1 - CDC vs G3 - P-MAPA	5,000	Não
G1 - CDC vs G4 - PZQ/P-MAPA	1,208	Não
G1 - CDC vs G5 - SILI	11,00	Não
G1 - CDC vs G6 - SILI/PZQ	26,50	Não
G1 - CDC vs G7 - SILI/P-MAPA	18,67	Não
G1 - CDC vs G8 - PZQ/P-MAPA/SILI	27,33	Não
G2 - PZQ vs G3 - P-MAPA	13,63	Não
G2 - PZQ vs G4 - PZQ/P-MAPA	9,842	Não
G2 - PZQ vs G5 - SILI	19,63	Não
G2 - PZQ vs G6 - SILI/PZQ	35,13	Sim
G2 - PZQ vs G7 - SILI/P-MAPA	27,30	Não
G2 - PZQ vs G8 - PZQ/P-MAPA/SILI	35,97	Sim
G3 - P-MAPA vs G4 - PZQ/P-MAPA	-3,792	Não
G3 - P-MAPA vs G5 - SILI	6,000	Não
G3 - P-MAPA vs G6 - SILI/PZQ	21,50	Não
G3 - P-MAPA vs G7 - SILI/P-MAPA	13,67	Não
G3 - P-MAPA vs G8 - PZQ/P-MAPA/SILI	22,33	Não
G4 - PZQ/P-MAPA vs G5 - SILI	9,792	Não
G4 - PZQ/P-MAPA vs G6 - SILI/PZQ	25,29	Não
G4 - PZQ/P-MAPA vs G7 - SILI/P-MAPA	17,46	Não
G4 - PZQ/P-MAPA vs G8 - PZQ/P-MAPA/SILI	26,13	Não
G5 - SILI vs G6 - SILI/PZQ	15,50	Não
G5 - SILI vs G7 - SILI/P-MAPA	7,667	Não
G5 - SILI vs G8 - PZQ/P-MAPA/SILI	16,33	Não
G6 - SILI/PZQ vs G7 - SILI/P-MAPA	-7,833	Não
G6 - SILI/PZQ vs G8 - PZQ/P-MAPA/SILI	0,8333	Não
G7 - SILI/P-MAPA vs G8 - PZQ/P-MAPA/SILI	8,667	Não

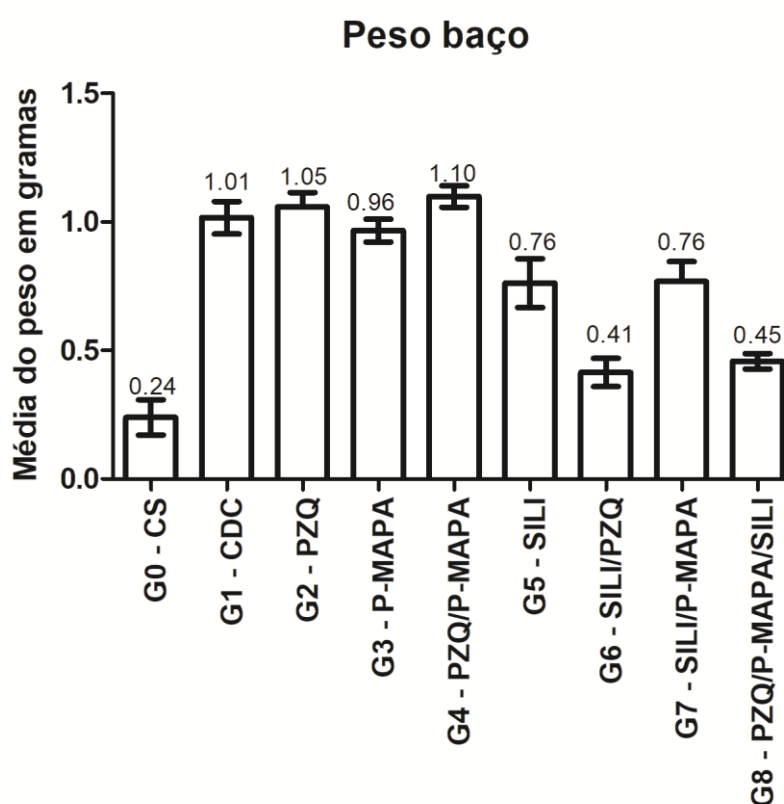
Fonte: A autora.

Legenda: CS= Controle saudável; CDC= controle doente crônico; PZQ= praziquantel; SILI= Silimarina.

6.2.3.3 Baço

Mais uma vez, combinação SILI/PZQ (0,410g) e das três drogas PZQ/P-MAPA/SILI (0,450g) apresentaram os menores pesos, desta vez de forma hepática (Figura 28). Apesar do aumento dos pesos nos grupos citados, a diferença entre eles e o CS não foi estatisticamente relevante. Isso confere boa ação das drogas combinadas na contenção da expansão dos danos da esquistossomose no baço.

Figura 28 – Média de pesos dos Baços



Fonte: A autora.

Legenda: CS= Controle saudável; CDC= controle doente crônico; PZQ= praziquantel; SILI= Silimarina.

Como pode ser visto na Tabela 05, quanto ao peso em grama do baço, foram feitas comparações dois a dois em par para verificar as combinações das drogas quanto ao peso do baço em gramas. Houve esplenomegalia nos grupos tratados com PZQ, P-MAPA e PZQ/P-MAPA.

Tabela 05 – Comparações post-hoc de Dunn com correção de Bonferroni dois a dois para cada tipo e combinação de drogas para todas as variáveis no peso do baço

Grupos	Diferença na soma dos postos	P < 0.05?
G0 - CS vs G1 - CDC	-43,17	Sim
G0 - CS vs G2 - PZQ	-45,55	Sim
G0 - CS vs G3 - P-MAPA	-38,17	Sim
G0 - CS vs G4 - PZQ/P-MAPA	-49,42	Sim
G0 - CS vs G5 - SILI	-25,08	Não
G0 - CS vs G6 - SILI/PZQ	-5,667	Não
G0 - CS vs G7 - SILI/P-MAPA	-26,00	Não
G0 - CS vs G8 - PZQ/P-MAPA/SILI	-7,833	Não
G1 - CDC vs G2 - PZQ	-2,383	Não
G1 - CDC vs G3 - P-MAPA	5,000	Não
G1 - CDC vs G4 - PZQ/P-MAPA	-6,250	Não
G1 - CDC vs G5 - SILI	18,08	Não
G1 - CDC vs G6 - SILI/PZQ	37,50	Não
G1 - CDC vs G7 - SILI/P-MAPA	17,17	Não
G1 - CDC vs G8 - PZQ/P-MAPA/SILI	35,33	Não
G2 - PZQ vs G3 - P-MAPA	7,383	Não
G2 - PZQ vs G4 - PZQ/P-MAPA	-3,867	Não
G2 - PZQ vs G5 - SILI	20,47	Não
G2 - PZQ vs G6 - SILI/PZQ	39,88	Sim
G2 - PZQ vs G7 - SILI/P-MAPA	19,55	Não
G2 - PZQ vs G8 - PZQ/P-MAPA/SILI	37,72	Sim
G3 - P-MAPA vs G4 - PZQ/P-MAPA	-11,25	Não
G3 - P-MAPA vs G5 - SILI	13,08	Não
G3 - P-MAPA vs G6 - SILI/PZQ	32,50	Não
G3 - P-MAPA vs G7 - SILI/P-MAPA	12,17	Não
G3 - P-MAPA vs G8 - PZQ/P-MAPA/SILI	30,33	Não
G4 - PZQ/P-MAPA vs G5 - SILI	24,33	Não
G4 - PZQ/P-MAPA vs G6 - SILI/PZQ	43,75	Sim
G4 - PZQ/P-MAPA vs G7 - SILI/P-MAPA	23,42	Não
G4 - PZQ/P-MAPA vs G8 - PZQ/P-MAPA/SILI	41,58	Sim
G5 - SILI vs G6 - SILI/PZQ	19,42	Não
G5 - SILI vs G7 - SILI/P-MAPA	-0,9167	Não
G5 - SILI vs G8 - PZQ/P-MAPA/SILI	17,25	Não
G6 - SILI/PZQ vs G7 - SILI/P-MAPA	-20,33	Não
G6 - SILI/PZQ vs G8 - PZQ/P-MAPA/SILI	-2,167	Não
G7 - SILI/P-MAPA vs G8 - PZQ/P-MAPA/SILI	18,17	Não

Fonte: A autora.

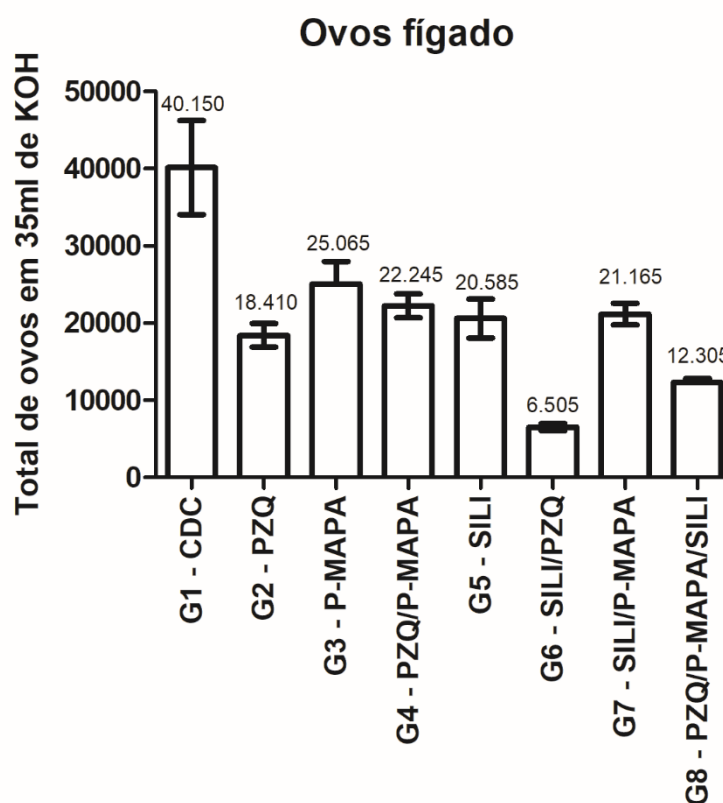
Legenda: CS= Controle saudável; CDC= controle doente crônico; PZQ= praziquantel; SILI= Silimarina.

6.2.4 Efeitos in vivo do Praziquantel, P-MAPA e Silimarina, isolados e combinados, no número total de ovos recuperados

6.2.4.1 Fígado

Na contagem geral de ovos, o grupo SILI/PZQ apresentou o menor quantitativo total de ovos recuperados com 6,505 ovos (Figura 29).

Figura 29 – Contagem geral de ovos no fígado



Fonte: A autora.

Legenda: CDC= controle doente crônico; PZQ= praziquantel; SILI= Silimarina.

Como pode ser visto na Tabela 06, quanto ao quantitativo total de ovos recuperados no fígado, a redução nos valores recuperados pelos grupos PZQ, SILI/PZQ e PZQ/P-MAPA/SILI foram estatisticamente relevantes em comparação ao controle infectado.

Tabela 06 – Comparações post-hoc de Dunn com correção de Bonferroni dois a dois para cada tipo e combinação de drogas para o quantitativo total de ovos recuperados no fígado

Grupos	Diferença na soma dos postos	P < 0.05?
G1 - CDC vs G2 - PZQ	31,18	Sim

Grupos	Diferença na soma dos postos	P < 0.05?
G1 - CDC vs G3 - P-MAPA	15,38	Não
G1 - CDC vs G4 - PZQ/P-MAPA	19,92	Não
G1 - CDC vs G5 - SILI	25,67	Não
G1 - CDC vs G6 - SILI/PZQ	55,33	Sim
G1 - CDC vs G7 - SILI/P-MAPA	20,58	Não
G1 - CDC vs G8 - PZQ/P-MAPA/SILI	47,67	Sim
G2 - PZQ vs G3 - P-MAPA	-15,81	Não
G2 - PZQ vs G4 - PZQ/P-MAPA	-11,27	Não
G2 - PZQ vs G5 - SILI	-5,517	Não
G2 - PZQ vs G6 - SILI/PZQ	24,15	Não
G2 - PZQ vs G7 - SILI/P-MAPA	-10,60	Não
G2 - PZQ vs G8 - PZQ/P-MAPA/SILI	16,48	Não
G3 - P-MAPA vs G4 - PZQ/P-MAPA	4,542	Não
G3 - P-MAPA vs G5 - SILI	10,29	Não
G3 - P-MAPA vs G6 - SILI/PZQ	39,96	Sim
G3 - P-MAPA vs G7 - SILI/P-MAPA	5,208	Não
G3 - P-MAPA vs G8 - PZQ/P-MAPA/SILI	32,29	Sim
G4 - PZQ/P-MAPA vs G5 - SILI	5,750	Não
G4 - PZQ/P-MAPA vs G6 - SILI/PZQ	35,42	Sim
G4 - PZQ/P-MAPA vs G7 - SILI/P-MAPA	0,6667	Não
G4 - PZQ/P-MAPA vs G8 - PZQ/P-MAPA/SILI	27,75	Não
G5 - SILI vs G6 - SILI/PZQ	29,67	Não
G5 - SILI vs G7 - SILI/P-MAPA	-5,083	Não
G5 - SILI vs G8 - PZQ/P-MAPA/SILI	22,00	Não
G6 - SILI/PZQ vs G7 - SILI/P-MAPA	-34,75	Sim
G6 - SILI/PZQ vs G8 - PZQ/P-MAPA/SILI	-7,667	Não
G7 - SILI/P-MAPA vs G8 - PZQ/P-MAPA/SILI	27,08	Não

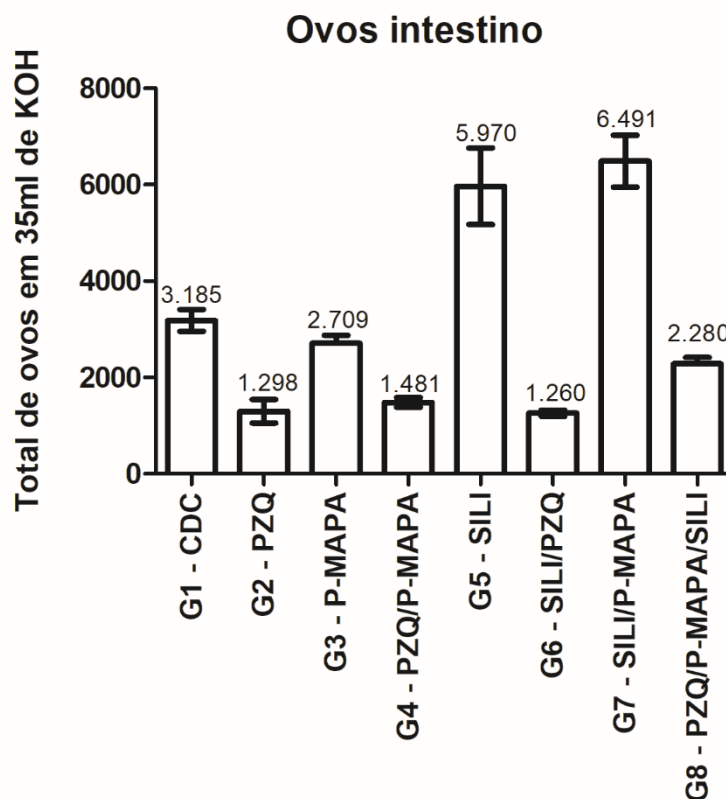
Fonte: A autora.

Legenda: CDC= controle doente crônico; PZQ= praziquantel; SILI= Silimarina.

6.2.4.2 Intestino

Na contagem geral de ovos, os grupos PZQ, PZQ/P-MAPA e SILI/PZQ apresentaram os menores quantitativos totais de ovos recuperados (Figura 30).

Figura 30 – Contagem geral de ovos no intestino



Fonte: A autora.

Legenda: CDC= controle doente crônico; PZQ= praziquantel; SILI= Silimarina.

Como pode ser visto na Tabela 07, quanto ao quantitativo total de ovos recuperados no intestino, apenas as reduções nos valores dos grupos SILI/PZQ e PZQ foi estatisticamente relevantes em comparação ao controle infectado.

Tabela 07 – Comparações post-hoc de Dunn com correção de Bonferroni dois a dois para cada tipo e combinação de drogas para o quantitativo total de ovos recuperados no intestino

Grupos	Diferença na soma dos postos	P < 0.05?
G1 - CDC vs G2 - PZQ	33,23	Sim
G1 - CDC vs G3 - P-MAPA	6,833	Não
G1 - CDC vs G4 - PZQ/P-MAPA	26,63	Não
G1 - CDC vs G5 - SILI	-12,50	Não
G1 - CDC vs G6 - SILI/PZQ	32,08	Sim
G1 - CDC vs G7 - SILI/P-MAPA	-13,92	Não
G1 - CDC vs G8 - PZQ/P-MAPA/SILI	12,33	Não

Grupos	Diferença na soma dos postos	P < 0.05?
G2 - PZQ vs G3 - P-MAPA	-26,40	Sim
G2 - PZQ vs G4 - PZQ/P-MAPA	-6,608	Não
G2 - PZQ vs G5 - SILI	-45,73	Sim
G2 - PZQ vs G6 - SILI/PZQ	-1,150	Não
G2 - PZQ vs G7 - SILI/P-MAPA	-47,15	Sim
G2 - PZQ vs G8 - PZQ/P-MAPA/SILI	-20,90	Não
G3 - P-MAPA vs G4 - PZQ/P-MAPA	19,79	Não
G3 - P-MAPA vs G5 - SILI	-19,33	Não
G3 - P-MAPA vs G6 - SILI/PZQ	25,25	Não
G3 - P-MAPA vs G7 - SILI/P-MAPA	-20,75	Não
G3 - P-MAPA vs G8 - PZQ/P-MAPA/SILI	5,500	Não
G4 - PZQ/P-MAPA vs G5 - SILI	-39,13	Sim
G4 - PZQ/P-MAPA vs G6 - SILI/PZQ	5,458	Não
G4 - PZQ/P-MAPA vs G7 - SILI/P-MAPA	-40,54	Sim
G4 - PZQ/P-MAPA vs G8 - PZQ/P-MAPA/SILI	-14,29	Não
G5 - SILI vs G6 - SILI/PZQ	44,58	Sim
G5 - SILI vs G7 - SILI/P-MAPA	-1,417	Não
G5 - SILI vs G8 - PZQ/P-MAPA/SILI	24,83	Não
G6 - SILI/PZQ vs G7 - SILI/P-MAPA	-46,00	Sim
G6 - SILI/PZQ vs G8 - PZQ/P-MAPA/SILI	-19,75	Não
G7 - SILI/P-MAPA vs G8 - PZQ/P-MAPA/SILI	26,25	Não

Fonte: A autora.

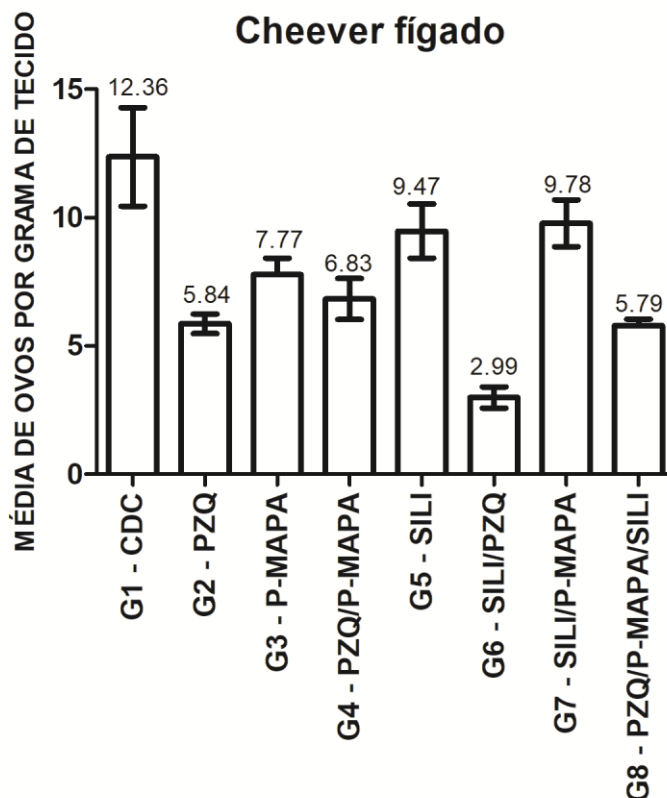
Legenda: CDC= controle doente crônico; PZQ= praziquantel; SILI= Silimarina.

6.2.5 Efeitos in vivo do Praziquantel, P-MAPA e Silimarina, isolados e combinados, no número de ovos / g de tecido (Cheever)

6.2.5.1 Cheever de Fígado

A combinação do Praziquantel com a Silimarina apresentou a maior redução da média de ovos por grama de tecido no fígado (2,99). Enquanto que sozinha (9,47) ou combinada ao P-MAPA (9,78), a Silimarina apresentou as maiores quantidade de ovos por grama de tecido (Figura 31).

Figura 31 – Cheever de Fígado



Fonte: A autora.

Legenda: CDC= controle doente crônico; PZQ= praziquantel; SILI= Silimarina.

Como pode ser visto na Tabela 08 no teste post hoc, quanto aos ovos contabilizados/grama de tecido, houve diferença estatística na redução entre as médias dos ovos nos grupos PZQ, SILI/PZQ, e PZQ/P-MAPA/SILI em comparação ao controle infectado.

Tabela 08 – Comparações post-hoc de Dunn com correção de Bonferroni dois a dois para cada tipo e combinação de drogas para todas as variáveis no cheever do fígado

Grupos	Diferença na soma dos postos	P < 0.05?
G1 - CDC vs G2 - PZQ	34,25	Sim
G1 - CDC vs G3 - P-MAPA	18,58	Não
G1 - CDC vs G4 - PZQ/P-MAPA	24,58	Não
G1 - CDC vs G5 - SILI	8,583	Não
G1 - CDC vs G6 - SILI/PZQ	51,17	Sim
G1 - CDC vs G7 - SILI/P-MAPA	6,750	Não
G1 - CDC vs G8 - PZQ/P-MAPA/SILI	35,33	Sim
G2 - PZQ vs G3 - P-MAPA	-15,67	Não

Grupos	Diferença na soma dos postos	P < 0.05?
G2 - PZQ vs G4 - PZQ/P-MAPA	-9,667	Não
G2 - PZQ vs G5 - SILI	-25,67	Não
G2 - PZQ vs G6 - SILI/PZQ	16,92	Não
G2 - PZQ vs G7 - SILI/P-MAPA	-27,50	Não
G2 - PZQ vs G8 - PZQ/P-MAPA/SILI	1,083	Não
G3 - P-MAPA vs G4 - PZQ/P-MAPA	6,000	Não
G3 - P-MAPA vs G5 - SILI	-10,00	Não
G3 - P-MAPA vs G6 - SILI/PZQ	32,58	Sim
G3 - P-MAPA vs G7 - SILI/P-MAPA	-11,83	Não
G3 - P-MAPA vs G8 - PZQ/P-MAPA/SILI	16,75	Não
G4 - PZQ/P-MAPA vs G5 - SILI	-16,00	Não
G4 - PZQ/P-MAPA vs G6 - SILI/PZQ	26,58	Não
G4 - PZQ/P-MAPA vs G7 - SILI/P-MAPA	-17,83	Não
G4 - PZQ/P-MAPA vs G8 - PZQ/P-MAPA/SILI	10,75	Não
G5 - SILI vs G6 - SILI/PZQ	42,58	Sim
G5 - SILI vs G7 - SILI/P-MAPA	-1,833	Não
G5 - SILI vs G8 - PZQ/P-MAPA/SILI	26,75	Não
G6 - SILI/PZQ vs G7 - SILI/P-MAPA	-44,42	Sim
G6 - SILI/PZQ vs G8 - PZQ/P-MAPA/SILI	-15,83	Não
G7 - SILI/P-MAPA vs G8 - PZQ/P-MAPA/SILI	28,58	Não

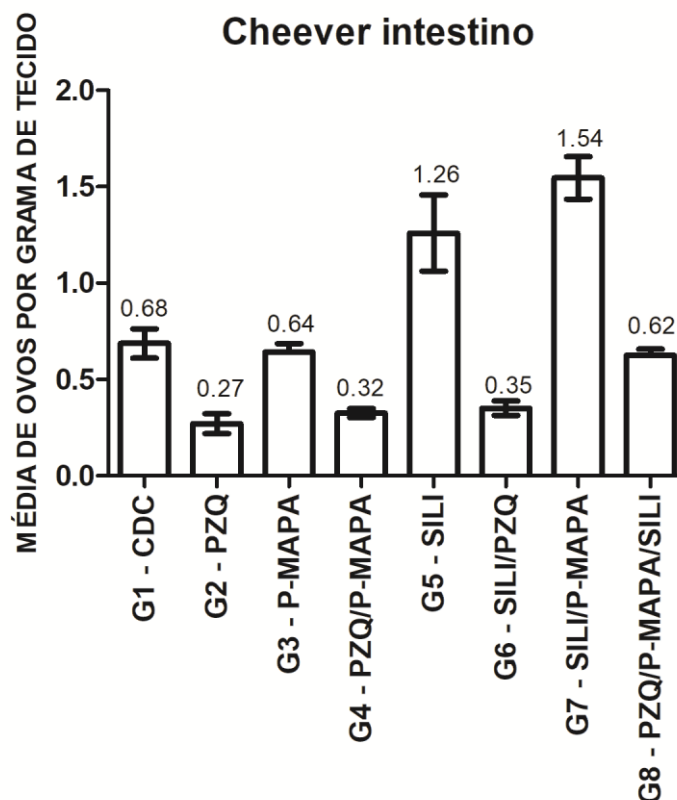
Fonte: A autora.

