



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

LUCAS MATHEUS NASCIMENTO SILVA

ATIVIDADE ESQUISTOSSOMICIDA *in vivo* DA PLUMBAGINA (5-HIDROXI-2-METIL-1,4-NAFTOQUINONA) CONTRA VERMES ADULTOS DE *Schistosoma mansonii*

Recife
2020

LUCAS MATHEUS NASCIMENTO SILVA

ATIVIDADE ESQUISTOSSOMICIDA *in vivo* DA PLUMBAGINA (5-HIDROXI-2-METIL-1,4-NAFTOQUINONA) CONTRA VERMES ADULTOS DE *Schistosoma mansonii*

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos necessários ao grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Área de concentração: fármacos e medicamentos.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Mônica Camelo Pessoa de Azevedo Albuquerque
Co-orientador: Prof. Dr. André de Lima Aires

Recife
2020

Catálogo na Fonte
Bibliotecária: Mônica Uchôa, CRB4-1010

S586a Silva, Lucas Matheus Nascimento.
Atividade esquistossomocida *in vivo* da plumbagina (5-hidroxi-2- metil-1,4-naftoquinona) contra vermes adultos de *Schistosoma mansoni* / Lucas Matheus Nascimento Silva. – 2020.
70 f.: il.; tab.; 30 cm.

Orientadora: Mônica Camelo Pessoa de Azevedo Albuquerque.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS.
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Recife, 2020.
Inclui referências.

1. *Schistosoma mansoni*. 2. Naftoquinonas. 3. Esquistossomose. 4. Plumbaginal. I. Albuquerque, Mônica Camelo Pessoa de Azevedo Albuquerque (Orientadora). II. Título.

615.3 CDD (20.ed.) UFPE (CCS2020-079)

LUCAS MATHEUS NASCIMENTO SILVA

ATIVIDADE ESQUISTOSSOMICIDA *in vivo* DA PLUMBAGINA (5-HIDROXI-2-METIL-1,4-NAFTOQUINONA) CONTRA VERMES ADULTOS DE *Schistosoma mansoní*

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos necessários ao grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Área de concentração: fármacos e medicamentos.

Aprovado em: 28/02/2020

BANCA EXAMINADORA

Mônica Camelo Pessoa de Azevedo Albuquerque
Centro de Ciências Médicas – UFPE
Área Acadêmica de Medicina Tropical - UFPE
(Orientadora)

André de Lima Aires
Centro de Ciências Médicas – UFPE
Área Acadêmica de Medicina Tropical – UFPE
(Co-orientador)

Profª Dr Eulália Camelo Pessoa de Azevedo Ximenes
Departamento de Antibióticos - UFPE

Drª Hianna Arely Milca Fagundes Silva
Departamento de Bioquímica – UFPE

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pelo dom da vida.

Aos meus pais, Angela Maria Tenório da Silva e Alcemi do Nascimento Silva, por tantas abdições e sacrifícios para poder me dar uma educação de qualidade, por todo amor, força e carinho.

Aos meus avós maternos, José Tenório da Silva e Maria de Lourdes Tenório da Silva, que sempre me apoiaram e se sacrificaram por mim.

Agradeço a toda minha família, minha vó paterna Marlene, meu avô paterno Severino, minhas tias Nice, Almerina, Nicinha, Alveny e Almeci, e aos meus tios Rahman, Almésio, Almir e Amilton por todo o apoio durante todos esses anos. Agradeço aos meus primos Pedro, Vinicius, Clara, Amanda e Duda e a minha irmã Luma, por tantos anos de união e convivência.

Agradeço aos meus amigos, Larissa, Christian, Izabelle, Analuíza, João Victor Ritinto, Wilza, Lucas, Marta Laís, Mari Belo, Gabi, Carol Targino, Rayana Guimarães, João Victor Patrício, Luiza Vitorino, Maria Bonilla, Isolda Barbosa, Emmilly Mel, Tuarne, Tiago (o cão), Abigail, Wyndly e Alélia por todos os momentos que vivi com eles e pela força que eles sempre passaram para mim.