Legenda: CDC= controle doente crônico; PZQ= praziquantel; SILI= Silimarina.

6.2.4.2 Cheever de Intestino

O Praziquantel isolado (0,27) e combinado ao P-MAPA (0,32) e a Silimarina (0,35) apresentaram as maiores reduções da média de ovos por grama de tecido no intestino. Já a Silimarina sozinha (1,26) ou combinada ao P-MAPA (1,58), novamente apresentou as maiores médias de ovos por grama de tecido de intestino (Figura 32).

Figura 32 – Cheever de Intestino



Fonte: A autora.

Legenda: CDC= controle doente crônico; PZQ= praziquantel; SILI= Silimarina.

Como pode ser visto na Tabela 09, no teste post hoc, quanto aos ovos contabilizados/grama de tecido intestinal, apenas o grupo PZQ apresentou diferença estatística relevante na redução da média de ovos em comparação tanto ao controle infectado quanto entre as drogas.

Tabela 09 – Comparações post-hoc de Dunn com correção de Bonferroni dois a dois para cada tipo e combinação de drogas para todas as variáveis no cheever do Intestino.

Grupos	Diferença na soma dos postos	P < 0.05?
G1 - CDC vs G2 - PZQ	31,53	Sim
G1 - CDC vs G3 - P-MAPA	2,208	Não
G1 - CDC vs G4 - PZQ/P-MAPA	24,08	Não
G1 - CDC vs G5 - SILI	-13,75	Não
G1 - CDC vs G6 - SILI/PZQ	22,08	Não
G1 - CDC vs G7 - SILI/P-MAPA	-18,92	Não
G1 - CDC vs G8 - PZQ/P-MAPA/SILI	3,417	Não
G2 - PZQ vs G3 - P-MAPA	-29,33	Sim
G2 - PZQ vs G4 - PZQ/P-MAPA	-7,450	Não
G2 - PZQ vs G5 - SILI	-45,28	Sim

Grupos	Diferença na soma dos postos	P < 0.05?
G2 - PZQ vs G6 - SILI/PZQ	-9,450	Não
G2 - PZQ vs G7 - SILI/P-MAPA	-50,45	Sim
G2 - PZQ vs G8 - PZQ/P-MAPA/SILI	-28,12	Não
G3 - P-MAPA vs G4 - PZQ/P-MAPA	21,88	Não
G3 - P-MAPA vs G5 - SILI	-15,96	Não
G3 - P-MAPA vs G6 - SILI/PZQ	19,88	Não
G3 - P-MAPA vs G7 - SILI/P-MAPA	-21,13	Não
G3 - P-MAPA vs G8 - PZQ/P-MAPA/SILI	1,208	Não
G4 - PZQ/P-MAPA vs G5 - SILI	-37,83	Sim
G4 - PZQ/P-MAPA vs G6 - SILI/PZQ	-2,000	Não
G4 - PZQ/P-MAPA vs G7 - SILI/P-MAPA	-43,00	Sim
G4 - PZQ/P-MAPA vs G8 - PZQ/P-MAPA/SILI	-20,67	Não
G5 - SILI vs G6 - SILI/PZQ	35,83	Sim
G5 - SILI vs G7 - SILI/P-MAPA	-5,167	Não
G5 - SILI vs G8 - PZQ/P-MAPA/SILI	17,17	Não
G6 - SILI/PZQ vs G7 - SILI/P-MAPA	-41,00	Sim
G6 - SILI/PZQ vs G8 - PZQ/P-MAPA/SILI	-18,67	Não
G7 - SILI/P-MAPA vs G8 - PZQ/P-MAPA/SILI	22,33	Não

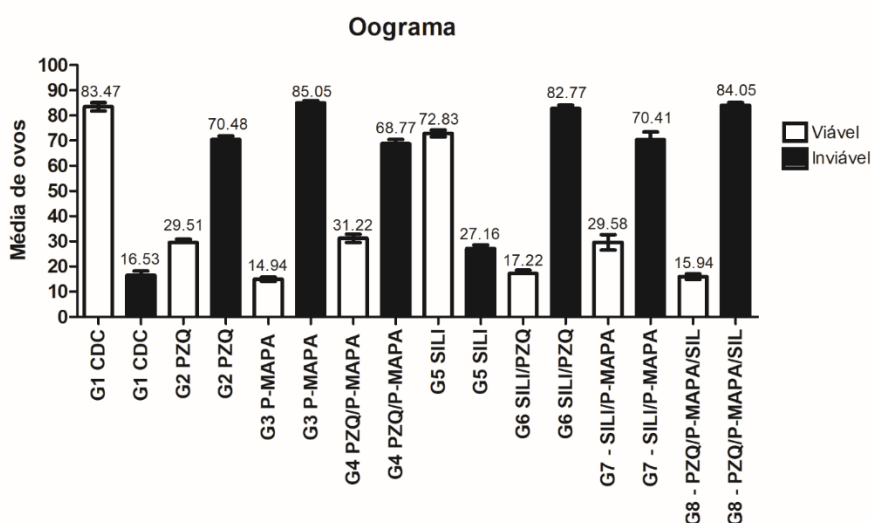
Fonte: A autora.

Legenda: CDC= controle doente crônico; PZQ= praziquantel; SILI= Silimarina.

6.2.5 Efeitos in vivo do Praziquantel, P-MAPA e Silimarina, isolados e combinados, na viabilidade de ovos de *S. mansoni* - Oograma

As análises de Oograma (Figura 33) foram feitas dividindo-se os grupos em ovos viáveis e ovos inviáveis.

Figura 33 - Oograma



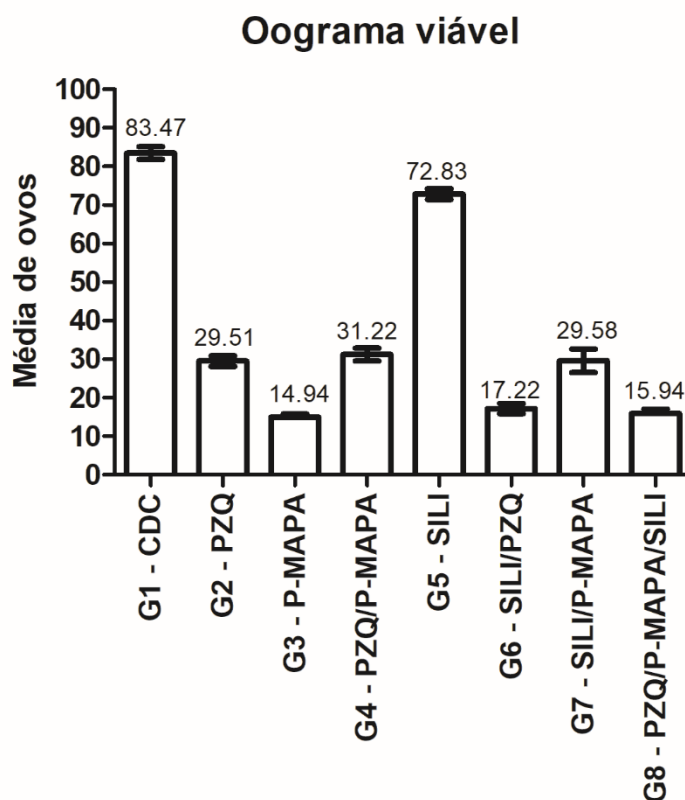
Fonte: A autora.

Legenda: Gráfico com as médias de ovos viáveis e inviáveis por grupo experimental. As barras brancas equivalem aos ovos viáveis, e as barras pretas aos ovos inviáveis. CDC= controle doente crônico; PZQ= praziquantel; SILI= Silimarina.

6.2.5.1 Ovos viáveis

A Silimarina (72.83) apresentou a maior média de ovos viáveis entre os grupos testados, quase igualando-se ao controle infectado (83.47). O grupo com menor quantidade de ovos viáveis foi o P-MAPA (14.94), seguido pelo grupo das três drogas combinadas (15.94) (Figura 34).

Figura 34 – Ovos viáveis



Fonte: A autora.

Legenda: CDC= controle doente crônico; PZQ= praziquantel; SILI= Silimarina.

Como pode ser visto na Tabela 10, quanto aos ovos viáveis contabilizados no intestino, não houve diferença estatística entre as médias dos ovos no grupo SILI em comparação ao controle infectado. Todos os demais grupos testados apresentaram notável redução de ovos viáveis, de forma que houve diferença estatística entre eles e o CDC e a SILI.

Tabela 10 – Comparações post-hoc de Dunn com correção de Bonferroni dois a dois para cada tipo e combinação de drogas para todas as variáveis no oograma de ovos viáveis

Grupos	Diferença na soma dos postos	P < 0.05?
G1 CDC vs G2 PZQ	74,75	Sim
G1 CDC vs G3 P-MAPA	143,5	Sim
G1 CDC vs G4 PZQ/P-MAPA	72,14	Sim
G1 CDC vs G5 SILI	13,50	Não
G1 CDC vs G6 SILI/PZQ	133,9	Sim
G1 CDC vs G7 SILI/P-MAPA	87,40	Sim
G1 CDC vs G8 PZQ/P-MAPA/SIL	136,6	Sim
G2 PZQ vs G3 P-MAPA	68,72	Sim
G2 PZQ vs G4 PZQ/P-MAPA	-2,616	Não
G2 PZQ vs G5 SILI	-61,25	Sim
G2 PZQ vs G6 SILI/PZQ	59,11	Sim
G2 PZQ vs G7 SILI/P-MAPA	12,65	Não
G2 PZQ vs G8 PZQ/P-MAPA/SIL	61,86	Sim
G3 P-MAPA vs G4 PZQ/P-MAPA	-71,33	Sim
G3 P-MAPA vs G5 SILI	-130,0	Sim
G3 P-MAPA vs G6 SILI/PZQ	-9,611	Não
G3 P-MAPA vs G7 SILI/P-MAPA	-56,07	Sim
G3 P-MAPA vs G8 PZQ/P-MAPA/SIL	-6,861	Não
G4 PZQ/P-MAPA vs G5 SILI	-58,64	Sim
G4 PZQ/P-MAPA vs G6 SILI/PZQ	61,72	Sim
G4 PZQ/P-MAPA vs G7 SILI/P-MAPA	15,26	Não
G4 PZQ/P-MAPA vs G8 PZQ/P-MAPA/SIL	64,47	Sim
G5 SILI vs G6 SILI/PZQ	120,4	Sim
G5 SILI vs G7 SILI/P-MAPA	73,90	Sim
G5 SILI vs G8 PZQ/P-MAPA/SIL	123,1	Sim
G6 SILI/PZQ vs G7 SILI/P-MAPA	-46,46	Não
G6 SILI/PZQ vs G8 PZQ/P-MAPA/SIL	2,750	Não
G7 SILI/P-MAPA vs G8 PZQ/P-MAPA/SIL	49,21	Não

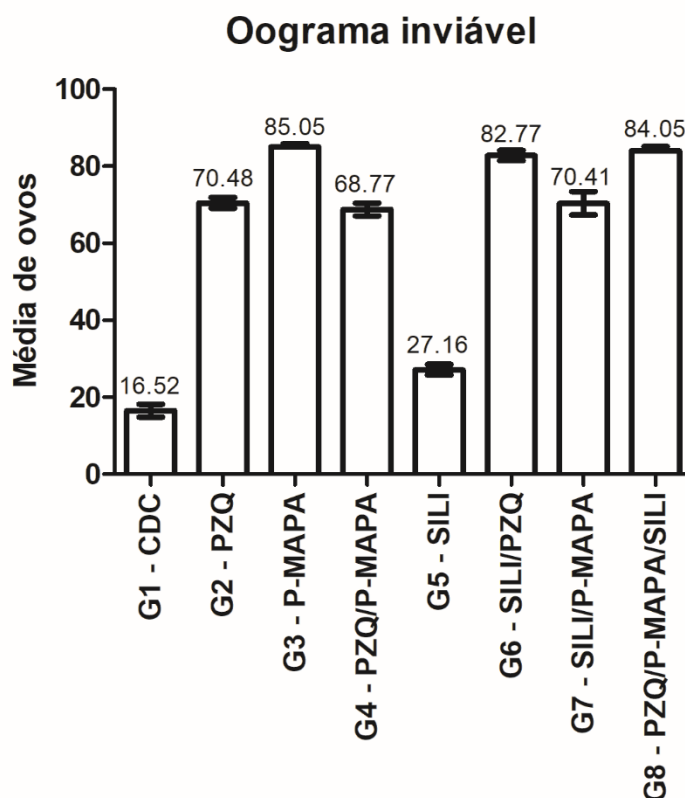
Fonte: A autora.

Legenda: CDC= controle doente crônico; PZQ= praziquantel; SILI= Silimarina.

6.2.5.2 Ovos inviáveis

Os ovos não viáveis são originados pela soma dos ovos mortos e imaturos. Como esperado, a Silimarina (27.16) apresentou a menor média de ovos inviáveis entre os grupos testados, com destaque de maior quantitativos de ovos inviáveis para o P-MAPA (85.05) e PZQ/P-MAPA/SILI (84.05) (Figura 35).

Figura 35 – Ovos inviáveis



Fonte: A autora.

Legenda: CDC= controle doente crônico; PZQ= praziquantel; SILI= Silimarina.

Como pode ser visto na Tabela 11, no teste post hoc, quanto aos ovos inviáveis contabilizados no intestino, novamente não houve diferença estatística entre as médias dos ovos no grupo SILI em comparação ao controle infectado.

Tabela 11 – Comparações post-hoc de Dunn com correção de Bonferroni dois a dois para cada tipo e combinação de drogas para todas as variáveis no oograma de ovos inviáveis.

Grupos	Diferença na soma dos postos	P < 0.05?
G1 CDC vs G2 PZQ	-74,75	Sim
G1 CDC vs G3 P-MAPA	-143,5	Sim
G1 CDC vs G4 PZQ/P-MAPA	-72,14	Sim
G1 CDC vs G5 SILI	-13,50	Não
G1 CDC vs G6 SILI/PZQ	-133,9	Sim
G1 CDC vs G7 SILI + P-MAPA	-87,40	Sim
G1 CDC vs G8 PZQ/P-MAPA/SILI	-136,6	Sim
G2 PZQ vs G3 P-MAPA	-68,72	Sim
G2 PZQ vs G4 PZQ/P-MAPA	2,616	Não

Grupos	Diferença na soma dos postos	P < 0.05?
G2 PZQ vs G5 SILI	61,25	Sim
G2 PZQ vs G6 SILI/PZQ	-59,11	Sim
G2 PZQ vs G7 SILI + 'P-MAPA	-12,65	Não
G2 PZQ vs G8 PZQ/P-MAPA/SILI	-61,86	Sim
G3 P-MAPA vs G4 PZQ/P-MAPA	71,33	Sim
G3 P-MAPA vs G5 SILI	130,0	Sim
G3 P-MAPA vs G6 SILI/PZQ	9,611	Não
G3 P-MAPA vs G7 SILI + 'P-MAPA	56,07	Sim
G3 P-MAPA vs G8 PZQ/P-MAPA/SILI	6,861	Não
G4 PZQ/P-MAPA vs G5 SILI	58,64	Sim
G4 PZQ/P-MAPA vs G6 SILI/PZQ	-61,72	Sim
G4 PZQ/P-MAPA vs G7 SILI + 'P-MAPA	-15,26	Não
G4 PZQ/P-MAPA vs G8 PZQ/P-MAPA/SILI	-64,47	Sim
G5 SILI vs G6 SILI/PZQ	-120,4	Sim
G5 SILI vs G7 SILI + 'P-MAPA	-73,90	Sim
G5 SILI vs G8 PZQ/P-MAPA/SILI	-123,1	Sim
G6 SILI/PZQ vs G7 SILI + 'P-MAPA	46,46	Não
G6 SILI/PZQ vs G8 PZQ/P-MAPA/SILI	-2,750	Não
G7 SILI + 'P-MAPA vs G8 PZQ/P-MAPA/SILI	-49,21	Não

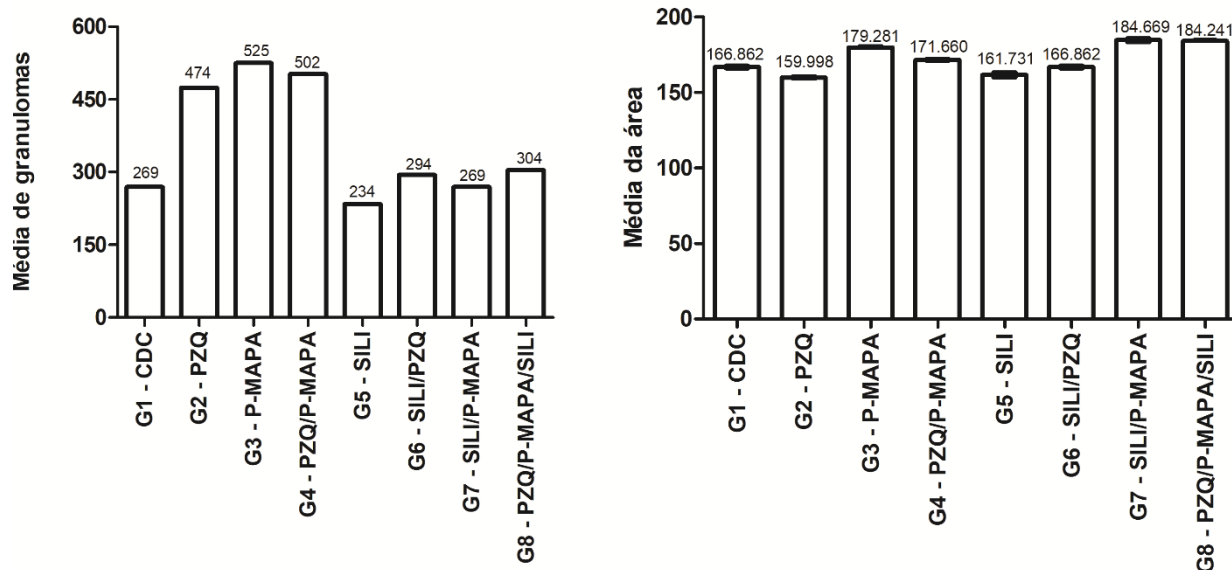
Fonte: A autora.

Legenda: CDC= controle doente crônico; PZQ= praziquantel; SILI= Silimarina.

6.2.6 Análise histohepática

Com relação as quantidades e aos tamanhos dos granulomas (Figura 36), PZQ apesar de uma quantidade elevada de granulomas, foi o que apresentou menor média de área. Seguido pela SILI com a menor quantidade e o menor tamanho de granulomas.

Figura 36 – Quantidade e Médias de Áreas dos Granulomas
Quantidade granulomas



Fonte: A autora.

Legenda: Gráficos com os tamanhos e as quantidades de granulomas por grupo experimental. CDC= controle doente crônico; PZQ= praziquantel; SILI= Silimarina.

SILI/P-MAPA e PZQ/P-MAPA/SILI apesar de um quantitativo de granulomas próximo ao do controle doente infectado, apresentou as maiores áreas.

Tabela 12 – Quantidades e médias de áreas dos granulomas por grupo experimental

GRUPO	NÚMERO TOTAL	MÉDIA POR GRUPO	MÉDIA ÁREA	ÁREA MÍNIMA
CDC	269	45	166.862	122.715
PZQ	474	47	159.998	97.970
P-MAPA	525	44	179.281	127.701
PZQ/P-MAPA	502	42	171.660	142.512
SILI	234	39	161.731	132.244
SILI/ PZQ	294	49	166.862	135.087
SILI/ P-MAPA	269	34	184,669	122.715
PZQ/P-MAPA/SILI	304	50	184.241	129.163

Fonte: A autora.

Legenda: CDC= controle doente crônico; PZQ= praziquantel; SILI= Silimarina.

Com as três drogas em estudo associadas, os granulomas apresentaram tamanhos variados, mas com áreas de granulomas confluentes. Chama-se atenção a granulomas bem marcados, fibrosados, sem área central demarcada. Em comparação ao controle infectado, houve variação significativa na redução dos tamanhos dos granulomas no grupo do PZQ, apenas. Enquanto que nos grupos P-MAPA, PZQ/P-MAPA, SILI/P-MAPA e PZQ/P-MAPA/SILI, também houve variação estatística, mas em relação ao aumento no tamanho dos granulomas (Tabela 13).

Tabela 13 – Comparações post-hoc de Dunn com correção de Bonferroni dois a dois para cada tipo e combinação de drogas para todas as variáveis no tamanho dos granulomas

Grupos	Diferença na soma dos postos	P < 0.05?
G1 CDC vs G2 PZQ	299,1	Sim
G1 CDC vs G3 P-MAPA	-589,1	Sim
G1 CDC vs G4 PZQ/P-MAPA	-222,3	Sim
G1 CDC vs G5 SILI	16,62	Não
G1 CDC vs G6 SILI/PZQ	0,0	Não
G1 CDC vs G7 SILI + P-MAPA	-813,8	Sim
G1 CDC vs G8 PZQ/P-MAPA/SILI	-824,5	Sim
G2 PZQ vs G3 P-MAPA	-888,3	Sim
G2 PZQ vs G4 PZQ/P-MAPA	-521,5	Sim
G2 PZQ vs G5 SILI	-282,5	Sim
G2 PZQ vs G6 SILI/PZQ	-299,1	Sim
G2 PZQ vs G7 SILI + P-MAPA	-1113	Sim
G2 PZQ vs G8 PZQ/P-MAPA/SILI	-1124	Sim
G3 P-MAPA vs G4 PZQ/P-MAPA	366,8	Sim
G3 P-MAPA vs G5 SILI	605,7	Sim
G3 P-MAPA vs G6 SILI/PZQ	589,1	Sim
G3 P-MAPA vs G7 SILI + P-MAPA	-224,7	Não
G3 P-MAPA vs G8 PZQ/P-MAPA/SILI	-235,4	Sim
G4 PZQ/P-MAPA vs G5 SILI	238,9	Sim
G4 PZQ/P-MAPA vs G6 SILI/PZQ	222,3	Sim
G4 PZQ/P-MAPA vs G7 SILI + P-MAPA	-591,5	Sim
G4 PZQ/P-MAPA vs G8 PZQ/P-MAPA/SILI	-602,2	Sim
G5 SILI vs G6 SILI/PZQ	-16,62	Não
G5 SILI vs G7 SILI + P-MAPA	-830,4	Sim
G5 SILI vs G8 PZQ/P-MAPA/SILI	-841,1	Sim
G6 SILI/PZQ vs G7 SILI + P-MAPA	-813,8	Sim
G6 SILI/PZQ vs G8 PZQ/P-MAPA/SILI	-824,5	Sim
G7 SILI + P-MAPA vs G8 PZQ/P-MAPA/SILI	-10,71	Não

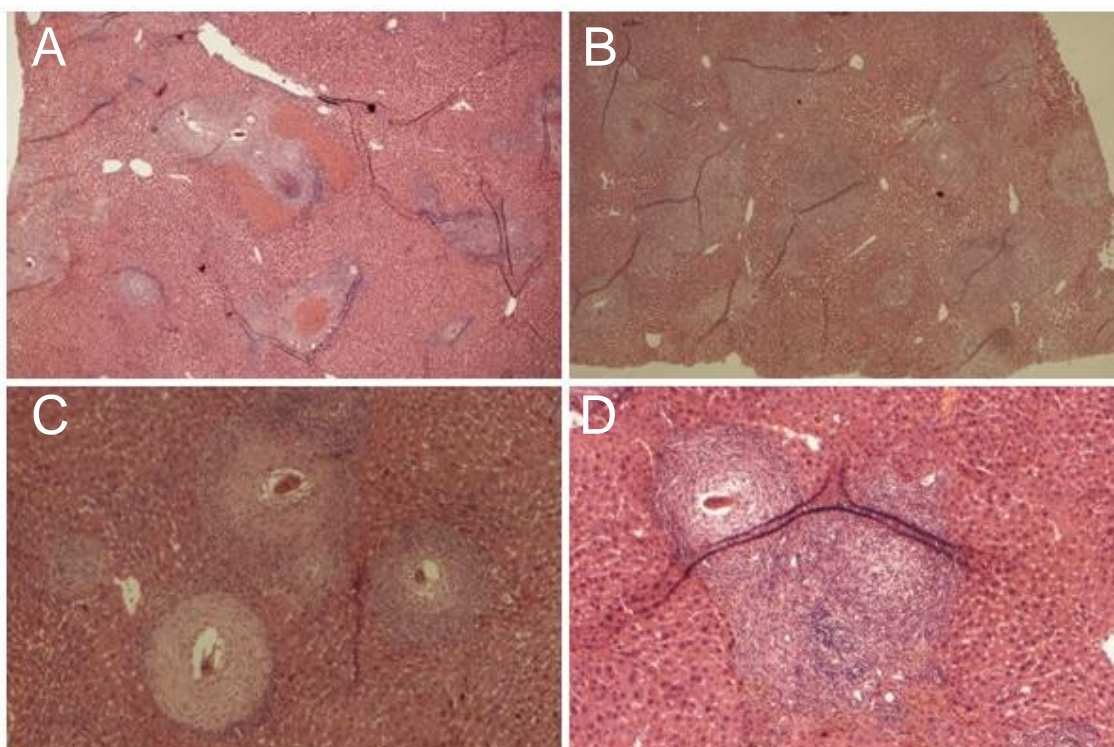
Fonte: A autora.

Legenda: CDC= controle doente crônico; PZQ= praziquantel; SILI= Silimarina.

6.2.6.1 Histologia de tratamento com Praziquantel

Histologia de fígado destaca-se pela vasta quantidade de granulomas bem marcados, pouco aglomerados, com ausência e presença de ovos no centro, mas com intensos focos de necroses coagulativas, com granulomas já fibrosados e alguns fibrosados (Figura 37).

Figura 37 – Fotomicrografia de histologia hepática do grupo infectado e tratado com Praziquantel



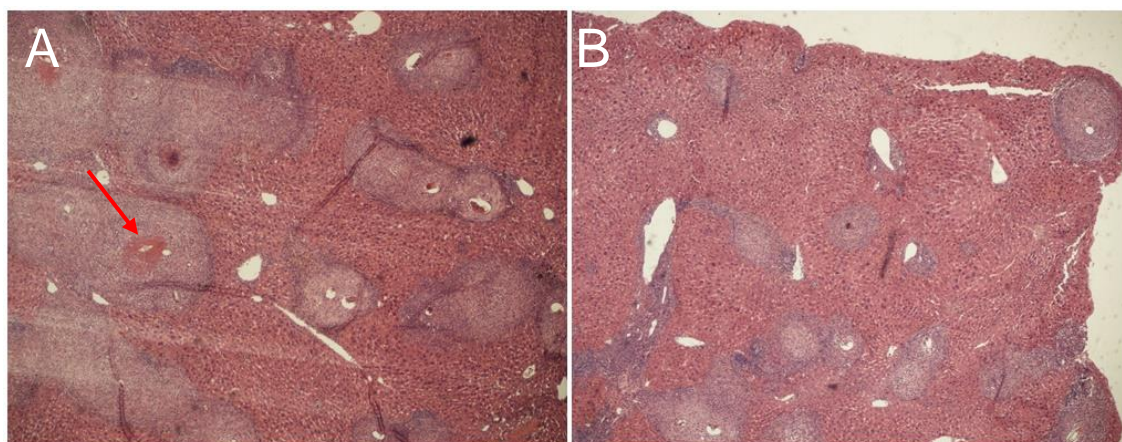
Fonte: A autora.

Legenda: A – Granulomas isolados fibrosos periportais com áreas de necrose aguda coagulativa; B – sem ovo centralizado a direita (HE– 4x). C – Granulomas periportais isolados; D – Aglomerado a direita, ambos fibrosos (HE– 40x).

6.1.6.2 Histologia de tratamento com P-MAPA

No grupo infectado e tratado com o P-MAPA, eutanasiado com 68 dias, observou-se um grande número de granulomas com ovos íntegros centralizados nas lâminas de fígado. A estrutura do parênquima hepático não apresentou alterações degenerativas importantes, exceto eventuais focos de necrose coagulativa aguda (Figura 38), presença intensa de infiltração local por polimorfonucleares, sobretudo do subtipo eosinófilo.

Figura 38 - Fotomicrografia de histologia hepática do grupo infectado e tratado com P-MAPA

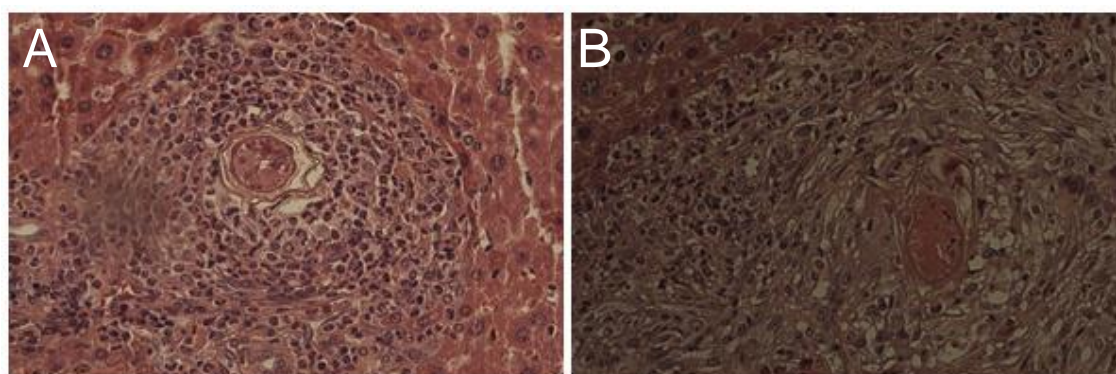


Fonte: A autora.

Legenda: A, B – Granulomas isolados e confluentes fibrosos periovulares, com áreas de necrose aguda coagulativa (indicada nas seta) (HE– 4x)

Os granulomas esquistossomóticos periovulares são bastante numerosos, destacando-se agrupamentos em confluentes em sua maioria, como também isolados, distribuídos esparsamente pelo parênquima e, em sua maioria, compostos predominantemente por polimorfonucleares (eosinófilos e neutrófilos), além de alguns macrófagos. Em muitos desses granulomas existia a deposição de pequena quantidade de colágeno, bem como áreas de necrose aguda coagulativa (Figura 39).

Figura 39 - Fotomicrografia aproximada de histologia hepática do grupo infectado e tratado com P-MAPA



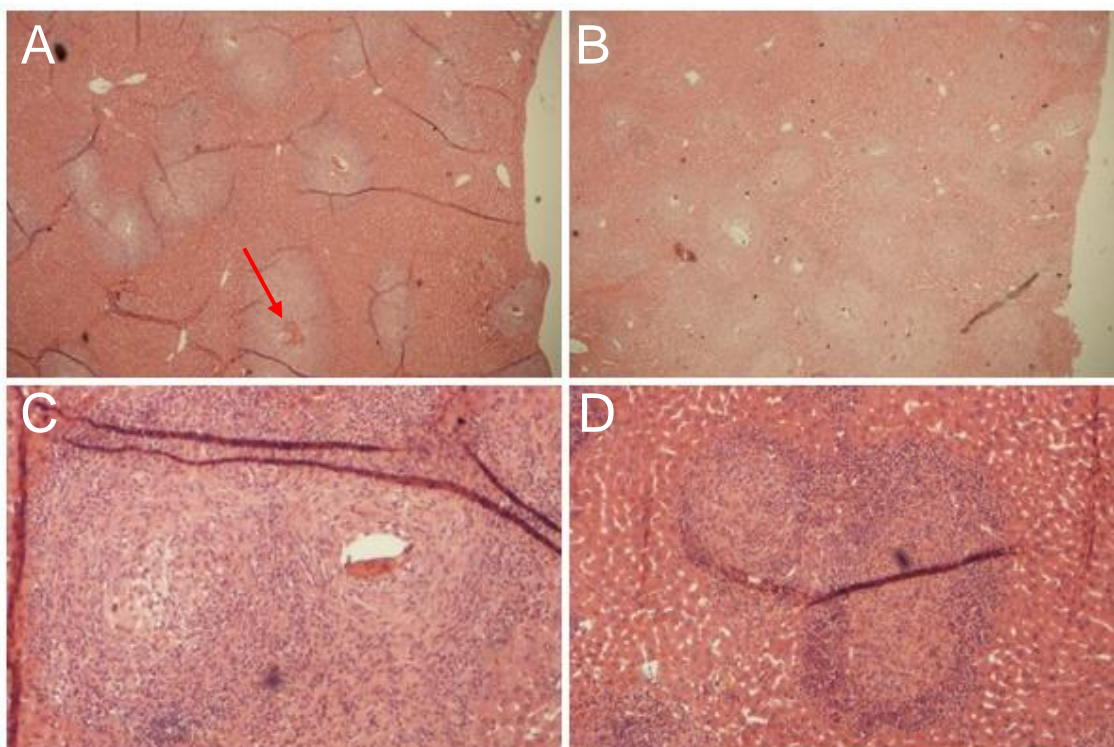
Fonte: A autora.

Legenda: A – Detalhe dos granulomas periovulares, observados em maior aumento (400x). Presença intensa de mononucleares em torno do ovo em degeneração. B – Ovo bem marcado com granuloma colagenizado (HE– 40x).

6.2.6.3 Histologia de tratamento com Praziquantel/P-MAPA

Neste grupo, observou-se um perfil histológico semelhante ao tratamento com o P-MAPA isolado. Grande número de granulomas esquistossomóticos periovulares, agrupamentos em confluente em sua maioria, como também isolados, distribuídos esparsamente pelo parênquima hepático. Alguns poucos focos de necrose coagulativa aguda, e muitos desses granulomas já com deposição de colágeno. Presença na periferia dos granulomas de polimorfonucleares (eosinófilos e neutrófilos), além de alguns macrófagos (Figura 40).

Figura 40 - Fotomicrografia de histologia hepática do grupo infectado e tratado com Praziquantel/P-MAPA



Fonte: A autora.

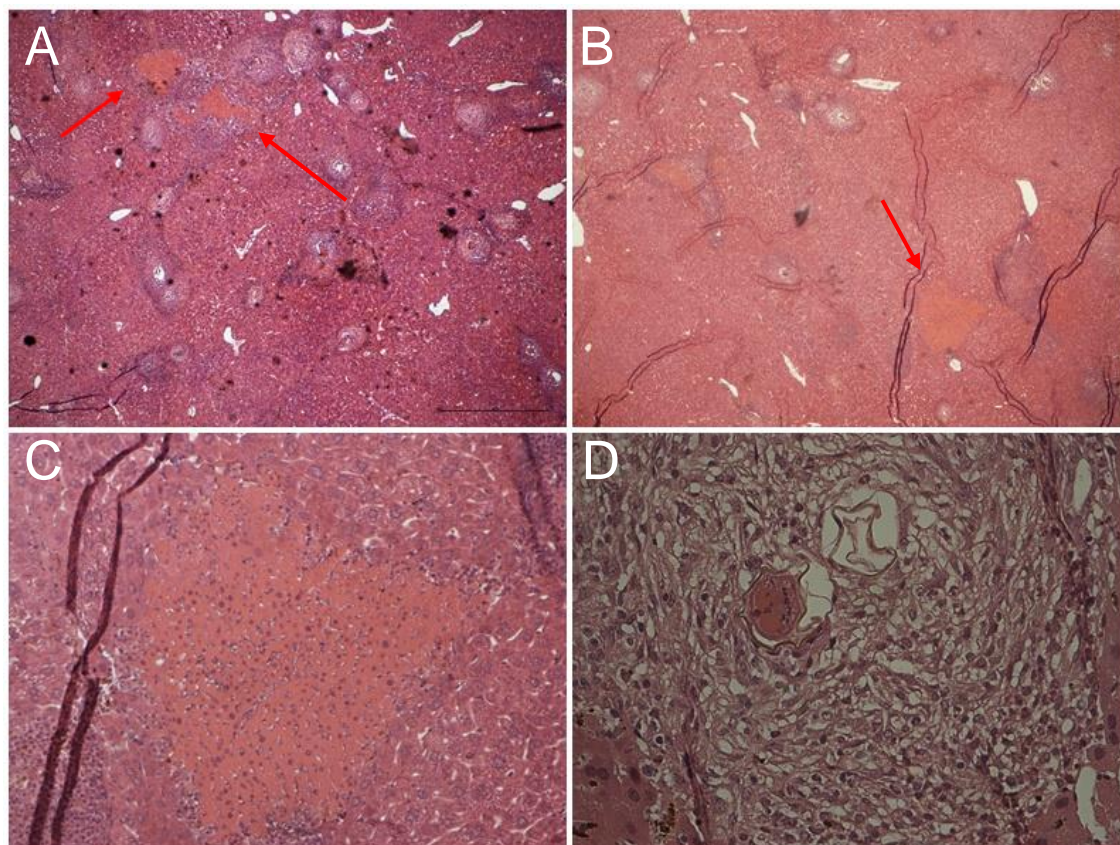
Legenda: A, B – Granulomas isolados e confluentes fibrosos periovulares, com áreas de necrose aguda coagulativa (indicada nas seta) (HE – 4x) C, D - Granulomas confluentes periovulares, ambos fibrosados e com áreas de necrose coagulativa tomando o campo da imagem (HE – 40x).

6.2.6.4 Histologia de tratamento com Silimarina

Nos grupos infectados e tratados com a Silimarina, os granulomas são os de menor área de diâmetro, porém com presença de ovos íntegros ou semi degenerados nos centros das estruturas. Há áreas de necrose coagulativa e a grande

maioria dos granulomas já estão com colágeno em sua estrutura, o que reduz o infiltrado celular mononuclear (Figura 41).

Figura 41 – Fotomicrografia de histologia hepática do grupo infectado e tratado com Silimarina



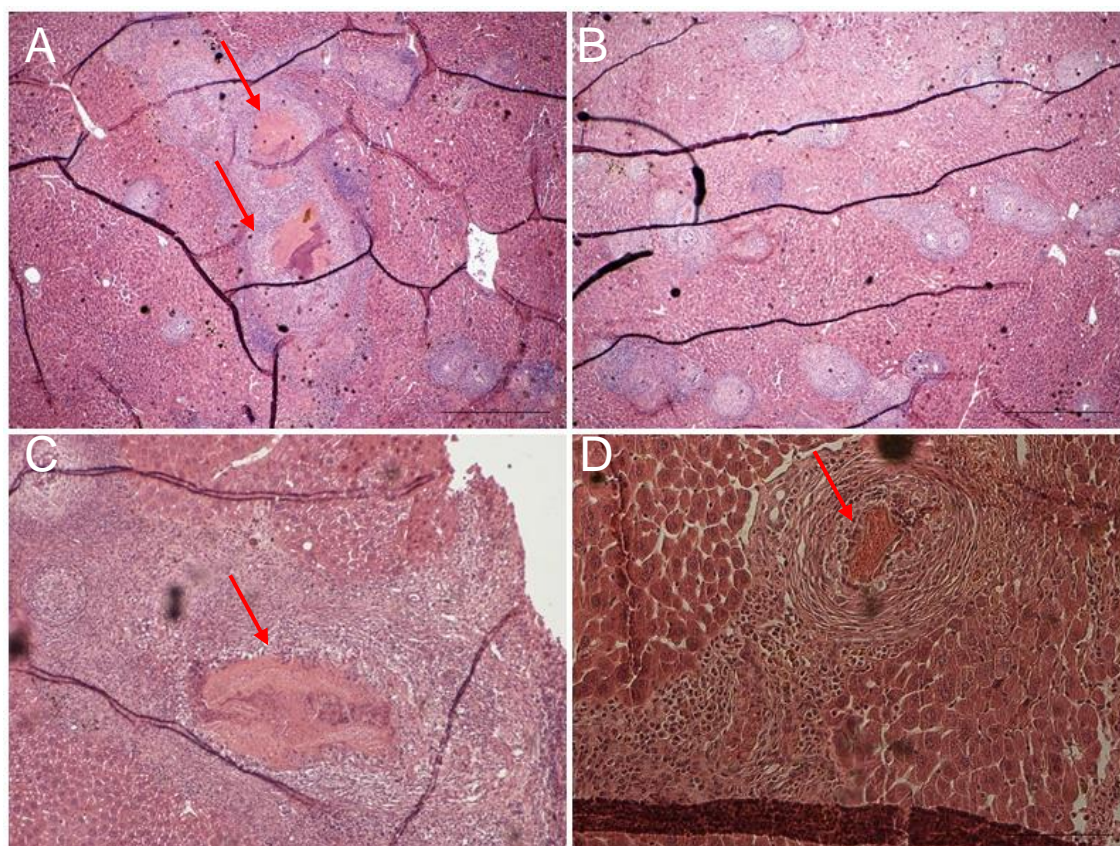
Fonte: A Autora.

Legenda: A, B – Granulomas isolados e confluentes fibrosos periovulares, com áreas de necrose aguda coagulativa (indicadas nas setas) (HE – 4x) C – Vasta área de necrose coagulativa aguda; D – Granuloma periportal fibrosado (HE – 40x).

6.2.6.5 Histologia de tratamento com Silimarina/Praziquantel

A estrutura do parênquima hepático não apresentou alterações degenerativas importantes, exceto focos de necrose coagulativa aguda de vasta extensão. Destaca-se pelo grande número de granulomas confluentes, centros bem marcados e colágeno em grande parte dos granulomas. Presença na periferia dos granulomas de polimorfonucleares (eosinófilos e neutrófilos), além de alguns macrófagos (Figura 42).

Figura 42 – Fotomicrografia de histologia hepática do grupo infectado e tratado com Silimarina/Praziquantel



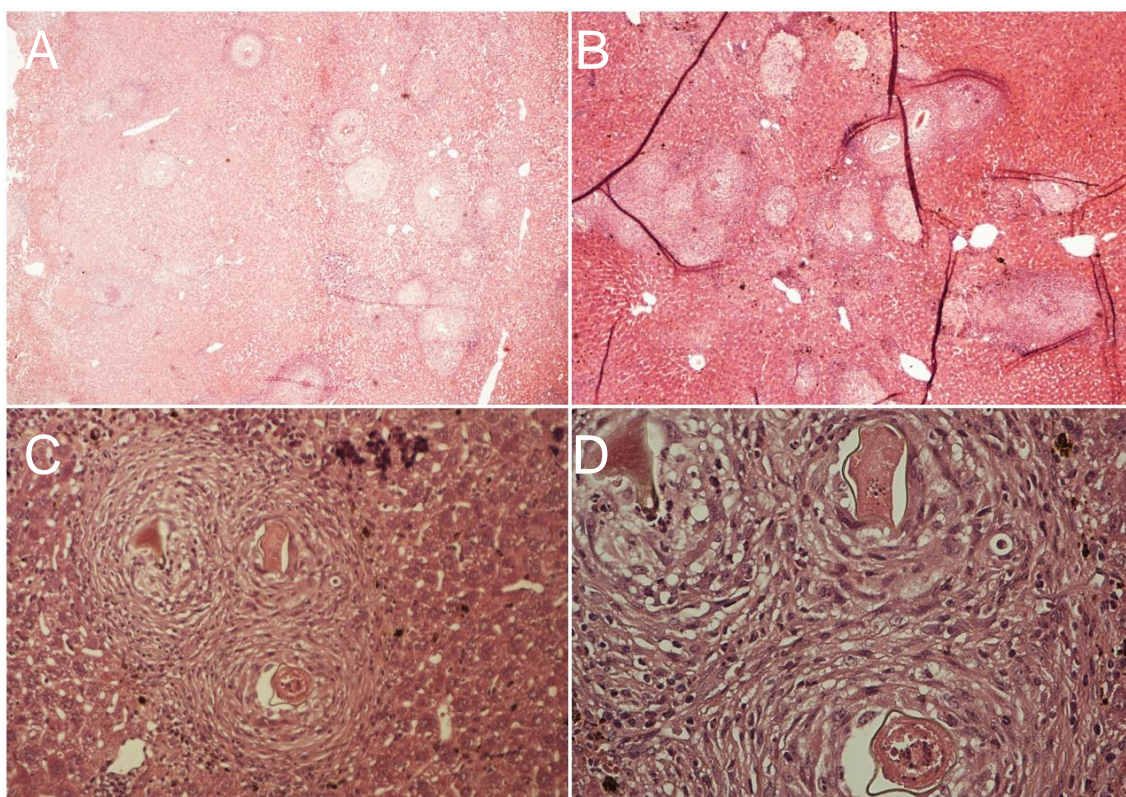
Fonte: A Autora.

Legenda: A,B – Granulomas confluentes fibrosos periovulares, com áreas de necrose aguda coagulativa (indicadas nas setas) (HE – 4x) C, D – Vasta área de necrose coagulativa aguda no centro dos granulomas fibrosados (HE – 40x).

6.2.6.6 Histologia de tratamento com Silimarina/P-MAPA

Os granulomas esquistossomóticos periovulares são bastante numerosos, destacando-se agrupamentos em confluentes em sua maioria. Porém, há também granulomas isolados, de área bem definida, apresentando ovos em degeneração no centro do granuloma e intensa presença de infiltrados polimorfonucleares e macrófagos. Estão distribuídos esparsamente pelo parênquima, compostos predominantemente por polimorfonucleares (eosinófilos e neutrófilos), além de alguns macrófagos. Em muitos desses granulomas existia intensa deposição de colágeno, outros já estavam totalmente fibrosados, e também com áreas de necrose aguda coagulativa (Figura 43).