Agradeço a todos os meus colegas de laboratório, João, Wilza, Lucas, Renan, Paulo, Victor Hugo, Clênio, Adriana e Emilly por toda ajuda e conhecimentos mutuamente trocados.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas por todo apoio e conhecimento trocado.

Ao LIKA, pelo espaço cedido e concessão de materiais para a realização dos experimentos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo suporte financeiro.

À Prof^a. Dr^a. Mônica Camelo Pêsoa Azevedo de Albuquerque, por toda a disponibilidade e troca de conhecimento.

Ao Prof. Dr. André de Lima Aires, por toda orientação e disponibilidade.

A todos meu muito obrigado!

Mas é preciso ter manha
É preciso ter graça
É preciso ter sonho sempre
Quem traz na pele essa marca
Possui a estranha mania
De ter fé na vida
(NASCIMENTO, 1978).

RESUMO

Esquistossomose, ocasionada por platelmintos do gênero *Schistosoma*, caracteriza-se pela formação de granulomas. Praziquantel, único fármaco utilizado em seu tratamento, possui limitações. Novos compostos vêm sendo testados como alternativas para o praziquantel, como plumbagina. Não existem estudos avaliando ação esquistossomicida *in vivo* da plumbagina, sendo nosso trabalho pioneiro nessa avaliação. Em camundongos infectados com *S. mansoni*, tratados com plumbagina, praziquantel e salina, objetiva-se avaliar atividade esquistossomicida *in vivo* da plumbagina. Utilizamos 90 camundongos, em 2 experimentos, administrando-se doses de plumbagina de 8, 16 e 32 mg/kg, praziquantel a 50 mg/kg e salina a 0,9%. A administração ocorreu por gavagem iniciando-se 45 dias pós-infecção, durando 5 dias. Plumbagina a 8, 16 e 32 mg/kg reduziu, respectivamente, a carga total de vermes em 46.85, 46.56 e 59.64%; reduziu em 48.17, 46.525 e 58.33% a carga de vermes fêmeas; reduziu em 58.29, 74.67 e 70.4% o número de ovos nas fezes; reduziu em 55.36, 15.07 e 10.43% o número de ovos no fígado; e reduziu em 57.49, 45.97 e 36.18% o número de ovos no intestino. No oograma, nas doses de 8, 16 e 32 mg/kg a porcentagem de ovos imaturos foi de 62.03, 65 e 71%, respectivamente. Nosso estudo demonstra que plumbagina possui ação esquistossomicida através da redução da carga de vermes totais, vermes fêmeas, número de ovos nos tecidos hepático e intestinal e nas fezes, além de modificar o padrão do oograma.

Palavras-chave: *Schistosoma mansoni*; Naftoquinonas; Esquistossomose; Plumbagina.

ABSTRACT

Schistosomiasis, caused by flatworms of the *Schistosoma* genus, is characterized by the formation of granulomas. Praziquantel, the only drug used in its treatment, has limitations. New compounds are being tested as alternatives to praziquantel, such as plumbagin. There are no studies evaluating schistosomicidal action in vivo of plumbagin, being our pioneering work in this evaluation. In mice infected with *S. mansoni*, treated with plumbagin, praziquantel and saline, the objective is to evaluate schistosomicidal activity in vivo of plumbagin. We used 90 mice in 2 experiments, administering plumbagin doses of 8, 16 and 32 mg/kg, praziquantel at 50 mg/kg and 0.9% saline. The administration occurred by gavage starting 45 days after infection, lasting 5 days. Plumbagin at 8, 16 and 32 mg/kg reduced the total worm load by 46.85, 46.56 and 59.64%, respectively; reduced the burden of female worms by 48.17, 46.525 and 58.33%; reduced the number of eggs in the feces by 58.29, 74.67 and 70.4%; reduced the number of eggs in the liver by 55.36, 15.07 and 10.43%; and reduced the number of eggs in the intestine by 57.49, 45.97 and 36.18%. In the oogram, at doses of 8, 16 and 32 mg/kg, the percentage of immature eggs was 62.03, 65 and 71%, respectively. Our study demonstrates that plumbagin has schistosomicidal action by reducing the burden of total worms, female worms, number of eggs in the liver and intestinal tissues and in the feces, in addition to modifying the oogram pattern.