Figura 43 - Fotomicrografia de histologia hepática do grupo infectado e tratado com SILIMARINA/P-MAPA



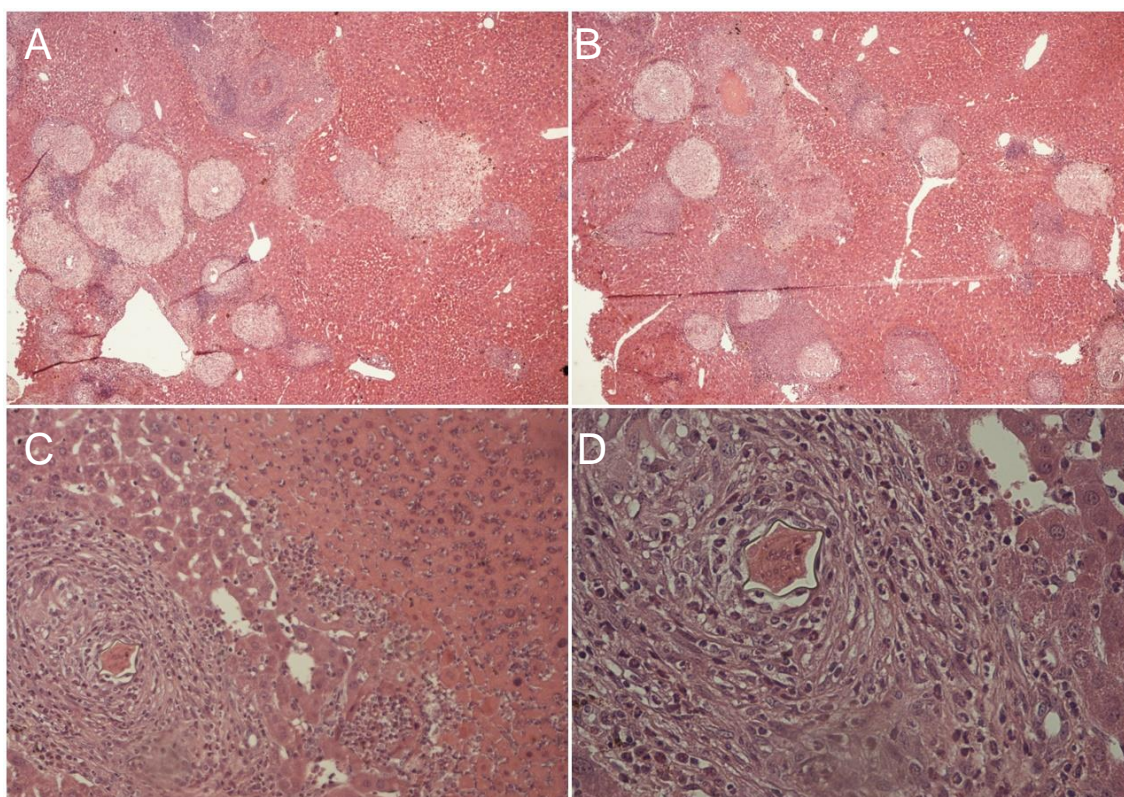
Fonte: A Autora.

Legenda: A, B – Granulomas isolados e confluentes fibrosos periportais (HE – 4x) C, D – Granulomas periportais fibrosados e confluentes com ovos íntegros (HE – 40x).

6.2.6.7 Histologia de tratamento com Praziquantel/P-MAPA/Silimarina

Histologia de fígado destaca-se pela vasta quantidade de granulomas bem marcados, com poucos focos de confluência, presença de ovos em degeneração no centro, e intensos focos de necrose coagulativa, algumas inclusive dentro dos granuloma. Nota-se a presença de granulomas já fibrosados e comparecimento de polimorfonucleares e macrófagos tanto nos granulomas como nas áreas de necrose (Figura 44).

Figura 44 – Fotomicrografia de histologia hepática do grupo infectado e tratado com Praziquantel/P-MAPA/Silimarina



Fonte: A autora.

Legenda: A, B – Granulomas isolados e confluentes, com intensa fibrose (HE – 4x) C – Granuloma periovular fibrosados com ovo íntegro e necrose coagulativa aguda (HE – 20x) D – Detalhe de granuloma periovular fibrosados com ovo íntegro.

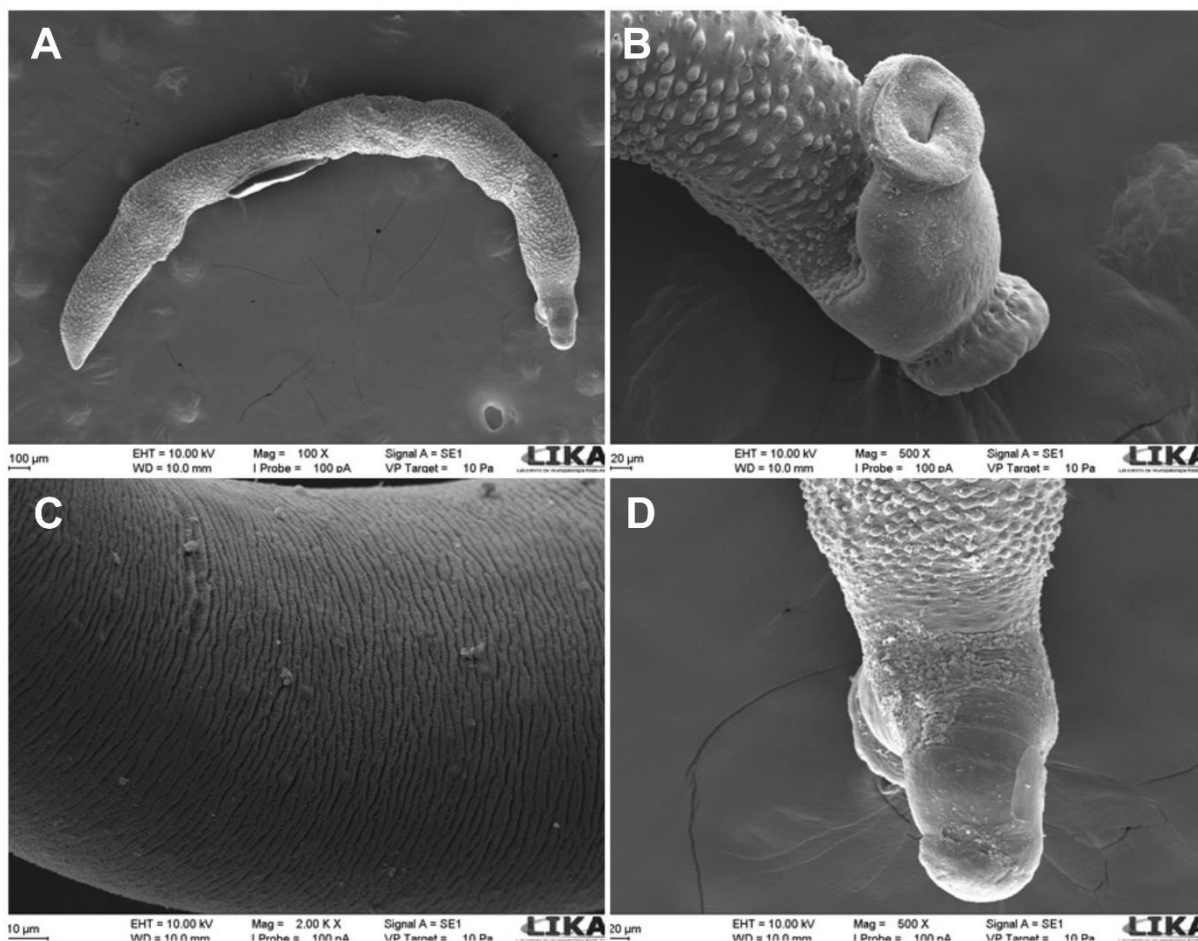
6.2.7 Microscopia eletrônica de varredura dos vermes adultos

A associação do PZQ com o P-MAPA apresentou os maiores danos teciduais no tegumento dos vermes.

6.2.7.1 Microscopia eletrônica de varredura de vermes adultos sem tratamento

O grupo controle infectado sem tratamento foi tratado com o DMSO, que foi o veículo de diluição das três drogas. As imagens mostram que o DMSO não causou danos aos vermes após metabolização, pois não foi observado nenhum tipo de lesão, tumoração ou aprofundamento no tegumento (Figura 45).

Figura 45 – Fotomicrografia eletrônica de varredura de vermes adultos de *S. mansoni*



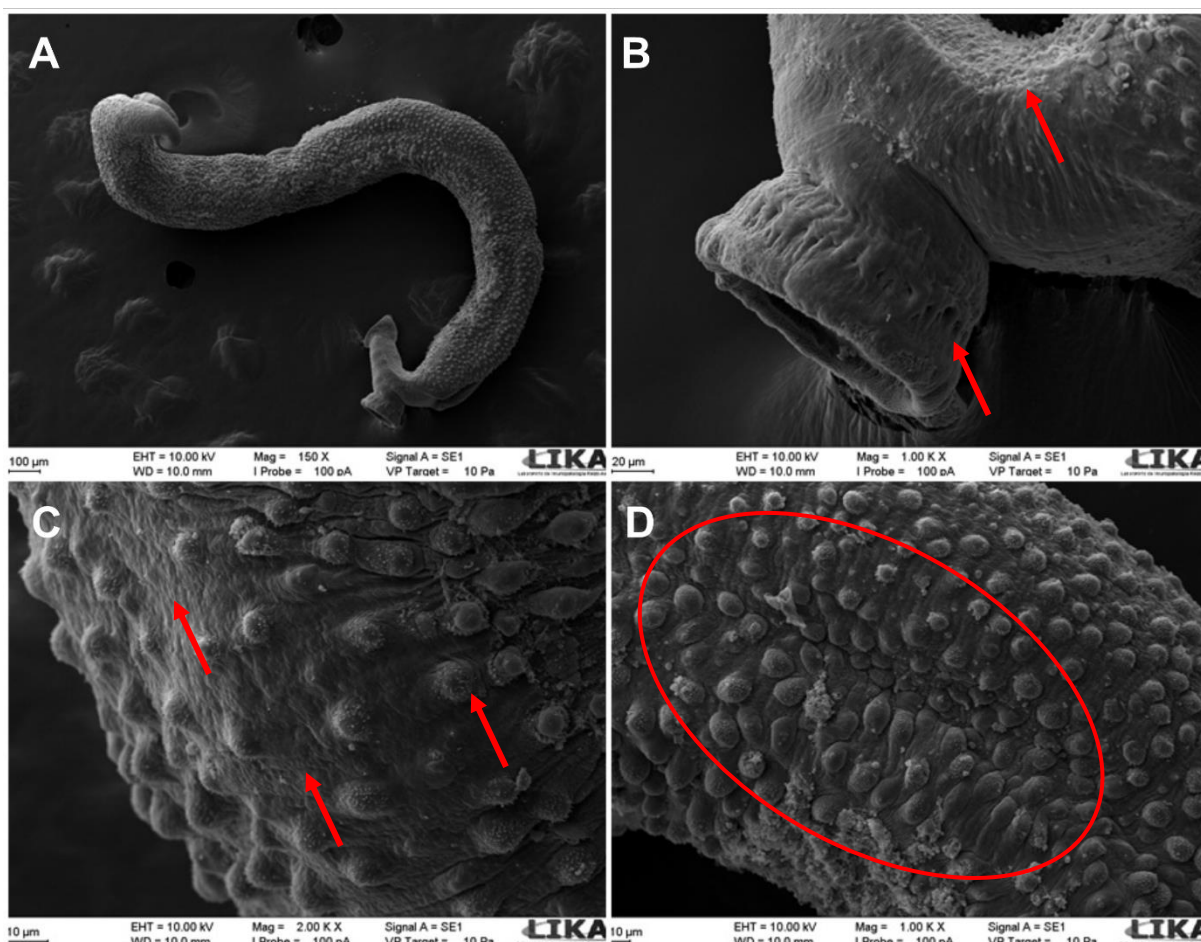
Fonte: A autora.

Legenda: A – Verme inteiro, utilizado apenas DMSO; B – Boca do parasito com tegumento íntegro C, D –Tegumento íntegro.

6.2.7.2 Microscopia eletrônica de varredura de vermes adultos tratados com Praziquantel

Na figura 46 nota-se o verme retorcido (A), com presença discreta de dano ao tegumento (B), enrugamentos (C), aprofundamentos (D), e alongamentos de tubérculos (D), bem como a perda de espículas (C, D).

Figura 46 – Fotomicrografia eletrônica de varredura de vermes adultos de *S. mansoni* tratados com Praziquantel



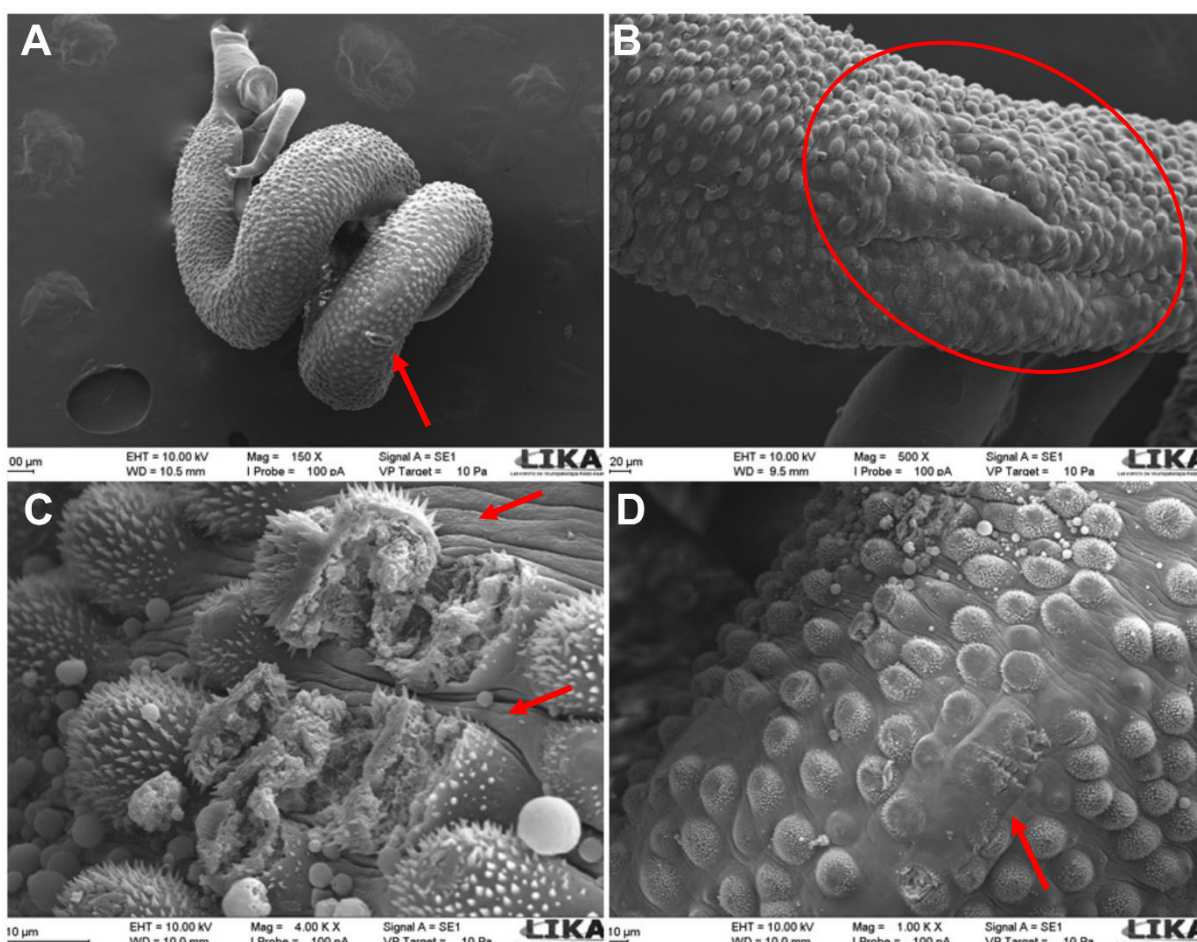
Fonte: A autora.

Legenda: A – Verme inteiro retrorcido; B – Discreto dano ao tegumento; C – Enrugamento e perda de espículas; D – Aprofundamentos, alongamentos de tubérculos e perda de espículas.

6.2.7.3 Microscopia eletrônica de varredura de vermes adultos tratados com P-MAPA

Neste grupo, houve uma intensa recuperação de quantitativo de vermes. Destaca-se, também, que houve uma intensa ação do P-MAPA sobre os vermes onde vê-se retração do casal de verme (A), tumorações e aprofundamento do tegumento (B), destruição das espículas e tubérculos (C, D) (Figura 47).

Figura 47 – Fotomicrografia eletrônica de varredura de vermes adultos de *S. mansoni* tratados com P-MAPA



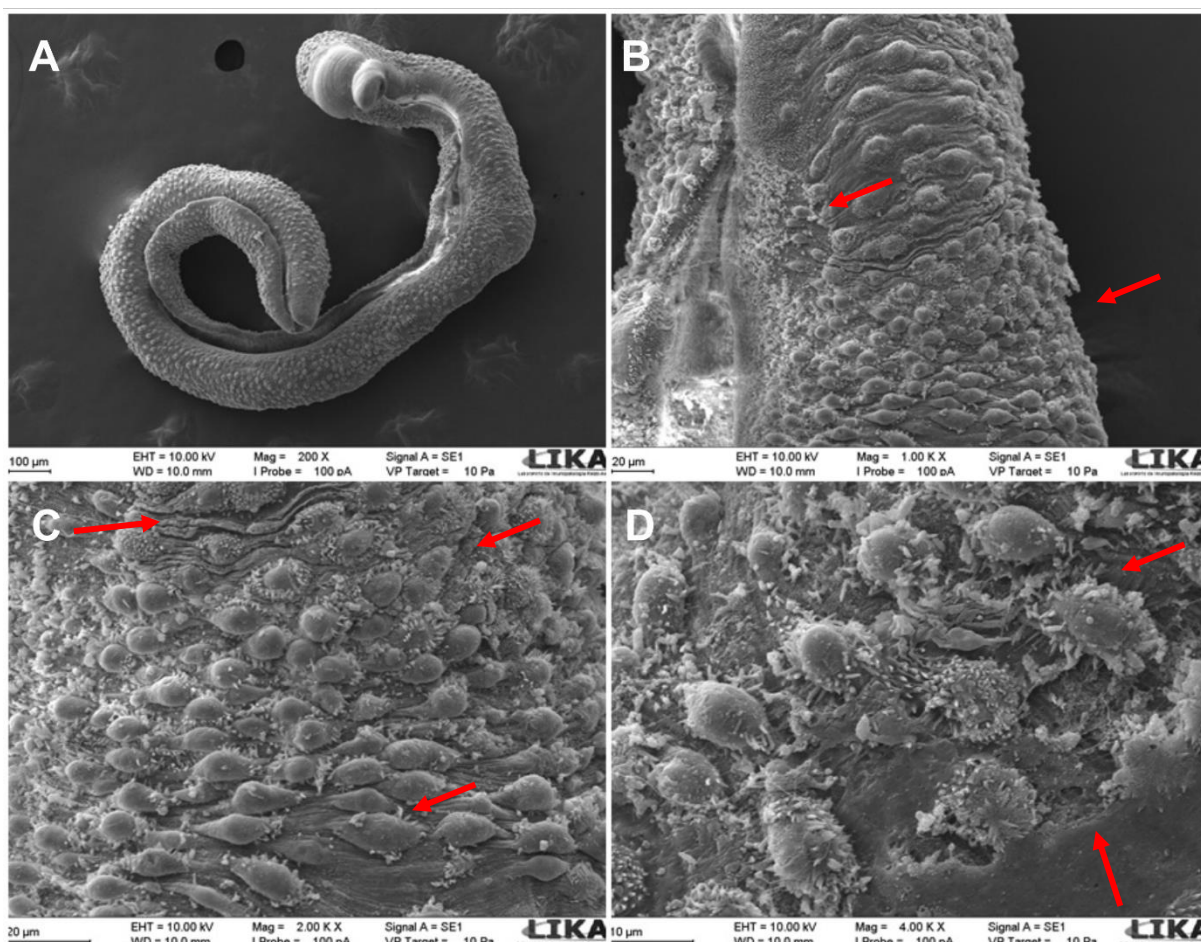
Fonte: A autora.

Legenda: A – Casal retorcido, com dano no tegumento; B – Tumorações e aprofundamento do tegumento; C, D – Destruição das espículas e tubérculos.

6.2.7.4 Microscopia eletrônica de varredura de vermes adultos tratados com Praziquantel/P-MAPA

Na Figura 48, destaca-se as intensas lesões tegumentares provocadas pela combinação das drogas PZQ e P-MAPA causando retração do verme (A), tumorações e aprofundamento do tegumento (B), destruição das espículas e tubérculos (C, D)

Figura 48 – Fotomicrografia eletrônica de varredura de vermes adultos de *S. mansoni* tratados com Praziquantel/P-MAPA



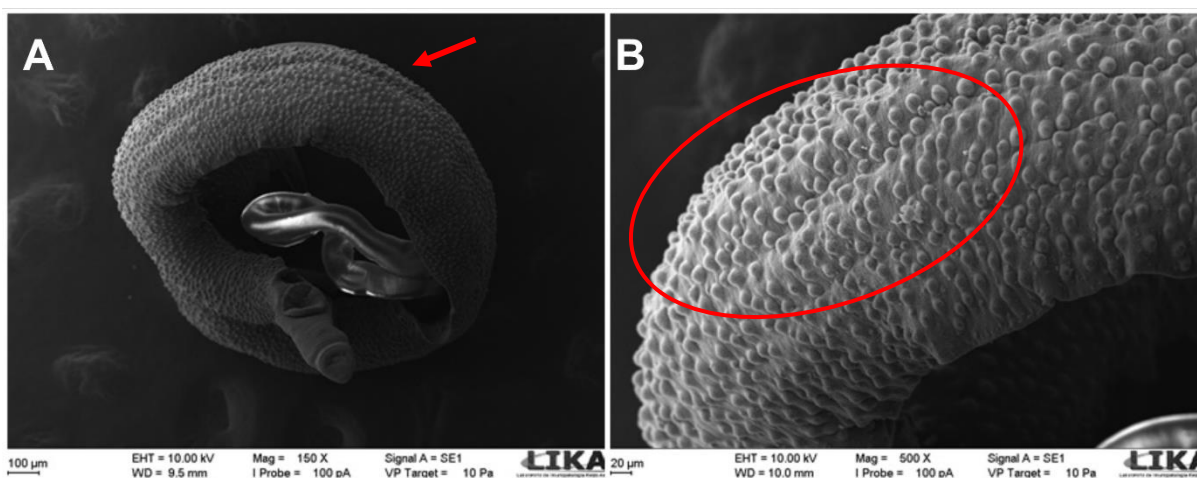
Fonte: A autora.

Legenda: A – Verme retorcido; B – Tumorações e aprofundamento do tegumento; C, D – Destruição das espículas e tubérculos.

6.2.7.5 Microscopia eletrônica de varredura de vermes adultos tratados com Silimarina

Neste grupo também houve uma alta quantidade de vermes recuperados e uma morte de 50% no total de animais do grupo. Com relação aos danos tegumentares, estes foram discretos. Apesar da intensa retração de casal de verme (A), o aprofundamento do tegumento foi discreto (B) (Figura 49).

Figura 49 – Fotomicrografia eletrônica de varredura de vermes adultos de *S. mansoni* tratados com Silimarina



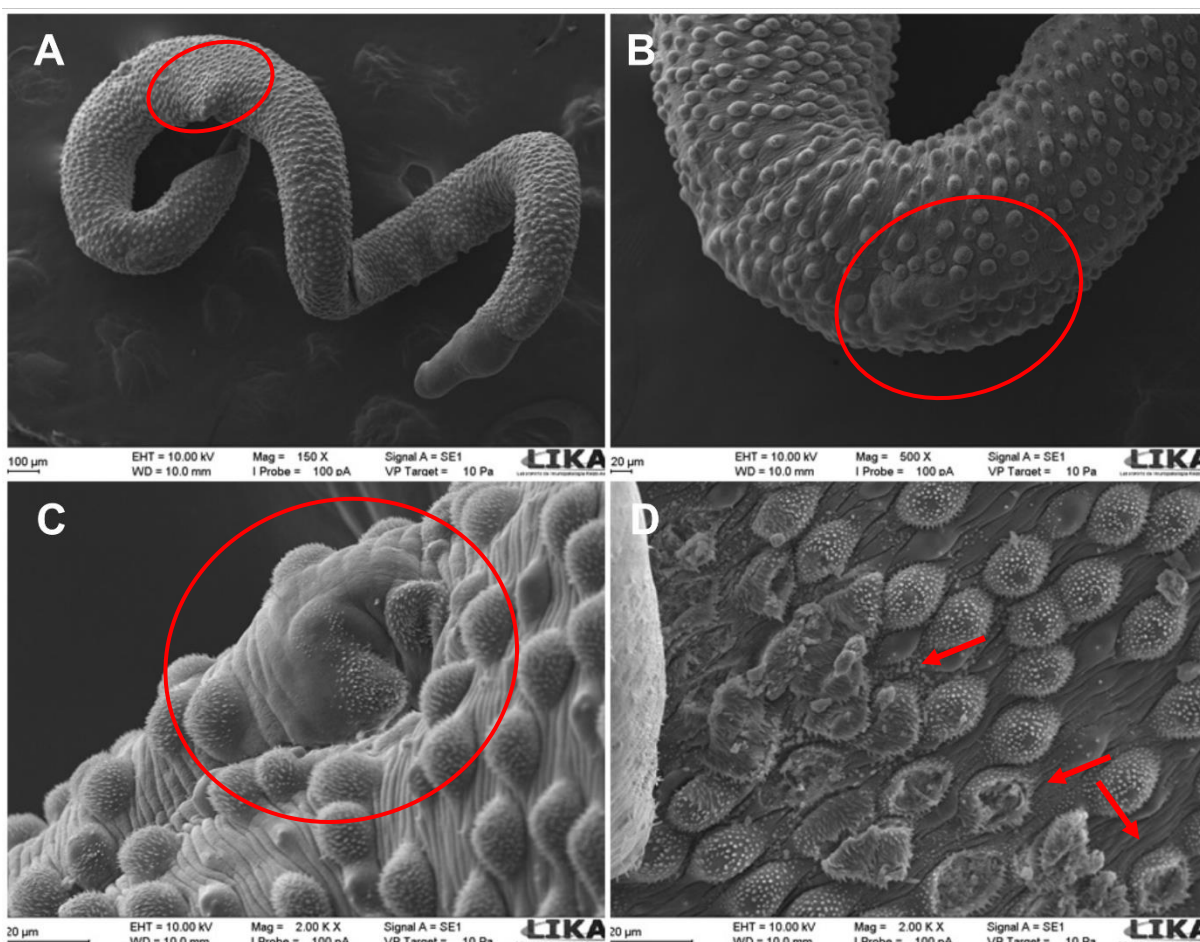
Fonte: A autora.

Legenda: A – Casal de verme retorcido; B – Discreto aprofundamento do tegumento; C, D – Destruição das espículas e tubérculos.

6.2.7.6. Microscopia eletrônica de varredura de vermes adultos tratados com Silimarina/Praziquantel

Este grupo foi o com o menor quantitativo de vermes recuperados com apenas 1 verme. Nele, observa-se o verme retorcido (A), presença de tumorações no tegumento (B, C) e destruição de tubérculos e espículas (D) Figura 50).

Figura 50 – Fotomicrografia eletrônica de varredura de vermes adultos de *S. mansoni* tratados com Silimarina/Praziquantel



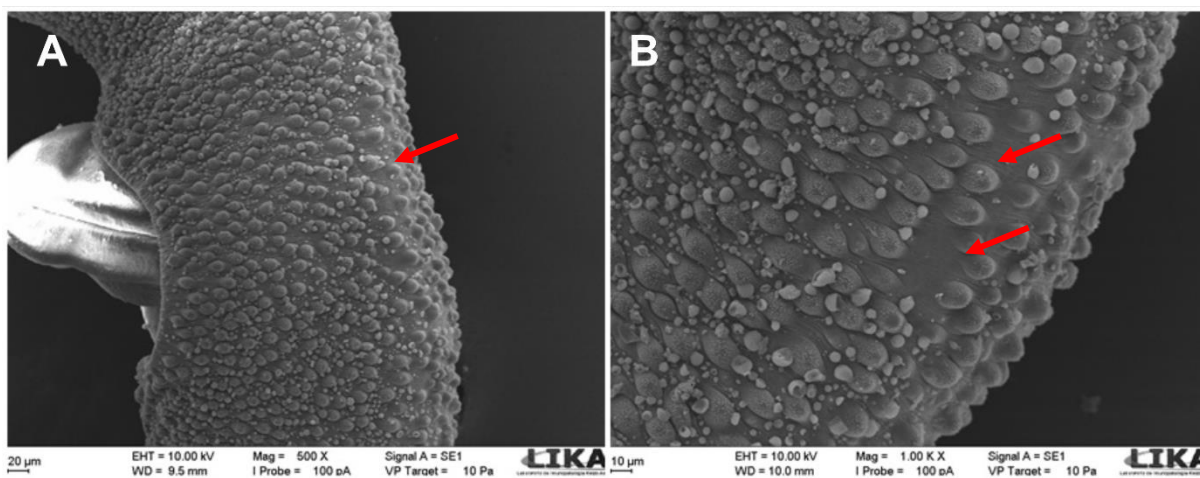
Fonte: A autora.

Legenda: A – Verme retorcido; B, C – Presença de tumorações no tegumento; D – Destruição das espículas e tubérculos.

6.2.7.7 Microscopia eletrônica de varredura de vermes adultos tratados com Silimarina/P-MAPA

Mais um grupo com elevados quantitativos de vermes recuperados na eutanásia. Aqui, o resultado condiz com as leves alterações tegumentares. Na Figura 51 nota-se discreta destruição de espículas (A, B)

Figura 51 – Fotomicrografia eletrônica de varredura de vermes adultos de *S. mansoni* tratados com Silimarina/P-MAPA



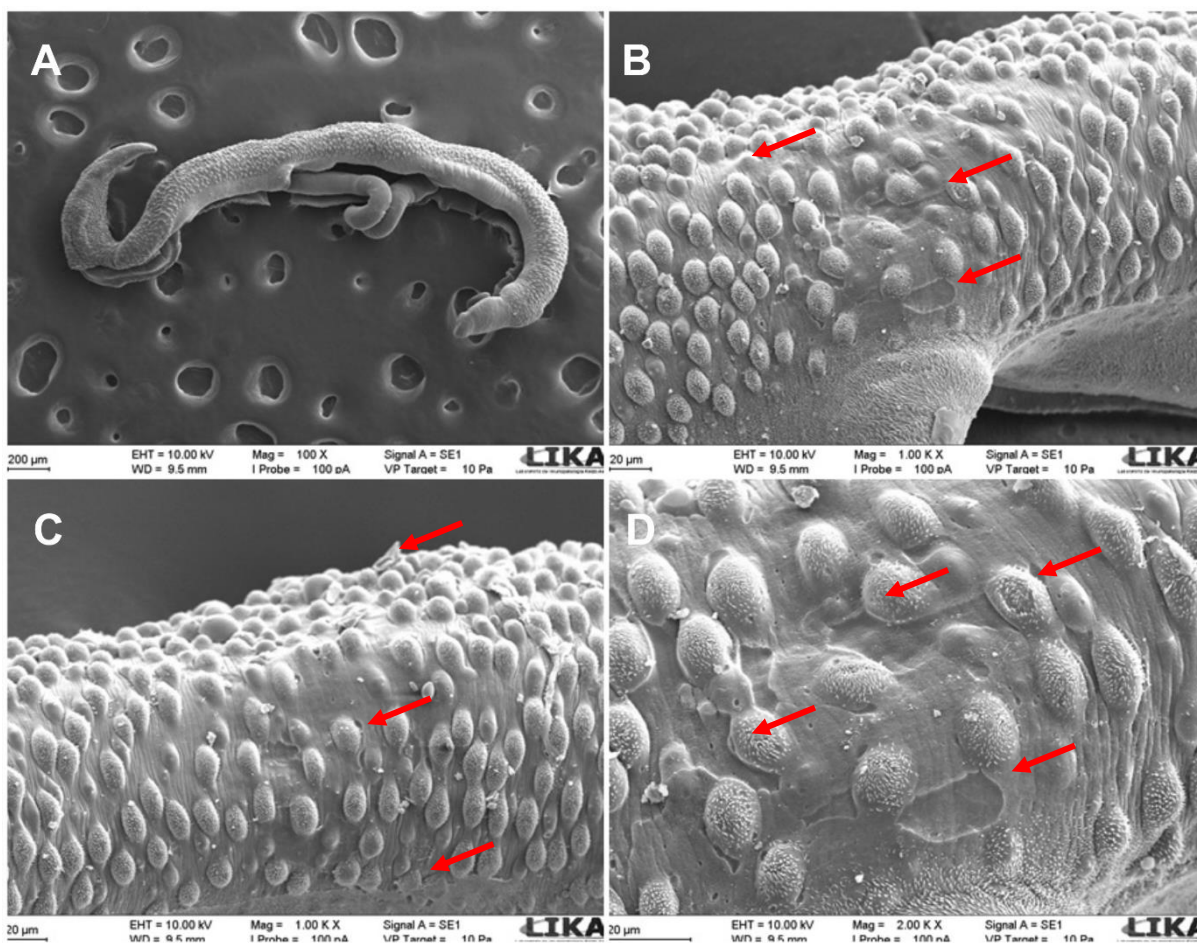
Fonte: A autora.

Legenda: A, B – Discreta destruição das espículas.

6. 2.7.8 Microscopia eletrônica de varredura de tratamento com Praziquantel/P-MAPA /Silimarina

Juntas, as três drogas causaram discreta ação no tegumento do verme. Aponta-se casal de verme levemente retraído (A), presença de erosões (B), e tumorações no tegumento (C), bem como discreta destruição de tubérculos e espículas (D) (Figura 52).

Figura 52 – Fotomicrografia eletrônica de varredura de vermes adultos de *S. mansoni* tratados com Praziquantel/P-MAPA /Silimarina



Fonte: A autora.

Legenda: A – Verme levemente retraído; B – Presença de erosões tegumentares; C – Tumorações no tegumento; D – Discreta destruição de tubérculos e espículas.

7 DISCUSSÃO

A esquistossomose é uma doença de grande morbidade, o que a torna um fator negativo para o desenvolvimento das regiões mais afetadas por ela. A maior parte de sua morbidade está associada à hipertensão portal causada pela intensa fibrose hepática (MATA-SANTOS et al., 2014; MCMANUS et al., 2018). A formação de varizes esofagianas, ascite, aumento da barriga, culmina quase sempre ao óbito do paciente devido lesão nos órgãos e pelo rompimento das varizes levando a hemorragias (MATA-SANTOS et al., 2014; MCMANUS et al., 2018). O modelo murino é convencionalmente escolhido por apresentar patologia semelhante à do homem, com espessamento fibroso dos espaços porta, acúmulo de granulomas periovulares, lesões de parênquima e desenvolvimento de fibroses (CHIARAMONTE et al., 1999; MATA-SANTOS et al., 2014).

Neste trabalho, a Silimarina foi diluída em dimetilsulfóxido (DMSO), e não em álcool absoluto como proposto pelo fabricante pois, além de reduzir a toxicidade causada pelo álcool, a preparação em DMSO também foi solúvel e permitiu um veículo único de diluição das drogas. Com relação ao P-MAPA, existem outros veículos utilizados para diluição como salina 0,9% (DURÁN et al., 2009; FÁVARO et al., 2012), e Pluronic (GEHLEN, 2016; SILVA et al., 2021). Tanto no DMSO, como na salina e no Pluronic houve, como já era esperado, cristalização da droga. A cristalização no DMSO foi reduzida mantendo-se a droga em constante agitação até o momento de ser aplicada. Em relação às toxicidades da Silimarina e do P-MAPA, pode-se verificar completa ausência de toxicidade nas doses utilizadas, como já demonstrado nos estudos de MATA-SANTOS e colaboradores (2010) e SILVA e colaboradores (2021).

Praziquantel e P-MAPA isolados e as combinações PZQ/P-MAPA e Praziquantel/P-MAPA/Silimarina apresentaram morte de todos os vermes nos poços correspondentes após 24h no experimento *in vitro*. Os resultados se equivaleram aos de Silva e colaboradores (2021) nos grupos PZQ e P-MAPA isoladamente. Esses danos incluíram a perda de espículas, destruição de tubérculos, depressão e formação de bolhas nos vermes, além de descamação, erosão e tumorações no tegumento. SILI/PZQ demonstrou ação na motilidade dos vermes, mas não foi capaz de causar morte dos mesmos. Isolada ou associadamente ao P-MAPA, a Silimarina não apresentou atividade contra os vermes na placa. Desta forma, presume-se que a

Silimarina isolada não possui atividade contra os vermes e pode ter interferido na possível ação vermífuga do P-MAPA.

Após a realização dos testes *in vitro*, deu-se início aos experimentos *in vivo*. Neste grupo a curva de sobrevivência dos animais infectados mostrou que os animais tratados com o P-MAPA apresentaram maior sobrevivência. Baseado no mecanismo de ação proposto do P-MAPA e sua atividade estar relacionada a mecanismos imunoterapêuticos e imunoregulatórios (DURÁN et al., 2009; FÁVARO et al., 2012), supõe-se que esta sobrevivência prolongada ocorra pela manutenção de um estágio inflamatório controlado. Desta forma, supõe-se que apesar de uma maior quantidade de vermes no organismo, há uma menor reação inflamatória por uma ação imunorregulatória mais eficaz dos Linfócitos T e produção de IFN-gama pelo P-MAPA (DURÁN et al., 2009; FÁVARO et al., 2012).

Ressalta-se que dois animais do grupo PZQ apresentaram comportamento motricial anormal e intensa expressão de dor e, portanto, foram eutanasiados antes do tempo previsto para o fim do tratamento. Esta ação foi em consentimento a Resolução Normativa N37 do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), parágrafo 2, tópico 2.4, onde especifica-se que animais com em sofrimento intenso devem ser eutanasiados para alívio da dor.

Os grupos com mais mortalidades foram os grupos associados à Silimarina, apesar do seu caráter imunomodulador, onde todos os grupos (SILI, SILI/PZQ, SILI/P-MAPA, PZQ/P-MAPA/SILI) apresentaram óbitos de, no mínimo, 50%. Estima-se que tanto a via de administração quanto o longo tempo de tratamento podem ter apresentado influência sobre os resultados por agravar o estresse sistêmico que a evolução natural da doença causa. Variações de temperatura do biotério, período de higiene das caixas armazenadoras, morte e brigas de outros animais nas caixas ou em caixas vizinhas, também são fatores que elevam os níveis de estresse.

Houve variação significativa no quantitativo de vermes recuperados de acordo com o protocolo de drogas utilizadas nos grupos em estudo. Os grupos com o Praziquantel (PZQ, PZQ/P-MAPA, SILI/PZQ, SILI/PZQ/P-MAPA) foram os grupos com os menores quantitativos de vermes recuperados, o que corrobora a tese de eficácia do mesmo sobre vermes adultos. Destacam-se os grupos P-MAPA, Silimarina e Silimarina/P-MAPA com os maiores quantitativos de vermes, respectivamente. Os valores encontrados no P-MAPA, como o grupo com o maior quantitativo de vermes recuperados, diferem do encontrado por Silva e colaboradores (2021), que apresentou

redução, no protocolo de 10mg/kg. Ressalta-se que Silva e colaboradores (2021) utilizaram três doses de P-MAPA, enquanto que neste estudo foi utilizado dose única. Com relação a Silimarina, estes dados diferem dos encontrados por El-Lakkany e colaboradores, (2012) que encontraram uma redução de mais de 95% na erradicação dos vermes. O objetivo de El-Lakkany e colaboradores (2012) foi de testar os efeitos anti-fibróticos da Silimarina, em uma dose de 750mg/kg/5 dias por semana durante seis semanas. Este aumento de mais de 700% na dosagem utilizada, bem como de um tempo de tratamento experimental mais longo, promovem uma melhor atuação da Silimarina no organismo.

Sobre os pesos dos órgãos, os grupos tratados com a SILI, apresentaram discreto aumento no peso hepático quando comparados ao controle saudável, porém essa variação não foi estatisticamente relevante. Apesar de pesos menores em todos os grupos experimentais tratados, essa redução não apresentou relevância estatística quando comparado ao controle infectado não tratado. No entanto, esses resultados obtidos de redução parcial de hepatomegalia em todos os grupos tratados com Silimarina foram condizentes com os resultados encontrados por Mata-Santos e colaboradores (2010, 2014).

Com relação ao peso do intestino, não houve diferença estatística entre nenhum dos grupos testados em comparação aos controles saudável e infectado. Avaliando-se cada droga isolada em comparação a combinação das três drogas em questão (G8), apenas o PZQ apresentou diferença estatística no peso do intestino, em relação ao aumento do peso.

Sobre a esplenomegalia, PZQ, P-MAPA e PZQ/P-MAPA apresentaram diferença estatística de peso quase cinco vezes maior em comparação ao controle saudável. Os menores pesos ficaram pro grupo do SILI/PZQ e PZQ/P-MAPA/SILI, discordando dos achados de Mata-Santos e colaboradores (2010) que não observaram redução na esplenomegalia. Com isso, infere-se que há uma possível ação mais eficaz da Silimarina sobre o baço após a ação do PZQ na eliminação dos vermes.

Na contagem geral de ovos no fígado, os grupos SILI/PZQ apresentou o menor quantitativo de ovos totais, com redução de aproximadamente 86% em comparação ao controle infectado. Os grupos PZQ, SILI/PZQ e PZQ/P-MAPA/SILI também foram estatisticamente relevantes na redução da contagem total de ovos em comparação ao controle infectado. Relatos na literatura, dissertam sobre a eficácia do PZQ em

esquistossomose promovendo a cura em 75 a 95% dos pacientes, bem como a redução na percentagem de ovos de 80 a 98% (FARMANGUINHOS; FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ, 2016; HAILEGEBRIEL; NIBRET; MUNSHEA, 2021; LIU et al., 2011). A SILI isolada não apresentou diferença estatística quando comparada ao CDC ou ao SILI/PZQ. O resultado obtido condiz com Mata-Santos e colaboradores (2010, 2014) onde não foram observadas diferenças significativas, em relação à oviposição, à chegada de ovos ao fígado.

Com relação a contagem total de ovos intestinais, SILI/P-MAPA e SILI isolada apresentaram valores quase dobrados em relação ao controle infectado. Estes dados discordam dos encontrados por El-Lakkany et al., 2012, que encontrou bons resultados de ação intestinal. Apesar dos grupos PZQ/P-MAPA e SILI/PZQ terem apresentados valores abaixo do CDC, os resultados não foram relevantes. Uma menor quantidade de ovos no intestino pode ser explicada devido a passagem dos ovos pela parede intestino em direção ao bolo fecal e então evacuação do hospedeiro.

Avaliando-se os resultados de média de ovos recuperados no cheever hepático, a Silimarina combinada ao PZQ apresentou a menor média de ovos por grama de tecido no fígado. Valor quase duas vezes menor do que o PZQ isolado e quase três vezes menor do que a SILI isolada. O resultado obtido difere do de Mata-Santos e colaboradores (2010) pois a redução no valor da média, além de maior, foi estatisticamente relevante.

PZQ, PZQ/P-MAPA e SILI/PZQ foram os grupos com valores de média de ovos por grama de tecido intestinal 50% menores em comparação ao CDC. Porém, houve variação estatisticamente relevante apenas no grupo do PZQ em comparação ao CDC. Os grupos P-MAPA, SILI, SILI/P-MAPA, PZQ/P-MAPA/SILI apresentaram valores próximos ou superiores ao CDC, evidenciando uma baixa efetividade no controle de ovos no tecido intestinal. Assim como descrito por Mata-Santos e colaboradores (2010, 2014) e Silva e colaboradores (2021), os resultados mais eficientes foram na redução de médias de ovos por grama de tecido tanto no cheever hepático quanto no intestinal no grupo do P-MAPA associado ao PZQ.

Sobre o oograma, que avaliou e classificou os ovos em viáveis e inviáveis, destaca-se que não houve diferença estatística entre as médias dos ovos viáveis no grupo SILI em comparação ao controle infectado, visto que os valores ficaram bem próximos. Todos os demais grupos tiveram variação estatística e redução na quantidade de ovos viáveis.

No tocante aos ovos inviáveis, a associação dos mortos aos imaturos se dá pois, no momento em questão, estes ovos não apresentam chance infecção ou de manutenção do ciclo biológico quando na natureza. Os grupos P-MAPA, PZQ/P-MAPA/SILI e SILI/PZQ destacaram-se como os grupos com as maiores médias de ovos inviáveis, com mais de 80% do total. Este resultado condiz com Silva e colaboradores (2021) sobre o P-MAPA e o quantitativo de ovos inviáveis. Apesar de valores totais de ovos no intestino próximos ao controle infectado nos grupo P-MAPA e PZQ/P-MAPA/SILI, nota-se que os ovos eram, em sua maioria, inviáveis. Apesar de uma baixa eficácia na eliminação dos vermes e na oviposição dos mesmos, o P-MAPA parece exercer algum tipo de ação sobre os ovos.

No que diz respeito as análises histológicas, com relação aos tamanhos dos granulomas, os grupos tratados com PZQ, SILI e SILI/PZQ foram os que apresentaram menores áreas, tal qual El-Sayed e colaboradores, 2016; Mata-Santos e colaboradores 2010; Rabia e colaboradores 2010; El-Lakkany e colaboradores 2012, El-Nagar e colaboradores, 2021, mesmo com protocolos diferentes.

Silva e colaboradores (2021) utilizou um protocolo diferente (100mg/kg em três doses) de P-MAPA obteve melhor performance na redução nas áreas de granuloma e fibrose hepática.

Seções hepáticas no grupo da Silimarina mostraram arquitetura anormal, as principais lesões histopatológicas foram número variável de granulomas periovulares, infiltração difusa de células inflamatórias, principalmente eosinófilos e pequenas células mononucleares. A grande maioria dos granulomas possui os óvulos íntegros ou semi destruídos de *S. mansoni* circundados por células inflamatórias densas e tecidos fibróticos. Estes achados foram encontrados também em KAMEL, 2016, TOUSSON e colaboradores (2013) e Mata-Santos e colaboradores (2010, 2014) mesmo com protocolos diferentes de dosagem de Silimarina. Também foi observado multigranuloma ou granuloma multiovular, que consiste em linfócitos e células fibrocíticas circundando mais de um óvulo de *Schistosoma* (TOUSSON (2013)). Isto pode acontecer pela proximidade dos ovos no momento da oviposição.

Destaca-se a interação da Silimarina com o PZQ, uma vez que a SILI possui ação sobre as enzimas do sistema citocromo P450 (NATIONAL INSTITUTE OF DIABETES AND DIGESTIVE AND KIDNEY DISEASES, 2022). Isto influencia diretamente no processo inflamatório local pois, no fígado, além do alojamento dos vermes e ovos, ainda há o metabolismo da droga, uma vez que, o PZQ é

extensamente metabolizado pelo fígado através do sistema citocromo P450, podendo causar lesão hepática como resultado de um intermediário tóxico de seu metabolismo (FARMANGUINHOS; FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ, 2016; NATIONAL INSTITUTE OF DIABETES AND DIGESTIVE AND KIDNEY DISEASES, 2020, 2022). Outro fator importante, é que o PZQ sofre intenso efeito de primeira passagem pelo fígado o que faz com que a maior parte da droga não seja absorvida. Isto demanda uma maior quantidade de fármaco e, conseqüente, maior desgaste hepático (FARMANGUINHOS; FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ, 2016).