Key words: *Schistosoma mansoni*; Naphthoquinones; Schistosomiasis; Plumbagin.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Distribuição geográfica das espécies de <i>Schistosoma</i> com importância em saúde pública humana	18
Figura 2	Distribuição epidemiológica da esquistossomose mansônica no território brasileiro.	19
Figura 3	Expansão da esquistossomose no território brasileiro a partir da área endêmica inicial.	20
Figura 4	Principais focos de esquistossomose na Zona da Mata e Litoral de Pernambuco.	21
Figura 5	Municípios prioritários para esquistossomose por Geres.	22
Figura 6	Fases evolutivas do <i>S. mansoni</i> (A – ovo; B – miracídio; C – esporocisto; D – cercárias; E – esquistossômulos; F – vermes adultos).	25
Figura 7	<i>Biomphalaria glabrata</i> .	26
Figura 8	Distribuição das espécies <i>B. glabrata</i> (A), <i>B. straminea</i> (B) e <i>B. tenagophila</i> (C) no território brasileiro.	27
Figura 9	Ciclo Biológico do <i>Schistosoma mansoni</i> .	29
Figura 10	Dermatite cercariana. A – dermatite cercariana em camundongos infectados por via caudal; B – dermatite cercariana em humanos.	30
Figura 11	Alterações nos padrões de resposta imunológica ao longo da infecção por <i>S. mansoni</i> .	32
Figura 12	Diferenças na composição dos granulomas hepático e intestinal nas fases aguda e crônica.	32
Figura 13	Método de Kato-Katz.	33
Figura 14	Enantiômeros que compõem o praziquantel.	35
Figura 15	Estrutura química do praziquantel.	35
Figura 16	Distribuição do gênero <i>Plumbago</i> no Brasil (as diferentes cores apenas representam as regiões onde as plantas são encontradas).	38
Figura 17	Inflorescência (A-E) e flor (F) de <i>Plumbago zeylanica</i> .	39
Figura 18	Caracterização de <i>P. zeylanica</i> e diferenciação das	40

principais espécies do gênero *Plumbago*.

Figura 19	Produto ayurvédico: Chitrak.	41
Figura 20	Estrutura molecular da Plumbagina.	42
Figura 21	Alterações no tegumento de vermes adultos machos (A-C) e fêmeas (D-F) de <i>S. mansoni</i> tratados com plumbagina. A – erosão nas bordas das ventosas oral e ventral; B – descamação e inchaço dos tubérculos; C – lesões no canal ginecóforo; D – lesões e bolhas na região dorso-lateral da extremidade anterior; E – áreas de lesão e descamação do tegumento; F – lesões, descamações e bolhas no tegumento.	43
Figura 22	Infecção de caramujos e camundongos. A – criadouro dos caramujos; B – método de Hoffman; C – precipitado de fezes exposto à luminosidade e calor para liberação de miracídios; D – caramujos em contato com miracídios; E – caramujos expostos à luminosidade e calor para liberação de cercárias; F – suspensão cercariana; G – infecção dos camundongos por via percutânea.	46
Figura 23	Infecção de caramujos e camundongos e protocolo terapêutico.	47
Figura 24	Estádios de maturação dos ovos de <i>S. mansoni</i> avaliados no oograma (A – morto; B – maduro; C – imaturo).	49
Figura 25	Carga de vermes (total e fêmeas) recuperados do sistema porta-hepático e vasos mesentéricos de camundongos infectados pelo <i>S. mansoni</i> . Praziquantel (PZQ), Plumbagina (PLUM). A - $p < 0.001$ quando comparado ao grupo controle total; B - $p < 0.001$ quando comparado ao grupo controle fêmea.	50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Avaliação da PLUM e PZQ sobre a eliminação de ovos nas fezes, carga de ovos nos tecidos hepático e intestinal e no padrão de oviposição em camundongos infectados com <i>Schistosoma mansoni</i> .	52
-----------------	--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de variância
BH	Belo Horizonte
Ca ⁺⁺	Cálcio bivalente
CCl ₄	Tetracloroeto de carbono
CD4	Grupamento de Diferenciação 4
CEEA	Comitê de Ética em Experimentação Animal
cm	Centímetro
DMSO	Dimetilsulfóxido ou sulfóxido de dimetilo
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay ou Ensaio de Imunoabsorção Enzimática
EUA	Estados Unidos da América
g	Grama
GERES	Gerências Regionais de Saúde
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HepG2	Células de carcinoma hepatocelular
IFN-γ	Interferon γ
IL-1β	Interleucina 1β
IL-2	Interleucina 2
IL-4	Interleucina 4
IL-5	Interleucina 5
IL-6	Interleucina 6
IL-10	Interleucina 10
IL-12	Interleucina 12
IL-13	Interleucina 13
KOH	Hidróxido de potássio
Kg	Quilograma
LIKA	Laboratório de Imunologia Keizo Asami
MAPK	Proteínas cinases ativadas por mitogênio
mg	Miligrama
mL	Mililitro