Por fim, ao analisar alguns dos vermes recuperados do experimento *in vivo*, percebe-se que os resultados obtidos pelo *in vitro* foram semelhantes mesmo sabendo-se que a biodisponibilidade *in vitro* é maior por não ter degradação da droga. Os resultados de Silva e colaboradores (2021) nos grupos PZQ e P-MAPA isoladamente se equivaleram aos do estudo. Os principais danos encontrados foram a perda de espículas, destruição de tubérculos, depressão e formação de bolhas nos vermes, além de descamação, erosão e tumorações no tegumento nos grupos PZQ, P-MAPA, PZQ/P-MAPA, SILI/PZQ e PZQ/P-MAPA/SILI. Novamente, SILI e SILI/P-MAPA apresentaram discreta ação sobre os vermes.

8 CONCLUSÃO

Nas concentrações e aplicações testadas no presente estudo, as combinações Silimarina/Praziquantel e Praziquantel/P-MAPA/Silimarina se mostraram eficazes na redução da oviposição tanto no fígado como no intestino.

Com relação ao tipo de ovo posto pelas fêmeas, destacam-se o P-MAPA, Praziquantel/P-MAPA/Silimarina e Silimarina/Praziquantel, respectivamente, como as drogas com maiores ações de inviabilização dos ovos.

Sobre as quantidades de granulomas, todos os grupos com a Silimarina no tratamento apresentaram redução no quantitativo total de granulomas. Já com relação ao tamanho desses granulomas, o destaque ficou para o Praziquantel e a Silimarina tanto isolada quanto combinada ao PZQ.

Sobre a histologia, o grupo Silimarina/Praziquantel apresentou estrutura do parênquima hepático sem alterações degenerativas importantes, enquanto que a Silimarina destacou-se por granulomas pequenos e bem marcados.

Tanto nas análises *in vivo* como *in vitro*, PZQ e P-MAPA isolados, PZQ/P-MAPA combinados e PZQ/P-MAPA/SILI juntos causaram lesões e destruição do tegumento, bem como destruição sobre os tubérculos ou espículas, quando comparadas aos demais grupos. No entanto, destaca-se uma maior ação nos experimento *in vitro*.

Portanto, conclui-se que os protocolos utilizados envolvendo a combinação das três drogas foi efetivo com relação a ação ovicida, vermícida e hepatológica da esquistossomose crônica em modelo murino. Todos estes resultados corroboram a necessidade de novos testes com diferentes combinações e protocolos de utilização para um resultado mais promissor.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACHÉ. **Steaton.** , [s.d.].

ANDREWS, P. et al. Praziquantel. **Medicinal Research Reviews**, v. 3, n. 2, p. 147–200, 1983.

AVELAR, C. R. **Efeito da silimarina sobre indicadores bioquímicos em pacientes portadores de Doença Hepática: Revisão sistemática com metanálise.** Dissertação—Salvador: Universidade Federal da Bahia, 5 dez. 2016.

BARBOSA, V. S. et al. The Geographic Information System applied to study schistosomiasis in Pernambuco. **Revista de Saúde Pública**, v. 51, 2017.

BARRETO, M. S.; DE SOUZA GOMES, E. C.; BARBOSA, C. S. Turismo de risco em áreas vulneráveis para a transmissão da esquistossomose mansônica no Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 32, n. 3, 2016.

BARSOUM, R. S. Human Schistosomiasis. **Reference Module in Biomedical Sciences**, v. 3, p. 1–13, 2014.

BETHESDA (MD): NATIONAL INSTITUTE OF DIABETES AND DIGESTIVE AND KIDNEY DISEASES. Praziquantel. Em: **LiverTox: Clinical and Research Information on Drug-Induced Liver Injury [Internet]**. [s.l: s.n.].

BETHESDA (MD): NATIONAL INSTITUTE OF DIABETES AND DIGESTIVE AND KIDNEY DISEASES. Milk Thistle. Em: **LiverTox: Clinical and Research Information on Drug-Induced Liver Injury [Internet]**. [s.l: s.n.].

BEZERRA, F. S. DE M. Moluscos Transmissores do Schistosoma mansoni. Em: NEVES, D. P. (Ed.). **Parasitologia Humana**. 11. ed. [s.l.] Atheneu, 2005. p. 213–221.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Controle da Esquistossomose: Diretrizes Técnicas**. 2. ed. Brasília: Brasil. Ministerio da Saude, 1998.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Controle da esquistossomose: diretrizes técnicas**. [s.l.] Brasil. Ministerio da Saude, 1998.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Doenças Negligenciadas (Esquistossomose, Tracoma, Oncocercose e Filariose). Em: MINISTÉRIO DA SAÚDE; SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE (Eds.). **Sistema Nacional de Vigilância em Saúde: Relatório de Situação: Pernambuco**. 5. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2011.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE; SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. **Vigilância da Esquistossomose Mansonii: Diretrizes Técnicas**. 4. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2014.

- CAMINI, F. C.; COSTA, D. C. Silymarin: Not just another antioxidant. **Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology**, v. 31, n. 4, 1 jul. 2020.
- CHAMBERS, C. S. et al. The silymarin composition... and why does it matter. **Food Research International**, v. 100, p. 339–353, 2017.
- CHANNABASAVARAJ, K. P.; BADAMI, S.; BHOJRAJ, S. Hepatoprotective and antioxidant activity of methanol extract of *Ficus glomerata*. **Journal of Natural Medicines**, v. 62, n. 3, p. 379–383, jul. 2008.
- CHIARAMONTE, M. G. et al. IL-13 Is a Key Regulatory Cytokine for Th2 Cell-Mediated Pulmonary Granuloma Formation and IgE Responses Induced by *Schistosoma mansoni* Eggs. **The Journal of Immunology**, v. 162, n. 2, p. 920–930, 1999.
- CIOLI, D.; PICA-MATTOCCIA, L. Praziquantel. **Parasitology Research**, v. 90, n. SUPPL.1, 1 jun. 2003.
- COELI, R. et al. Praziquantel Treatment Decreases *Schistosoma mansoni* Genetic Diversity in Experimental Infections. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 12, 2013.
- COLLEY, D. G. et al. **Human schistosomiasis**. The Lancet. **Anais...Elsevier B.V.**, 2014;
- DA SILVA, E. M. et al. Mortalidade por esquistossomose mansoni no estado de Pernambuco no período 2011 a 2019. **Práticas e Cuidado: Revista de Saúde Coletiva**, v. 2, n. e11210, p. 1–19, 11 nov. 2021.
- DA SILVA, V. B. R. et al. Medicinal chemistry of antischistosomal drugs: Praziquantel and oxamniquine. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 25, n. 13, p. 3259–3277, 2017.
- DE ALMEIDA CHUFFA, L. G. et al. P-MAPA immunotherapy potentiates the effect of cisplatin on serous ovarian carcinoma through targeting TLR4 signaling. **Journal of Ovarian Research**, v. 11, n. 1, 17 jan. 2018.
- DURÁN, N. et al. A biotechnological product and its potential as a new immunomodulator for treatment of animal phlebovirus infection: Punta Toro virus. **Antiviral Research**, v. 83, n. 2, p. 143–147, ago. 2009.
- EL-SAYED, N. M. et al. Cytokine patterns in experimental schistosomiasis mansoni infected mice treated with silymarin. **Journal of Parasitic Diseases**, v. 40, n. 3, p. 922–929, 2016.
- FALLON, P. G. Schistosome resistance to praziquantel. **Drug Resistance Updates**, v. 1, p. 236–241, 1998.
- FARMABRASILIS. **Medicamentos**. Disponível em: <<http://www.farmabrasilis.org.br/medicamentos.php?idioma=br>>. Acesso em: 24 out. 2022a.

FARMABRASILIS. **Perfil**. Disponível em:
<<http://www.farmabrasilis.org.br/perfil.php?idioma=br>>. Acesso em: 24 out. 2022b.

FARMABRASILIS. **P-MAPA-PRODUCT MONOGRAPH**. Disponível em:
<https://www.farmabrasilis.org/interna_periodicos_publicacoes.php?idioma=eng&id=149>. Acesso em: 24 out. 2022.

FARMABRASILIS et al. **Fármaco brasileiro aprovado nos EUA para tratamento da esquistossomose**. Disponível em:
<https://www.farmabrasilis.org/interna_noticias.php?idioma=br&id=357>. Acesso em: 24 out. 2022.

FARMANGUINHOS; FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ. **Farmanguinhos praziquantel**: DMG-FAR-PRÓ-PZR-000-2016. Rio de Janeiro: [s.n.].

FÁVARO, W. J. et al. Effects of P-MAPA Immunomodulator on Toll-Like Receptors and p53: Potential Therapeutic Strategies for Infectious Diseases and Cancer. **Infectious Agents And Cancer**, v. 7, n. 14, p. 1–15, 2012.

FÁVARO, W. J. et al. Impact of intravesical instillation of a novel biological response modifier (P-MAPA) on progress of non-muscle invasive bladder cancer treatment in a rat model. **Medical Oncology**, v. 39, n. 2, 1 fev. 2022.

FLORA, K. et al. Milk Thistle (*Silybum maarianum*) for the Therapy of Liver Disease. **The American Journal of Gastroenterology**, v. S0002-927, n. 97, p. 139–146, 1998.

GARCIA, P. V. et al. Alterations in ubiquitin ligase Siah-2 and its corepressor N-CoR after P-MAPA immunotherapy and anti-androgen therapy: new therapeutic opportunities for non-muscle invasive bladder cancer. **International Journal of Clinical and Experimental Pathology**, v. 8, n. 5, p. 4427–4443, 2015.

GAZÁK, R.; WALTEROVÁ, D.; KEN, V. Silybin and Silymarin-New and Emerging Applications in Medicine. **Current Medicinal Chemistry**, v. 14, p. 315–338, 2007.

GOMES, E. C. S.; DOMINGUES, A. L. C.; BARBOSA, C. S. **Esquistossomose: manejo clínico e epidemiológico na atenção básica**. 1. ed. Recife: [s.n.]. v. 1

GONÇALVES, M. T. et al. P-MAPA, a fungi-derived immunomodulatory compound, induces a proinflammatory response in a human whole blood model. **Mediators of Inflammation**, v. 2020, 2020.

GRYSEELS, B. Schistosomiasis. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 26, n. 2, p. 383–397, jun. 2012.

HAILEGEBRIEL, T.; NIBRET, E.; MUNSHEA, A. Efficacy of Praziquantel for the Treatment of Human Schistosomiasis in Ethiopia: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Journal of Tropical Medicine**, v. 2021, 2021.

ÍNDICE. **Silimarina**.

INDICE.EU. **Silimarina**. Disponível em:
<<https://www.indice.eu/pt/medicamentos/DCI/silimarina/informacao-cientifica>>.
Acesso em: 18 ago. 2021.

KAMEL, R. O. A. Interactions between mefloquine and the anti-fibrotic drug silymarin on *Schistosoma mansoni* infections in mice. **Journal of Helminthology**, v. 90, n. 6, p. 760–765, 1 nov. 2016.

KASINATHAN, R. S.; MORGAN, W. M.; GREENBERG, R. M. *Schistosoma mansoni* express higher levels of multidrug resistance-associated protein 1 (SmMRP1) in juvenile worms and in response to praziquantel. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 173, n. 1, p. 25–31, set. 2010.

KATZ, N. **Inquérito Nacional de Prevalência da Esquistossomose mansoni e Geo-helmintoses**. 22. ed. Belo Horizonte: Fundação Oswaldo Cruz, 2018.

KAWARABAYASHI, N. et al. Decrease of CD56⁺T cells and natural killer cells in cirrhotic livers with hepatitis C may be involved in their susceptibility to hepatocellular carcinoma. **Hepatology**, v. 32, n. 5, p. 962–969, 2000.

KIM, N. C. et al. Complete isolation and characterization of silybins and isosilybins from milk thistle (*Silybum marianum*). **Organic and Biomolecular Chemistry**, v. 1, n. 10, p. 1684–1689, 21 maio 2003.

LADAS, E.; KROLL, D. J.; KELLY, K. M. Milk thistle (*Silybum marianum*). Em: PAUL M. COATES et al. (Eds.). **Encyclopedia of Dietary Supplements**. [s.l.] CRC Press, 2004b. p. 467–482.

LIMA, M. C. et al. The P-MAPA Immunomodulator Partially Prevents Apoptosis Induced by Zika Virus Infection in THP-1 Cells. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 22, n. 4, p. 514–522, 2 jun. 2021.

LINO, F. G. **Efeitos da silimarina e da silibina na patogênese da infecção aguda murina por *Schistosoma mansoni***. Dissertação—Rio de Janeiro: Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2012.

LIU, R. et al. Efficacy of praziquantel and artemisinin derivatives for the treatment and prevention of human schistosomiasis: A systematic review and meta-analysis. **Parasites and Vectors**, v. 4, n. 1, 2011.

LOVERDE, P. T. Schistosomiasis. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 1154, p. 45–70, 2019a.

LOVERDE, P. T. Schistosomiasis. Em: **Digenetic Trematodes**. [s.l.] Springer, 2019b. v. 1154.

LUPER, S. A Review of Plants Used in the Treatment of Liver Disease: Part 1. **Alternative Medicine Review**, v. 3, n. 6, p. 410–415, 1998.

LUPI JÚNIOR, L. A. et al. P-MAPA and IL-12 Differentially Regulate Proteins Associated with Ovarian Cancer Progression: A Proteomic Study. **ACS Omega**, v. 4, n. 26, p. 21761–21777, 24 dez. 2019.

LUPI, L. A. et al. P-MAPA and interleukin-12 reduce cell migration/invasion and attenuate the toll-like receptor-mediated inflammatory response in ovarian cancer SKOV-3 Cells: A preliminary study. **Molecules**, v. 25, n. 1, 2020.

MATA-SANTOS, H. A. **Efeitos da silimarina na fase agudada infecção experimental pelo Schistosoma mansoni**. Dissertação—Rio de Janeiro: Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2010.

MATA-SANTOS, H. A. et al. Silymarin treatment reduces granuloma and hepatic fibrosis in experimental schistosomiasis. **Parasitology Research**, v. 107, n. 6, p. 1429–1434, nov. 2010.

MATA-SANTOS, H. A. et al. Silymarin reduces profibrogenic cytokines and reverses hepatic fibrosis in chronic murine schistosomiasis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 4, p. 2076–2083, 2014.

MATOS-ROCHA, T. J. et al. Ultrastructural changes in *Schistosoma mansoni* male worms after in vitro incubation with the essential oil of *Mentha x villosa* Huds. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, v. 58, 2016.

MCMANUS, D. P. et al. Schistosomiasis. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 4, n. 1, 1 dez. 2018.

MELO, A. L.; COELHO, P. A. Z. *Schistosoma mansoni* e a Doença. Em: NEVES, D. P. (Ed.). **Parasitologia Humana**. 11. ed. [s.l.] Atheneu, 2005. p. 193–212.

MELO, L. M. et al. Effects of P-MAPA immunomodulator on Toll-like receptor 2, ROS, nitric oxide, MAPKp38 and IKK in PBMC and macrophages from dogs with visceral leishmaniasis. **International Immunopharmacology**, v. 18, n. 2, p. 373–378, fev. 2014.

MITCHELL, S. T. SILIMARINA OU CARDO-MARIANO (*SILYBUM MARIANUM*). Em: OLSON, K. R. (Ed.). **Manual de Toxicologia Clínica**. 6th. ed. [s.l.] Artmed, 2014. p. 554–555.

MWANGI, I. N. et al. Praziquantel sensitivity of Kenyan *Schistosoma mansoni* isolates and the generation of a laboratory strain with reduced susceptibility to the drug. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, v. 4, n. 3, p. 296–300, 1 dez. 2014.

NOVAES, M. R. C. G.; DE SOUZA, J. P.; DE ARAÚJO, H. C. Síntese do anti-helmíntico Praziquantel, a partir da Glicina. **Química Nova**, v. 22, n. 1, 1999.

OFICINA DE ERVAS. **Cardo Mariano**.

OLIVEIRA, E. C. A. DE et al. Investigação sobre os casos e óbitos por esquistossomose na cidade do Recife, Pernambuco, Brasil, 2005-2013.

Epidemiologia e serviços de saúde : revista do Sistema Único de Saúde do Brasil, v. 27, n. 4, p. e2017190, 29 nov. 2018.

PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION; WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Schistosomiasis**. [s.l: s.n.].

PAWLOTSKY, J. M.; MCHUTCHISON, J. G. Hepatitis C. Development of New Drugs and Clinical Trials: Promises and Pitfalls. **Hepatology**, v. 39, n. 2, p. 554–567, fev. 2004.

PEREIRA, A. P. B. et al. The prevalence of schistosomiasis in school-aged children as an appropriate indicator of its prevalence in the community. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 105, n. 4, p. 563–569, 2010.

PHARMA, I. **Informativo técnico**. [s.l: s.n.].

PHARMANOSTRA. **SILIMARINA Hepatoprotetor Natural**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <http://www.fitoterapia.net/vademecum/vademecum_plantas_ficha.php?remedi>.

REY, L. Schistosoma mansoni e Esquistossomíase: O Parasito. Em: REY, L. (Ed.). **Parasitologia**. 4. ed. [s.l: s.n.]. p. 435–446.

ROCHA, M. DE A. et al. Perfil epidemiológico dos casos notificados da esquistossomose mansoni ocorridos no Brasil. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 15, p. e514101523257, 2 dez. 2021.

SANCHEZ, M. C. et al. Effect of praziquantel on the differential expression of mouse hepatic genes and parasite ATP binding cassette transporter gene family members during Schistosoma mansoni infection. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 6, 26 jun. 2017.

SANCHEZ, M. C. et al. Transcriptomic analysis of reduced sensitivity to praziquantel in Schistosoma mansoni. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 228, p. 6–15, 1 mar. 2019.

SANTANA, L. A. et al. Esquistossomose mansônica : aspectos gerais , imunologia , patogênese e história natural *. **Rev. Soc. Bras. Clín. Méd**, v. 9, n. 4, p. 300–307, 2011.

SANTIAGO, M. E. B. et al. Improvement in clinical signs and cellular immunity of dogs with visceral leishmaniasis using the immunomodulator P-MAPA. **Acta Tropica**, v. 127, n. 3, p. 174–180, set. 2013.

SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE; MINISTÉRIO DA SAÚDE. Esquistossomose. Em: **Boletim Epidemiológico - Doenças tropicais negligenciadas**. Número Especial ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2021. p. 9–13.

SILVA, J. C. S. et al. In vitro and in vivo effects of P-MAPA immunomodulator on schistosomiasis. **Acta Tropica**, v. 218, 1 jun. 2021.

SILVA, J. C. S.; LOPES, F. M.; CARVALHO, B. DE M. **Fármaco brasileiro aprovado nos EUA paratratamento da esquistossomose**. Disponível em: <<https://www.cpqam.fiocruz.br/institucional/noticias/farmaco-brasileiro-aprovado-nos-eua-para-tratamento-da-esquistossomose>>. Acesso em: 24 out. 2022.

ŠIMÁNEK, V. et al. Silymarin: What is in the name ...? An appeal for a change of editorial policy. **Hepatology**, v. 32, n. 2, p. 442–444, 2000.

SOUZA, F. P. C. DE et al. Esquistossomose mansônica: aspectos gerais, imunologia, patogênese e história natural. **Revista Brasileira de Clínica Médica**, v. 9, n. 4, p. 300–307, 2011.

THE PLANT LIST. **Silybum marianum (L.) Gaertn.** Disponível em: <<http://www.theplantlist.org/tpl/record/gcc-114114>>. Acesso em: 24 out. 2022.

TOUSSON, E. et al. Expressions of P53 and CD68 in mouse liver with *Schistosoma mansoni* infection and the protective role of silymarin. **Toxicology and Industrial Health**, v. 29, n. 8, p. 761–770, 2013.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA. **Ciclo Biológico**. Disponível em: <[https://www.ufjf.br/labproteinas/material-de-apoio/esquistossomose/ciclo-biologico/#:~:text=A%20cerc%C3%A1ria%20possui%20cerca%20de,cauda%20bifurcada%20\(Figura%206\).>](https://www.ufjf.br/labproteinas/material-de-apoio/esquistossomose/ciclo-biologico/#:~:text=A%20cerc%C3%A1ria%20possui%20cerca%20de,cauda%20bifurcada%20(Figura%206).>)>. Acesso em: 27 out. 2022.

VALE, N. et al. Praziquantel for schistosomiasis: Single-drug metabolism revisited, mode of action, and resistance. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 61, n. 5, 1 maio 2017.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Schistosomiasis**. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/schistosomiasis>>.

APÊNDICE A – ARTIGO PUBLICADO

Acta Tropica 218 (2021) 105909



Contents lists available at ScienceDirect

Acta Tropica

journal homepage: www.elsevier.com/locate/actatropica*In vitro* and *in vivo* effects of P-MAPA immunomodulator on schistosomiasis

Juliana C.S. Silva^a, Carlos R.B. Lins^b, Sarah S. Lacerda^b, Rhaissa E.M. Ramos^b, Hallysson D. A. Araújo^c, Mario R. Melo-Junior^d, Luiz C. Alves^b, Fábio A. Brayner^b, Iseu S. Nunes^e, Fábio L. Melo^b, Bruno M. Carvalho^{a, f, *}

^a Faculty of Medical Sciences - University of Pernambuco (FCM/UPE). Arnóbio Marques street, 310, 50100-130, Recife, PE, Brazil

^b Aggeu Magalhães Institute – Oswaldo Cruz Foundation (IAM/FIOCRUZ). Prof. Moraes Rego avenue, s/n, 50670-420, Recife, PE, Brazil

^c Department of Biochemistry, Biosciences Centre – Federal University of Pernambuco (UFPE). Prof. Moraes Rego avenue, 1235, 50670-420, Recife, PE, Brazil

^d Health Sciences Centre – Federal University of Pernambuco (UFPE). Prof. Moraes Rego avenue, 1235, 50670-501, Recife, PE, Brazil

^e Farmabasilis R&D Division. Av. Hélio Pires de Camargo 181, 13279-020, Valinhos, SP, Brazil

^f Institute of Biological Sciences - University of Pernambuco (ICB/UPE). Arnóbio Marques street, 310, 50100-130, Recife, PE, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Schistosoma mansoni
Schistosomiasis
P-MAPA
Praziquantel
Antischistosomal agents
Immunomodulators

ABSTRACT

Schistosomiasis is an infectious disease caused by helminth parasites of the genus *Schistosoma*; it is transmitted in over 78 countries. The main strategy for schistosomiasis control is treatment of infected people with praziquantel (PZQ). As PZQ-resistant strains have emerged, new anti-schistosomal agents have become necessary. We evaluated the *in vitro* and *in vivo* effect of P-MAPA, an aggregated polymer of protein magnesium ammonium phospholipoleate-palmitoleate anhydride with immunomodulatory properties; it is produced by *Aspergillus oryzae* fermentation. *In vitro*, P-MAPA (5, 50, and 100 µg/mL) damaged the *Schistosoma mansoni* tegument, causing thorn losses and tuber destruction in male worms and peeling and erosion in females after 24-h incubation. *In vivo*, P-MAPA (5 and 100 mg/kg, alone and combined with PZQ – 50 mg/kg) reduced the number of eggs by up to 69.20% in the liver and 88.08% in the intestine. Furthermore, granulomas were reduced up to 83.13%, and there was an increase in the number of dead eggs and a reduction of serum aspartate aminotransferase levels. These data suggest that P-MAPA activity can help improve schistosomiasis treatment and patients' quality of life.

1. Introduction

Schistosomiasis is an acute and chronic disease caused by helminth parasites of the genus *Schistosoma*. In 2015, an estimated 218 million people, more than half school-age children, were living in areas at high risk for the disease in over 78 countries (WHO, 2017). The disease is transmitted by *Schistosoma*-spp.-infected snails that release cercariae in watercourses. Cercariae penetrate the skin, and female worms initiate oviposition in the intestine around day 38 post-infection. By embolism, eggs reach mainly the liver and trigger host immunological reactions (Colley et al., 2014).

The current strategy for schistosomiasis control is the treatment of infected people with praziquantel (PZQ) (Katz and Coelho, 2008; McManus et al., 2018; WHO, 2017). However, PZQ has lost efficacy due to its long-term worldwide application, and PZQ-resistant and/or tolerant *Schistosoma mansoni* strains have been found (Danso-Appiah and De Vlas, 2002; Zwang and Olliaro, 2014). The situation urges the

search for new anti-schistosomal agents to overcome PZQ resistance (Greenberg, 2014; Neves et al., 2015). One of the classes of drugs that appears to have potential in the treatment of schistosomiasis are immunomodulatory agents. Treatment with praziquantel associated immunomodulators in mice infected with *Schistosoma mansoni* appears to have promising potential (Silva et al., 2020).

P-MAPA, developed by the Farmabasilis research network, is an aggregated polymer of protein magnesium ammonium phospholipoleate-palmitoleate anhydride with immunomodulatory properties. It is produced by *Aspergillus oryzae* fermentation. The compound increases the production of cytokines, especially interferon-gamma (IFN-γ) and interleukin 2 (IL-2), and stimulates the release of nitric oxide by macrophages (Farmabasilis, 2008; Melo et al., 2014). P-MAPA has shown important activities against tumors (Fávaro et al., 2012), viruses (Durán et al., 2009), bacteria (Melo et al., 2001), and protozoa (Melo et al., 2014; Santiago et al., 2013). Toxicological studies determined that P-MAPA is safe in mice, since the LD50

* Corresponding author.

E-mail address: bruno.carvalho@upe.br (B.M. Carvalho).

<https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2021.105909>

Received 19 August 2020; Received in revised form 12 March 2021; Accepted 23 March 2021

Available online 28 March 2021

0001-706X/© 2021 Elsevier B.V. All rights reserved.

Table 1
Experimental groups with the specific therapeutic description.

Groups	Number of animals
GI - <i>S. mansoni</i> infected and untreated	11
GII - <i>S. mansoni</i> infected and treated with P-MAPA 5 mg/kg	11
GIII - <i>S. mansoni</i> infected and treated with P-MAPA 5 mg/kg + PZQ 50 mg/kg	10
GIV - <i>S. mansoni</i> infected and treated with PZQ 50 mg/kg	10
GV - <i>S. mansoni</i> infected and treated with P-MAPA 100 mg/kg	9

intraperitoneally was obtained with a dosage of 2.71 ± 1.55 g/kg, which represents a dosage approximately 500 times higher than the therapeutic dosage used of the product, which is 5 mg/kg. (Farmabrazilis, 2008; Fávaro et al., 2012).

Here, its *in vitro* and *in vivo* action in a worm, *S. mansoni*, and its potential as an adjuvant therapy in the treatment of schistosomiasis were evaluated for the first time.

2. Materials and methods

2.1. Study design

S. mansoni-infected male mice were treated or untreated with P-MAPA and PZQ in different treatment regimens. One-hundred-eleven Swiss male mice (60 for the *in vitro* and 51 for the *in vivo* studies) at 28–30 g and 28 days of age were provided by the Aggeu Magalhães Institute (IAM) breeding stock. Before the experiments, the animals were submitted to quarantine to reduce stress effects. The animals were identified by coding to minimize the risk of bias by the observers. They were housed in boxes on shelves under constant temperature (21 ± 2 °C) and brightness (12 h light/12 h dark) and had access to food and water *ad libitum*. The study protocol (97/2016) was approved by the IAM Ethics Committee on Animal Studies.

2.2. Infection of mice

The mice were individually infected with 80 cercariae from *S. mansoni* LE strain (Luiz Evangelista) kept in *Biomphalaria glabrata* snails raised in the Laboratory of Malacology of IAM/FIOCRUZ. The infection was performed percutaneously, with exposure for 1 h under artificial light.

2.3. Experimental groups and drugs

Mice were randomly allocated into five experimental groups (GI to GV), according to the therapeutic intervention (Table 1).

P-MAPA holds the Orphan Drug Designation (<https://www.accessdata.fda.gov/scripts/opdlisting/oopd/detailedIndex.cfm?cfgridkey=721319>) status by the U.S. Food and Drug Administration (FDA), was developed and kindly provided by Farmabrazilis (Valinhos, SP, Brazil), a non-profit research network. Praziquantel was purchased from Sigma (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA). Mice were treated with a single 50 mg/kg oral dose of PZQ and/or intraperitoneal P-MAPA injection. Both drugs were diluted in 5% Pluronic F-127 (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA). P-MAPA was given at 5 mg/kg/day (suggested therapeutic dose) for 8 days (days 60–67 post-infection) and at 100 mg/kg at day 60, 64 and 67 post-infection to observe the effects of the drug during the course of infection.

2.4. In vitro test in adult worms

Two pairs of adult worms, recovered from infected mice, were placed in each well of a 24-well culture dish that contained RPMI 1640 medium supplemented with antibiotics (100 U/mL penicillin and 100 µg/mL streptomycin) and 10% fetal bovine serum (FBS). The plates were

incubated at 37 °C and 5% CO₂ for 2 h.

A stock solution of P-MAPA was prepared and added to the wells at concentrations of 5, 50, or 100 µg/mL. PZQ (positive control) was used at a concentration of 0.5 µg/mL. The negative control contained only supplemented RPMI media. Each dose was tested in triplicate; the final volume in each well was 2 mL.

The parasites were monitored for survival over 24 h on an inverted microscope. Phenotypic changes were scored based on a motility scale that ranged from 0 to 3 (Ramírez et al., 2007): 3, active worms with normal body movements; 2, slow worms with delayed body movements or only movements at the extremities of the anterior and posterior regions; 1, very slow worms, with occasional movement of the extremities or intestine; 0, dead worms, with total absence of movement. The experiments were performed in triplicate and repeated.

2.5. Tegument evaluation of *S. mansoni* by scanning electron microscopy

Adult worm pairs were treated with 5, 50, or 100 µg/mL P-MAPA, RPMI 1640 (negative control), or 0.5 µg/mL PZQ (positive control) for 24 h. Subsequently, they were fixed in Karnovsky's fixative and stored under refrigeration.

Worms were washed three times with a buffer solution (sodium cacodylate, pH = 7.2) and fixed in 2.5% glutaraldehyde (pH = 7.4) for 24 h and later in 1% osmium tetroxide at room temperature for 1 h. All worms were washed several times in 100% ethanol to be dehydrated, dried in liquid CO₂, stacked, gold plated, and scanned in a JEOL JSM-5600 electron microscope (Jeol Ltd., Tokyo, Japan) at Keiso Asami Immunopathology Laboratory (IJK), UFPE. All measurements were performed in µm.

2.6. In vivo tests

2.6.1. Worm recovery

Animals were anesthetized with 115 mg/kg ketamine hydrochloride and 10 mg/kg xylazine hydrochloride. Worms were recovered from the hepatic portal system by an infusion technique (Alencar et al., 2016). The worms from each mouse were sedimented for approximately 20 min in Petri dish with RPMI 1640 medium to allow identification, examination, sex determination, and counting.

2.6.2. Egg counting

The number of eggs/g liver was counted after 4% KOH digestion, according to the method described by Cheever and Anderson (Cheever and Anderson, 1971). On the oogram, the small intestine of mice was cut into approximately 1 cm segments, compressed between slides, and examined using an optical microscope. *S. mansoni* eggs (mature, immature and dead) were counted in three segments for each mouse to calculate the average number of eggs. This classification was done following the method specifications under the microscope visualization: mature – embryo was occupying its entire internal area; immature – embryo was not visible or did not occupy the internal area of the egg; dead – embryo or miracid was retracted (Pellegrino et al., 1962).

2.6.3. Histopathology

The central portion of the right liver lobe was removed from all animals and fixed in 10% formalin. The fragments were dehydrated in increasing concentrations of ethanol, diaphanized in xylol, and embedded in paraffin. Five µm sections were stained with hematoxylin-eosin (HE). All granulomas found in three random fields of the histological section were quantified. The images were captured with a Labomed Lx400 microscope (Labomed Inc. Los Angeles, CA, US) attached to a 1.3 MP USB 2.0 Moticam 1000 digital camera and using Motic Images Plus 2.0 software (Motic Incorporation Ltd., Hong Kong).

2.6.4. Biochemistry

On day 68 post-infection, blood was collected under anesthesia from

Table 2
Worm motility score after 24 h incubation with praziquantel (PZQ) or P-MAPA.

Groups/Motility score	Worms percentage (%)			
	0	1	2	3
Control				100
PZQ 0.5 µg/ml	100			
P-MAPA 5 µg/ml		25	75	
P-MAPA 50 µg/ml		100		
P-MAPA 100 µg/ml		100		

the vena cava. Serum was obtained after centrifugation at 1000xg for 15 min. The serum levels of the enzymes aspartate transaminase (AST) and alanine aminotransferase (ALT) were evaluated using the BioSystem® kit (Barcelona, Spain).

2.6.5. Statistical analysis

Data are expressed as mean \pm standard deviation (SD). Analysis of variance (ANOVA) was used for comparison among groups. When ANOVA revealed a significant difference, Bonferroni's post-test was used to identify the difference between groups. Differences were considered significant when $p < 0.05$. GraphPad Prism 5.01 (GraphPad Software, San Diego, CA, US) was used for statistical analysis.

3. Results

3.1. *In vitro* effect of P-MAPA on *S. mansoni* adult worms

P-MAPA at 5, 50, or 100 µg/mL reduced the motility of adult worms. Table 2 details the schistosomicidal effect of P-MAPA on *S. mansoni* adult worm motility after 24-h incubation. There was no adhesion of suction cups or egg laying. Fig. 1A-E shows the preserved morphology of the negative control adult worms and Fig. 1F-I the worm characteristics after *in vitro* PZQ treatment. Fig. 2A-B shows female and male worm treated with 5 µg/mL P-MAPA for 24 h and indicates peeling and erosion of the tegument, showing areas with cracks.

The effects of 50 µg/mL P-MAPA on female and male worm are shown in the Fig. 2C-D. There were peeling and erosion of the tegument, exposure of the submuscular tissue, areas with cracks and presence of holes. At the same concentration in the male worm, there was a total destruction of the tubers with exposure of submuscular tissue and damaged sensorial structures (Fig. 2C-D). Fig. 2E depicts swelling on the tegument and erosion in the female's body as a result of *in vitro* 100 µg/mL P-MAPA exposure. Loss of spines, destruction of tubers, bubbles and presence of holes were observed at the same concentration on the male worm (Fig. 2F).

3.2. Worm recovery

As shown in Fig. 3, all tested treatments significantly reduced the total number of worms recovered by perfusion when compared to the untreated infected mice.

3.3. Effect of P-MAPA on the number of eggs/g liver or intestine

Combined 5 mg/kg P-MAPA + 50 mg/kg PZQ or 100 mg/kg P-MAPA alone significantly decreased the number of eggs/g of liver compared to the untreated group. The reductions were 67.31% and 69.20%, respectively. All treatment regimens significantly reduced the number of eggs/g of intestine compared to untreated infected mice. Combined 5 mg/kg P-MAPA + 50 mg/kg PZQ presented the greatest egg count reduction in the intestine (88.08%) as well as the liver (Table 3).

The oviposition pattern was significantly reduced in mature eggs in all treatment groups when compared to the untreated infected group (Table 4). Only the 5 mg/kg P-MAPA treatment regimen did not significantly reduce immature eggs in comparison to the infected

control group. Combined 5 mg/kg P-MAPA + 50 mg/kg PZQ or 50 mg/kg PZQ alone also reduced the number of immature eggs when compared with the 5 mg/kg P-MAPA-treated group and untreated infected mice.

The 5 mg/kg P-MAPA and 50 mg/kg PZQ treatments significantly increased the counts of dead eggs when compared with the control group. Furthermore, combined 5 mg/kg P-MAPA + 50 mg/kg PZQ or 100 mg/kg P-MAPA alone also significantly increased the number of dead eggs when compared with 5 mg/kg P-MAPA-treated mice. These results showed that P-MAPA seems to modulate the oviposition pattern of *S. mansoni*.

3.4. Effect of P-MAPA on liver granulomas

Table 5 shows the significant reduction in the number of granulomas for all studied treatment regimens when compared to the untreated infected group. Beyond presenting differences regarding the infected mice, 100 mg/kg P-MAPA also significantly reduced the granuloma number when compared to 50 mg/kg PZQ-treated mice.

Fig. 4 depicts hepatic granulomas in the different treatment regimens. The hepatic tissue of a control animal, without infection and without treatment, is presented in Fig. 4A, and the infected and untreated group is shown in Fig. 4B. Histological sections with hepatic granulomas treated with 50 mg/kg PZQ or 5 mg/kg P-MAPA are shown in Fig. 4C and 4D, respectively. Hepatic granulomas under the effect of 5 mg/kg P-MAPA treatment + 50 mg/kg PZQ or 100 mg/kg P-MAPA are shown in Fig. 4E and 4F, respectively.

3.5. Liver enzyme levels

The serum levels of AST and ALT in the treatment groups are shown in Fig. 5. There was an apparent reduction in ALT levels in all treatment regimens compared to the infected and untreated group, but the reduction was not statistically significant. AST was reduced in all treatment groups, but the difference was only statistically significant in the 100 mg/kg P-MAPA-treated mice.

4. Discussion

As a strategic target for schistosomicidal drugs, the *S. mansoni* tegument plays a key role in nutrition, excretion, signal transduction, evasion, osmoregulation, immune modulation, and parasite-host interactions (Jones et al., 2004; Mulvenna et al., 2010). Indeed, tegumentary changes - vacuolations, peeling of the tegument, tubercles and spines, increased membrane permeability and Ca^{2+} influx, absence of phosphorylation in $\alpha 1$ - and β -calcium channels, membrane depolarization in adult worms, schistosomulae, a contraction and muscular paralysis that act on parasite neurotransmitters - are observed after exposure of *S. mansoni* to low PZQ concentrations (Lorsuwanarat et al., 2013; Xiao et al., 2007). As young worms are less susceptible to PZQ than adults (Colley et al., 2014; Araújo et al., 2020a), and decreased susceptibility to PZQ is reported (Melman et al., 2009; Zwang and Olliaro, 2014), the association of drugs for the treatment of schistosomiasis has been emphasized to increase therapeutic efficiency and deter the emergence of resistant strains (Katz and Coelho, 2008).

At all concentrations evaluated *in vitro*, P-MAPA presented powerful activity against adult male and female worms and severely damaged the worm tegument. These damages included the loss of spicules, tuber destruction, depression and formation of bubbles in male worms; and peeling, erosion, and swelling in females. Consistently, other *in vitro* studies on natural products reported that *S. mansoni* male worms are often more susceptible to treatments compared to female worms (Melo et al., 2011; Sanderson et al., 2002; Araújo et al., 2019; 2020b).

Beyond damaging worm tegument, decreasing worm motility, wrinkling worms, and halting oviposition for 24 h, P-MAPA reduced the recovery of worms by up to 50% by the portal hepatic system compared

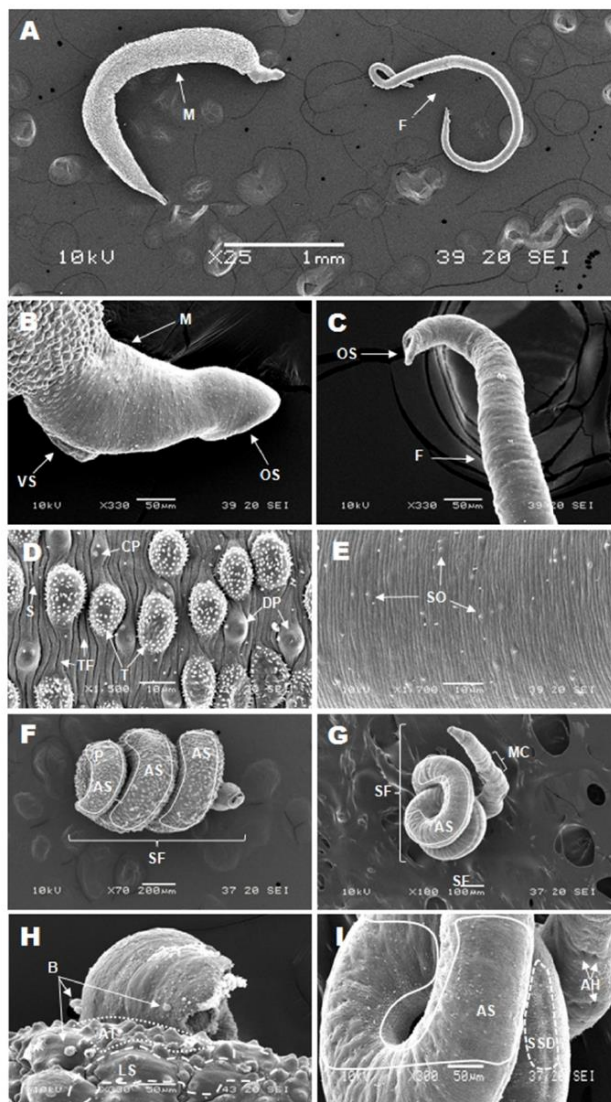


Fig. 1. (A-I) Electronmicrographs of adult *S. mansoni* from the negative control group (A-E: RPMI 1640 medium) and positive control group (F-I: PZQ). (A, 25x) *S. mansoni* couples (M—male and F—female). On the anterior region of male (B, 330x) and female (C, 330x) worms ventral sucker (VS) and oral sucker (OS). (D, 1,500x) On the enlarged view of dorsal male region, it is possible to observe tubercles (T) with spines, parallel folds between tubercles (TF), spines (S), ciliated papillae (CP), and dome-shaped papillae (DP). (E, 1,700x) Female with longitudinal lines and well-distributed sensory organs (SO). (F, 70x and G, 100x) Male and female in spiral format (SF) respectively, both with extensive swelling area (AS). Still being observed peeling (P) in the male and muscle contraction (MC) at the female. (H, 330x) On male median and anterior regions, the presence of bubbles (B) emerging around the tubercles of the male worm. On the dorsal region of male worms we observed agglomerated tubercles (AT) or juxtaposed and loss of spicules (LS). (I, 330x) Tegument with extensive areas of swelling (AS), and highlighted damaged sensorial structures (SSD) and appearance of holes (AH).

to the untreated infected group. Additionally, combined P-MAPA + PZQ or 100 µg/mL P-MAPA alone reduced the number of eggs/g of liver by 67.31 and 69.20%, respectively, compared to the infected mice without treatment.

Schistosoma spp. couples that remain in the vertebrate host blood system exhibit high oviposition rates. This activity results in immunopathological lesions characterized by inflammation and fibrosis in the target organ (Santos et al., 2018; McManus et al., 2018; Schwartz and

Fallon, 2018). The most important pathogenic event in schistosomiasis is the formation of hepatic granuloma and peri-portal hepatic fibrosis (Santos et al., 2018). Eggs are initially laid by females in the mesenteric vessels and subsequently carried by the bloodstream to other organs, including the liver. Human and experimental schistosomiasis is directly related to the development of granulomatous reactions due to the release of soluble antigens produced by *S. mansoni* eggs, which induce an immune response in the host (Hains et al., 2013; Schwartz and Fallon, 2018).

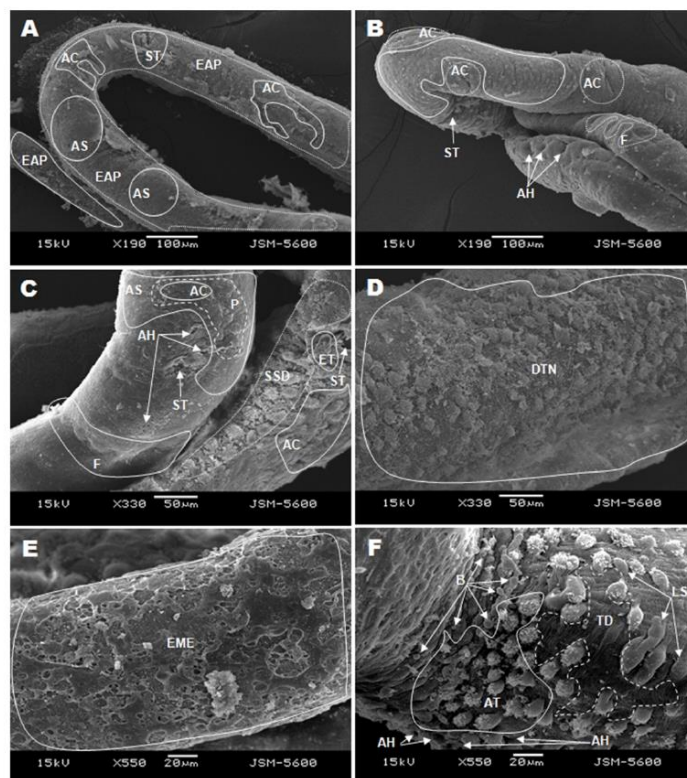


Fig. 2. (A-F). Electronmicrographs of *S. mansoni* adult couples exposed by 24 h to 5, 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$ P-MAPA. 5 $\mu\text{g/mL}$ P-MAPA (A, 190x) shows extensive area of peeling (EAP) of the female worm, with areas of swelling (AS) and cracks (AC) in addition to exposure of the submucosal tissue (ST). In (B, 190x) areas with cracks (AC) and evidence of submucosal tissue (ST) in female and evidence of furrows (F) and appearance of holes (AH) in male worm. At 50 $\mu\text{g/mL}$ P-MAPA (C, 330x) shows peeling (P), areas with cracks (AC), swelling (AS), furrows (F) and presence of holes (AH) with different levels of severity, some with exposure of sub-epithelial tissue (ST) in female worm. While in the male worm it highlights damaged sensorial structures (SSD), eruption of tubercle (ET), exposure of submucosal tissue (ST) and area with cracks (AC). In the median region of the male worm (D, 330x) destruction of numerous tubers (DTN). At 100 $\mu\text{g/mL}$ P-MAPA, the female worm (E, 550x) presented several erosions with exposure of the musculature (EME) and on the male worm (F, 550x), we observed tubercles displacement (TD), agglomerated tubercles (AT), presence of bubbles (B), loss spicules (LS) and appearance of holes (AH).

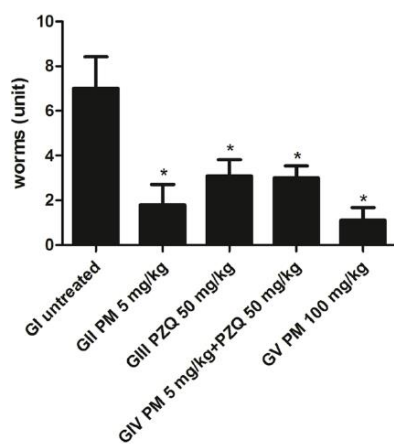


Fig. 3. *Schistosoma mansoni* worm recovery after treatment schemes. *Significant difference compared to untreated infected group ($p < 0.05$).

Mature eggs play a key role in the pathological aspects of schistosomiasis and in the disease transmission. Thus, the high ovicidal effect observed in the oogram for all P-MAPA treatment regimens can surely contribute to decrease the disease transmission, especially at unhealthy environments. The reduction in the number of eggs may be related to the fecundity of the worms. Consistently, P-MAPA acted on the male and female worm tegument and precluded egg laying by the females, actions that impact the worm's oviposition pattern.

Table 3
Liver and gut egg count after isolated treatment with P-MAPA or in association with praziquantel (PZQ) in mice infected with *Schistosoma mansoni*.

Groups	Liver egg count/g $\times 10^3$	% Reduction	Gut egg count/g $\times 10^3$	% Reduction
<i>S. mansoni</i> infected and untreated	16,49 \pm 3,40	–	10,79 \pm 3,09	–
P-MAPA 5 mg/kg	8,84 \pm 1,24	46,39%	1,74 \pm 0,41 ^a	83,86%
P-MAPA 5 mg/kg + PZQ 50 mg/kg	5,39 \pm 1,18 ^a	67,31%	1,28 \pm 0,28 ^a	88,08%
PZQ 50 mg/kg	8,41 \pm 1,80	48,94%	2,14 \pm 0,33 ^a	80,13%
P-MAPA 100 mg/kg	5,07 \pm 3,04 ^a	69,20%	2,29 \pm 1,36 ^a	78,76%

Values are expressed as average \pm SD.