MO	Missouri
µg	Micrograma
µm	Micrômetro
O ₂ ⁻	Radical de oxigênio
OMS	Organização Mundial de Saúde
PCR	Polymerase Chain Reaction ou Reação em Cadeia de Polimerase
PLUM	Plumbagina
PZQ	Praziquantel
RMR	Região Metropolitana do Recife
rpm	Rotações por minuto
R-PZQ	Enantiômero ativo do praziquantel
rSjLD1	Receptor de insulina do <i>Schistosoma japonicum</i>
SANAR	Programa de Enfrentamento às Doenças Negligenciadas
SjAChE	Acetilcolinesterase do <i>Schistosoma japonicum</i>
S-PZQ	Enantiômero inativo do praziquantel
Tc	Tecnécio
TCZ	Triclabendazol
Th1	Resposta imune do tipo 1
Th2	Resposta imune do tipo 2
TNFα	Fator de Necrose Tumoral α
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
°C	Grau Celsius

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	14
2	OBJETIVOS.....	16
2.1	Objetivo Geral	16
2.2	Objetivos Específicos	16
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	17
3.1	Esquistossomose.....	17
3.1.1	Epidemiologia.....	17
3.1.2	Biologia e morfologia.....	22
3.1.3	Ciclo biológico.....	25
3.1.4	Patogenia.....	29
3.1.5	Diagnóstico.....	33
3.2	Praziquantel.....	34
3.3	Gênero <i>Plumbago</i>	37
3.4	Plumbagina.....	41
4	METODOLOGIA.....	45
4.1	Fármacos e reagentes.....	45
4.2	Considerações éticas, animais e formação dos grupos experimentais.....	45
4.3	Infecção de caramujos da espécie <i>Biomphalaria glabrata</i> e camundongos <i>Swiss Webster</i> pela cepa Belo Horizonte (BH).....	45
4.4	Protocolo terapêutico e grupos experimentais.....	47
4.5	Parâmetros parasitológicos.....	47
4.5.1	Contagem de ovos de <i>S. mansoni</i>.....	47
4.5.2	Recuperação dos vermes.....	48
4.5.3	Oograma.....	48
4.5.4	Quantificação de ovos em tecidos hepático e intestinal.....	49
4.6	Análises estatísticas.....	49
5	RESULTADOS.....	50
6	DISCUSSÃO.....	53
7	CONCLUSÃO.....	59
	REFERÊNCIAS.....	60

1 INTRODUÇÃO

A esquistossomose é uma doença infecto-parasitária ocasionada por platelmintos trematódeos do gênero *Schistosoma*. Está presente na América Latina, África, Ásia e em algumas ilhas da Europa, contabilizando cerca de 78 países e territórios. Atualmente, aproximadamente 252 milhões de pessoas encontram-se infectadas ao redor do globo. Destes, em torno de 2 milhões de pessoas são brasileiras, sendo o Brasil o país com o maior número de casos de esquistossomose na América Latina, atingindo 18 dos 26 estados e o Distrito Federal. O Nordeste é a região com o maior número de casos, de internações e de óbitos dentre todas as regiões do Estado Brasileiro, destacando-se os estados de Pernambuco, Bahia, Alagoas e Sergipe. Ademais, 103 dos 185 municípios pernambucanos são considerados endêmicos (DUBEUX ET AL., 2019; JUNG ET AL., 2019; WHO, 2019; BRASIL, 2017).