^a significant difference when compared with *S. mansoni* infected and untreated ($p < 0,05$).

Table 4
Oogram pattern and egg development in the gut after isolated P-MAPA treatment or in association with praziquantel (PZQ) in *S. mansoni*-infected mice.

Groups	%Mature eggs ^a	%Immature eggs ^a	%Dead eggs
<i>S. mansoni</i> infected and untreated	63,55 ± 29,31	32,05 ± 16,26	4,40 ± 1,96
P-MAPA 5 mg/kg	33,37 ± 16,13 ^b	29,16 ± 15,65	37,47 ± 21,35 ^a
P-MAPA 5 mg/kg + PZQ 50 mg/kg	43,51 ± 9,34 ^a	15,69 ± 3,18 ^{a,b}	40,79 ± 12,87 ^b
PZQ 50 mg/kg	34,89 ± 15,36 ^b	16,55 ± 4,64 ^{a,b}	48,55 ± 17,43 ^a
P-MAPA 100 mg/kg	43,49 ± 25,00 ^a	30,50 ± 15,46 ^a	25,98 ± 21,24 ^b

Values are expressed as average ± SD.

^a significant difference when compared with *S. mansoni* infected and untreated ($p < 0,0001$).

^b significant difference when compared with P-MAPA 5 mg/kg ($p < 0,0001$).

Table 5
Granuloma amount after isolated P-MAPA treatment or in association with praziquantel (PZQ) in *S. mansoni*-infected mice.

Groups	Granuloma count/3 fields/40x	% Reduction
<i>S. mansoni</i> infected and untreated	27,45 ± 4,14	
P-MAPA 5 mg/kg	10,00 ± 1,51 ^a	63,57%
P-MAPA 5 mg/kg + PZQ 50 mg/kg	8,18 ± 1,66 ^a	70,20%
PZQ 50 mg/kg	16,82 ± 1,71 ^a	38,72%
P-MAPA 100 mg/kg	4,63 ± 2,17 ^{a,b}	83,13%

Values are expressed as average ± SD.

^a significant difference when compared with *S. mansoni* infected and untreated ($p < 0,004$).

^b significant difference when compared with PZQ 50 mg/kg ($p < 0,004$).

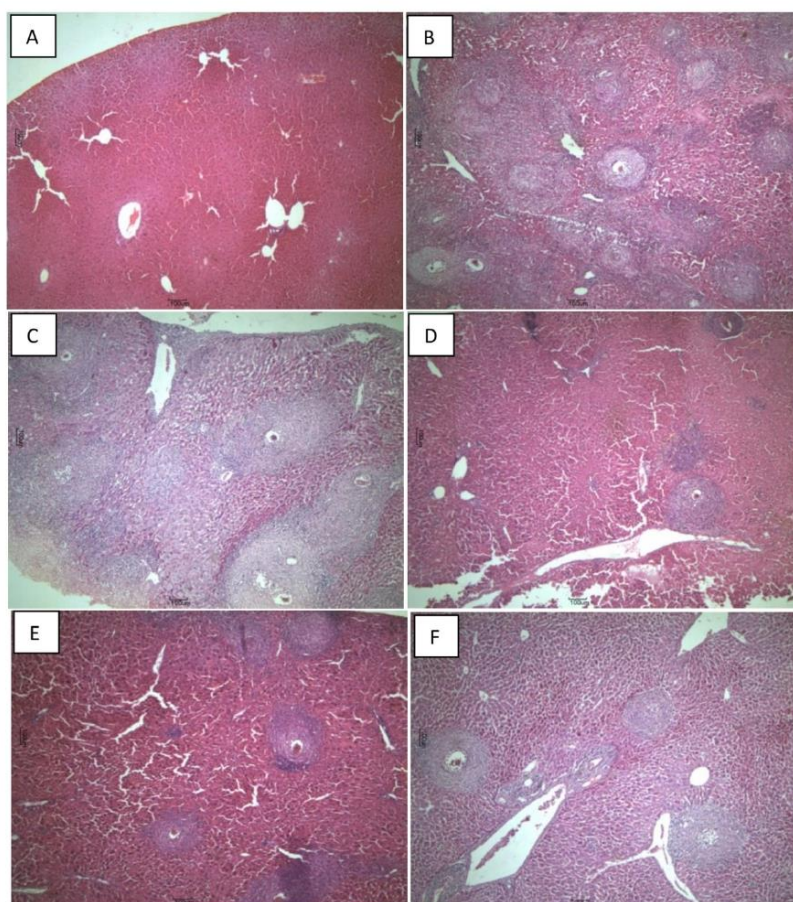


Fig. 4. (A-F). Hepatic granuloma count in the different treatment groups. Images are for hematoxylin and eosin stained sections observed with a 40X objective lens. Images are for: control liver without infection (A); infected control without treatment (B); treatment with 50 mg/kg PZQ (C); treatment with 5 mg/kg P-MAPA (D); treatment with 5 mg/kg P-MAPA + 50 mg/kg PZQ (E); treatment with 100 mg/kg P-MAPA (F).

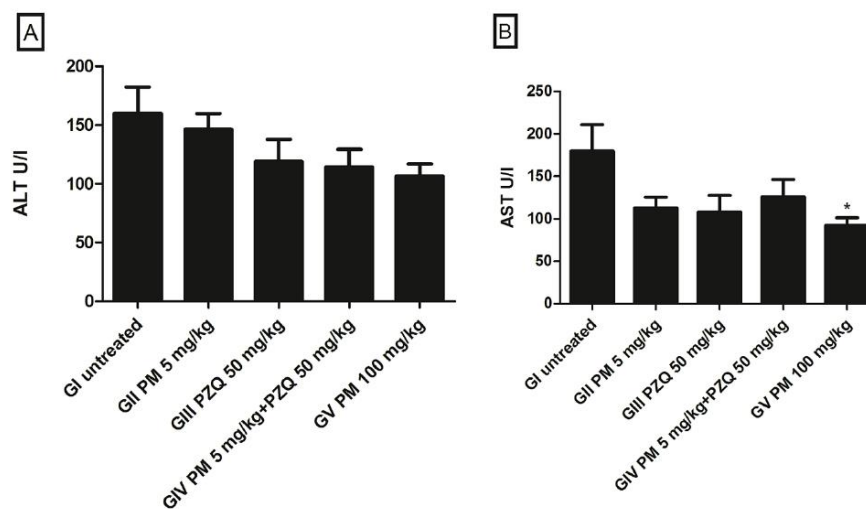


Fig. 5. Effect of different treatment schemes on liver function enzyme activity. Data are shown for alanine amino transferase (ALT; A) and aspartate aminotransferase (AST; B). *Significant difference compared to the untreated infected group ($p < 0.05$).

In all studied treatment regimens, the number of hepatic granulomas was significantly reduced, along with the number of eggs/g of liver; this reduction ranged from 46.38% to 69.20%. Histopathological changes in liver cells are often related to ALT elevation (Mahmoud et al., 2002). The changes can be easily observed in experimental models, but in humans they only occur during late stages of the disease and may disappear if the treatment works adequately. Serum AST and ALT levels may protect the liver from schistosomiasis, consistent with similar results from the use of *Zingbar officinale* extract with immunomodulatory potential (Aly and Mantawy, 2013). Although ALT levels were apparently reduced in infected mice treated with P-MAPA, PZQ, or combination of the two, there was no statistically significant difference when compared to circulating levels in untreated infected animals. On the other hand, AST levels were apparently reduced in infected and treated mice, although this difference was only statistically significant for treatment with 100 mg/kg P-MAPA when compared to circulating levels of the infected and untreated animals.

P-MAPA mechanisms of action are not fully elucidated. The direct effects of P-MAPA on the worm tegument were unexpected, but we hypothesize that parts of the compound, which contains ions, proteins and fatty acids, provoke tegument modification. P-MAPA also exerts immunomodulatory effects, activating Toll-like Receptors (TLRs) and the interferon (IFN) signaling pathways (Fávaro et al., 2012) and associated host immune cells. We believe that these immune pathways activation contribute to the schistosomiasis burden attenuation observed in the current study (reduced egg oviposition, worm recovery, as well as hepatic granulomas). P-MAPA seems to change the schistosomiasis-induced immune profile and oviposition pattern, improving disease control.

In translational terms, the conversion of animal dose to human dose is performed by normalizing their body surface area (Reagan-Shaw et al., 2008). Thus, a daily dose of 100 mg/kg P-MAPA used in the mouse experiments is equivalent to a human dose of 8.1 mg/kg/day, and a daily dose of 5 mg/kg is equivalent to a human dose of 0.40 mg/kg/day. Crucially, the 5 mg/kg treatment regimen used in mice and its human equivalent is smaller than the P-MAPA doses used in a phase I clinical trial. No adverse events were reported in these trials, data that

emphasize its potential for the treatment of schistosomiasis (Farn-abrasilis, 2008).

P-MAPA exerted considerable activity against *S. mansoni* *in vitro* and *in vivo* tests. The experimental data demonstrated that P-MAPA substantially affected the motility of adult worms and the tegument of males and females *in vitro*. P-MAPA monotherapy, or in combination with PZQ, reduced: the number of worms recovered, the number of eggs (up to 69.20% in the liver and up to 88.08% in the intestine), the number of hepatic granulomas (up to 83.13%), and serum AST levels in infected mice. On the other hand, few pieces of the P-MAPA activity on schistosomiasis still need to be evaluated, such as the drug specific mechanism of action on the *S. mansoni* structures and infected host, its effect on young worms and its consequences in the oviposition or sexual organs. Even so, the described data, associated with the lack of side effects, support that P-MAPA can be of great importance to improve the treatment of schistosomiasis and quality of life of the people affected by this neglected disease.

Author contributions

J. C. S. Silva, I. S. Nunes, F. L. Melo and B. M. Carvalho designed the study protocol. J. C. S. Silva, C. R. B. Lins, S. S. Lacerda, R. E. M. Ramos, H. D. A. Araújo, M. R. Melo-Junior, L. C. Alves, F. A. Brayner, I. S. Nunes, F. L. Melo, and B. M. Carvalho carried out the assays and were involved in the analysis and interpretation of all data. J. C. S. Silva, H. D. A. Araújo, I. S. Nunes, F. L. Melo and B. M. Carvalho contributed to drafting the manuscript and/or critically revising the paper and intellectual content. All authors read and approved the final manuscript.

Declaration of Competing Interest

We wish to confirm that there are no known conflicts of interest associated with this publication.

Acknowledgments

The authors thank Sylvania Tavares Paz from the Histotechnology

laboratory from the Pathology Postgraduate Program at UFPE. This work was supported by the Higher Education Personnel Improvement Coordination - Brazil (CAPES) - Finance Code 001. We also thank the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq - grant Universal 475751/2013-2) and the Pernambuco State Science and Technology Support Foundation (FACEPE - grant APQ-0428-2.07/14). H.D.A. Araújo thanks FACEPE for the Researcher Fixation Scholarship (BFP-0080-2.08/20).

Supplementary materials

Supplementary material associated with this article can be found, in the online version, at doi:[10.1016/j.actatropica.2021.105909](https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2021.105909).

References

- Alencar, A.C., Santos, T.A.S., Neves, R.H., Lopes Torres, E.J., Nogueira-Neto, J.F., Machado Silva, J.R., 2016. Simvastatin and artesunate impact the structural organization of adult *Schistosoma mansoni* in hypercholesterolemic mice. *Exp. Parasitol.* 167, 115–123. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2016.05.007>.
- Aly, H.F., Mantawy, M.M., 2013. Efficiency of ginger (*Zingiber officinale*) against *Schistosoma mansoni* infection during host-parasite association. *Parasitol. Int.* 62, 380–389. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2013.04.002>.
- Araújo, H.D.A., Aires, A.L., Soares, C.L.R., Brito, T.G.S., Nascimento, W.M., Martins, M.C.B., Silva, T.G., Brayner, F.A., Alves, L.C., Silva, N.H., Albuquerque, M.C.P.A., Lima, V.L.M., 2019. Usnic acid potassium salt from *Cladonia substellata* (Lichen): synthesis, cytotoxicity and *in vitro* anthelmintic activity and ultrastructural analysis against adult worms of *Schistosoma mansoni*. *Acta Trop* 192, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2018.12.024>.
- Araújo, H.D.A., Santos, V.H.R., Brayner, F.A., Alves, L.C., Silva, N.H., Albuquerque, M.C.P.A., Aires, A.L., Lima, V.L.M., 2020a. *In vitro* activity of usnic acid potassium salt against different developmental stages of *Schistosoma mansoni*: an ultrastructural study. *Acta Trop* 201, 105159. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2019.105159>.
- Araújo, H.D.A., Silva, N.H., Albuquerque, M.C.P.A., Aires, A.L., Lima, V.L.M., 2020b. Potassium usnate, a water-soluble usnic acid salt, shows enhanced activity against *Schistosoma mansoni* *in vitro*. *Exp. Parasitol.* 208, 107779. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2019.107779>.
- Cheever, A.W., Anderson, L.A., 1971. Rate of destruction of *Schistosoma mansoni* eggs in the tissues of mice. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 20, 62–68. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1971.20.62>.
- Colley, D.G., Bustinduy, A.L., Secor, W.E., King, C.H., 2014. Human schistosomiasis. *Lancet* 383, 2253–2264. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)61949-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)61949-2).
- Danso-Appiah, A., De Vlas, S.J., 2002. Interpreting low praziquantel cure rates of *Schistosoma mansoni* infections in Senegal. *Trends Parasitol* 18, 125–129. [https://doi.org/10.1016/s1471-4922\(01\)02209-7](https://doi.org/10.1016/s1471-4922(01)02209-7).
- Melo, A., Justo, G.Z., Queiroz, M.L.S., 2001. Stimulation of myelopoiesis in *Listeria monocytogenes*-infected mice by an aggregated polymer isolated of *Aspergillus oryzae*. *Hum. Exp. Toxicol.* 20, 38–45. <https://doi.org/10.1191/0960322701he933804>.
- Melo, N.I., Magalhães, L.G., Carvalho, C.E., Wakabayashi, K.A., Aguiar, G.P., Ramos, R.C., Mantovani, A.L., Turatti, I.C., Rodrigues, V., Gruppo, M., Cunha, W.R., Veneziani, R.C., Crosti, A.E., 2011. Schistosomicidal activity of the essential oil of *Ageratum conyzoides* L. (Asteraceae) against adult *Schistosoma mansoni* worms. *Molecules* 16, 762–773. <https://doi.org/10.3390/molecules16010762>.
- Durán, N., Gowen, B.B., Costa, F.T., Justo, G.Z., Brocchi, M., Nunes, O.S., Nunes, I.S., 2009. A biotechnological product and its potential as a new immunomodulator for treatment of animal phlebovirus infection: punta Toro virus. *Antiviral. Res.* 83, 143–147. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2009.04.006>.
- Farmabasilis, 2008. P-MAPA immunomodulator. <http://www.farmabasilis.org.br/todos conteudos interna.php?idioma=eng&id=110>. (Accessed 20 april 2020).
- Fávoro, W.J., Nunes, O.S., Seiva, F.R., Nunes, I.S., Woolhiser, L.K., Durán, N., Lenaerts, A.J., 2012. Effects of P-MAPA immunomodulator on toll-like receptors and p53: potential therapeutic strategies for infectious diseases and cancer. *Infect. Agent. Cancer.* 7, 14. <https://doi.org/10.1186/1750-9378-7-14>.
- Greenberg, R.M., 2014. Schistosome ABC multidrug transporters: from pharmacology to physiology. *Int. J. Parasitol. Drugs. Drug. Resist.* 4, 301–309. <https://doi.org/10.1016/j.ijdr.2014.09.007>.
- Hams, E., Avilelo, G., Fallon, P.G., 2013. The schistosoma granuloma: friend or foe? *Front. Immunol.* 4, 89. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2013.00089>.
- Jones, M.K., Gobert, G.N., Zhang, L., Sunderland, P., McManus, D.P., 2004. The cytoskeleton and motor proteins of human schistosomes and their roles in surface maintenance and host-parasite interactions. *Bioessays* 26, 752–765. <https://doi.org/10.1002/bies.20058>.
- Katz, N., Coelho, P.M.Z., 2008. Clinical therapy of schistosomiasis mansoni: the Brazilian contribution. *Acta Trop* 108, 72–78. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2008.05.006>.
- Lorsuwanarat, N., Saowakon, N., Ramasoota, P., Wanichanon, C., Sobhon, P., 2013. The anthelmintic effect of plumbagin on *Schistosoma mansoni*. *Exp. Parasitol.* 133, 18–27. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2012.10.003>.
- Mahmoud, M.R., El-Abhar, H.S., Saleh, S., 2002. The effect of *Nigella sativa* oil against the liver damage induced by *Schistosoma mansoni* infection in mice. *J. Ethnopharmacol.* 79, 1–11. [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(01\)00310-5](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(01)00310-5).
- McManus, D.P., Dunne, D.W., Sacko, M., Utzinger, J., Vennervald, B.J., Zhou, X.N., 2018. Schistosomiasis. *Nat. Rev. Dis. Primers* 4, 13. <https://doi.org/10.1038/s41572-018-0013-8>.
- Melman, S.D., Steinsauer, M.L., Cunningham, C., Kubatko, L.S., Mwangi, I.N., Wynn, N.B., Mutuku, M.W., Karanja, D.M., Colley, D.G., Black, C.L., Secor, W.E., Mkoji, G.M., Loker, E.S., 2009. Reduced susceptibility to praziquantel among naturally occurring Kenyan isolates of *Schistosoma mansoni*. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 3, e504. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000504>.
- Melo, L.M., Perosso, J., Almeida, B.F., Silva, K.L., Somenzari, M.A., de Lima, V.M., 2014. Effects of P-MAPA immunomodulator on toll-like receptor 2, ROS, nitric oxide, MAPK38 and IKK in PBMC and macrophages from dogs with visceral leishmaniasis. *Int. Immunopharmacol.* 18, 373–378. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2013.12.012>.
- Mulvenna, J., Moertel, L., Jones, M.K., Nawaratna, S., Lovas, E.M., Gobert, G.N., Colgrave, M., Jones, A., Loukas, A., McManus, D.P., 2010. Exposed proteins of the *Schistosoma japonicum* tegument. *Int. J. Parasitol.* 40, 543–554. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2009.10.002>.
- Neves, B.J., Andrade, C.H., Cravo, P.V., 2015. Natural products as leads in schistosome drug discovery. *Molecules* 20, 1872–1903. <https://doi.org/10.3390/molecules20021872>.
- Pellegrino, J., Oliveira, C.A., Faria, J., Cunha, A.S., 1962. New approach to the screening of drugs in experimental schistosomiasis mansoni in mice. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 11, 201–215. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1962.11.201>.
- Ramirez, B., Bickle, Q., Youssi, F., Fakorede, F., Mouries, M.A., Nwaka, S., 2007. Schistosomiasis challenges in compound screening. *Expert. Opin. Drug. Discov.* 2, S53–S61. <https://doi.org/10.1517/17460441.2.51.S53>.
- Reagan-Shaw, S., Nihal, M., Ahmad, N., 2008. Dose translation from animal to human studies revisited. *FASEB J* 22, 659–661. <https://doi.org/10.1096/fj.07-9574SF>.
- Sanderson, L., Bartlett, A., Whitfield, P.J., 2002. *In vitro* and *in vivo* studies on the bioactivity of a ginger (*Zingiber officinale*) extract towards adult schistosomes and their egg production. *J. Helminthol.* 76, 241–247. <https://doi.org/10.1079/JOH2002116>.
- Santos, J.C., Batista, A.D., Vasconcelos, C.M.M., Lemos, R.S., Souza Junior, V.R., Dessen, A., Dessen, H., Montenegro, S.M.L., Lopes, E.P.A., Domingues, A.L.C., 2018. Liver ultrasound elastography for the evaluation of periportal fibrosis in schistosomiasis mansoni: a cross-sectional study. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 12, e0006868. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006868>.
- Santiago, M.E., Neto, L.S., Alexandre, E.C., Munari, D.P., Andrade, M.M., Somenzari, M. A., Ciarlini, P.C., de Lima, V.M., 2013. Improvement in clinical signs and cellular immunity of dogs with visceral leishmaniasis using the immunomodulator P-MAPA. *Acta Trop* 127, 174–180. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2013.04.005>.
- Schwartz, C., Fallon, P.G., 2018. *Schistosoma* “Eggs-Itng” the host: granuloma formation and egg excretion. *Front. Immunol.* 9, 2492. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02492>.
- Silva, J.C.S.S., Bernardino, M.V.A.S., Melo, L.F., Sá, M.P.B.O., Carvalho, B.M., 2020. Praziquantel versus praziquantel associated with immunomodulators in mice infected with *Schistosoma mansoni*: a systematic review and meta-analysis. *Acta Trop* 204, 105359. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2020.105359>.
- WHO, 2017. Integrating Neglected Tropical Diseases Into Global Health and development: Fourth WHO Report On Neglected Tropical Diseases. World Health Organization, Geneva.
- Xiao, S.H., Keiser, J., Chollet, J., Utzinger, J., Dong, Y., Endriss, Y., Vennervald, J.L., Tanner, M., 2007. *In vitro* and *in vivo* activities of synthetic trioxolanes against major human schistosome species. *Antimicrob. Agents Chemother.* 51, 1440–1445. <https://doi.org/10.1128/AAC.01537-06>.
- Zwang, J., Olliaro, P.L., 2014. Clinical efficacy and tolerability of praziquantel for intestinal and urinary schistosomiasis: a meta-analysis of comparative and non-comparative clinical trials. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 8, e3286. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003286>.

ANEXO A – PARECER DE APROVAÇÃO DA CEUA



Ministério da Saúde
 FIOCRUZ
 Fundação Oswaldo Cruz
 Instituto Aggeu Magalhães

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Certificado de Aprovação

Certificamos que o projeto intitulado “**AVALIAÇÃO IMUNE E FISIOPATOLÓGICA DOS EFEITOS TERAPÊUTICOS DO IMUNOMODULADOR P-MAPA E DO FITOTERÁPICO SILIMARINA EM CAMUNDONGOS INFECTADOS EXPERIMENTALMENTE POR *Schistosoma mansoni***” protocolado sob nº **137/2018** pelo (a) pesquisador (a) **Fábio Lopes de Melo** está de acordo com a Lei 11.794/2008 e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS do Instituto de Pesquisas Aggeu Magalhães / Fundação Oswaldo Cruz (CEUA/IAM). Na presente versão, este projeto está licenciado e tem validade até 31 de março de 2023 com a finalidade de pesquisa científica. Esses animais serão advindos do Biotério de criação do Instituto de Pesquisas Aggeu Magalhães/Fiocruz-PE. É responsabilidade do coordenador do projeto notificar à CEUA de quaisquer alterações em relação ao projeto. O coordenador concorda que nenhuma dessas mudanças serão implementadas antes de serem aprovadas pela CEUA/IAM.

Quantitativo de Animais Aprovados	
Espécie/Linhagem/Raça	Nº de Animais/Peso/Idade/Sexo
Camundongo heterogênico (Swiss Webster)	254 (30 gr / 28 dias/machos)
Total	254

Recife (PE, Brasil), 19 de março de 2019


 M^a Edileuza Felinto de Brito
 Vice Coordenadora CEUA/IAM

Maria Edileuza Felinto de Brito
 Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no
 Uso de Animais do IAGM/Fiocruz-PE
 Max. Stamp 0464761
 E-mail: edileuza@cpqam.fiocruz.br

Av. Professor Moraes Rego, s/n - Cidade Universitária - Campus da UFPE
 Recife - PE - CEP: 50.670-420
 Telefone: (81) 2101-2500/2101-2600 Fax: (81) 3453-1911
 www.cpqam.fiocruz.br