O *Schistosoma mansoni* possui ciclo heteroxênico, ou seja, precisa de mais de um hospedeiro para concluir seu ciclo. Possui 2 hospedeiros, o hospedeiro intermediário invertebrado é representado por caramujos dulcícolas do gênero *Biomphalaria*, e o hospedeiro definitivo vertebrado é o *Homo sapiens sapiens* e outros mamíferos (MCMANUS et al., 2018).

Atualmente, apenas o praziquantel é utilizado para o tratamento da esquistossomose. Porém, este fármaco não atua, nas doses recomendadas, contra fases jovens do parasita, não modula o dano hepático causado pela enfermidade e casos de cepas de *Schistosoma* resistentes ao fármaco foram relatados (NELWAN, 2019; BRASIL, 2018).

Para evitar essa problemática, novos compostos vêm sendo avaliados como alternativas terapêuticas para o tratamento da esquistossomose. Produtos de origem vegetal correspondem a aproximadamente 50% de todos os novos compostos lançados no mercado farmacêutico até 2014. Dentre esses produtos, destacam-se as naftoquinonas, metabólitos secundários produzidos por fungos, plantas, algas e animais, que possuem atividades anticâncer, contra *Leishmania sp.*, *Plasmodium sp.*, fungos, bactérias, nematódeos e *Schistosoma mansoni*, dentre outros (WELLINGTON et al., 2019; ROYO et al., 2019; CHA et al., 2019; AWASTHI et al.,

2016; FARDIN et al., 2015; AIRES et al., 2014; FERREIRA et al., 2014; LORSUWANNARAT et al., 2013; SILVA et al., 2012) .

Dentre as naftoquinonas, evidencia-se a plumbagina, extraída principalmente das raízes de embriófitas do gênero *Plumbago*. Também pode ser encontrada em outras espécies vegetais das famílias Plumbaginaceae, Dioncophyllaceae, Anastrocladaceae, Droseraceae e Ebenaceae. A plumbagina apresenta atividades anticâncer, antiangiogênica, antioxidante, anti-fúngica, anti-bacteriana, antiaterosclerótica, anti-alérgica, hepatoprotetiva, é um inibidor da DNA topoisomerase II humana e reprime a atividade da telomerase (PEREYRA et al., 2019; LIU et al., 2017; WANG et al., 2016; NAYAK et al., 2015).

Com relação a atividade antiparasitária da plumbagina, estudos destacam sua ação contra *Leishmania sp.* (AWASTHI et al., 2016), *Plasmodium sp.* (GUPTA et al., 2018), *Trypanosoma cruzi* (PINTO et al., 2009), e contra platelmintos dos gêneros *Fasciola* (LORSUWANNARAT et al., 2014), *Paramphistomum* (SAOWAKON et al., 2013) e *Schistosoma* (LORSUWANNARAT et al., 2013; ZHANG e COUTLAS, 2013) *in vitro*.

Sendo assim, nosso estudo visa avaliar a ação esquistossomicida *in vivo* da plumbagina frente a vermes adultos de *S. mansoni*. A análise da ação esquistossomicida da plumbagina *in vivo* é, até o momento, inédita, e visa a obtenção de uma alternativa de tratamento para a esquistossomose.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a atividade esquistossomicida, *in vivo*, da plumbagina (5-hidroxi-2-metil-1,4-naftoquinona) contra o *Schistosoma mansoni*.

2.2 Objetivos específicos

Em camundongos fêmeas infectadas com *Schistosoma mansoni*, tratadas com Plumbagina (PLUM), Praziquantel (PZQ) e livre de intervenção terapêutica, foi objetivado:

- Avaliar a carga parasitária através da recuperação de vermes adultos dos vasos mesentéricos e veia porta;
- Quantificar a carga de ovos em tecido hepático e intestinal;
- Quantificar a carga de ovos nas fezes de camundongos infectados com *S. mansoni*;
- Avaliar o padrão de oviposição no tecido intestinal;

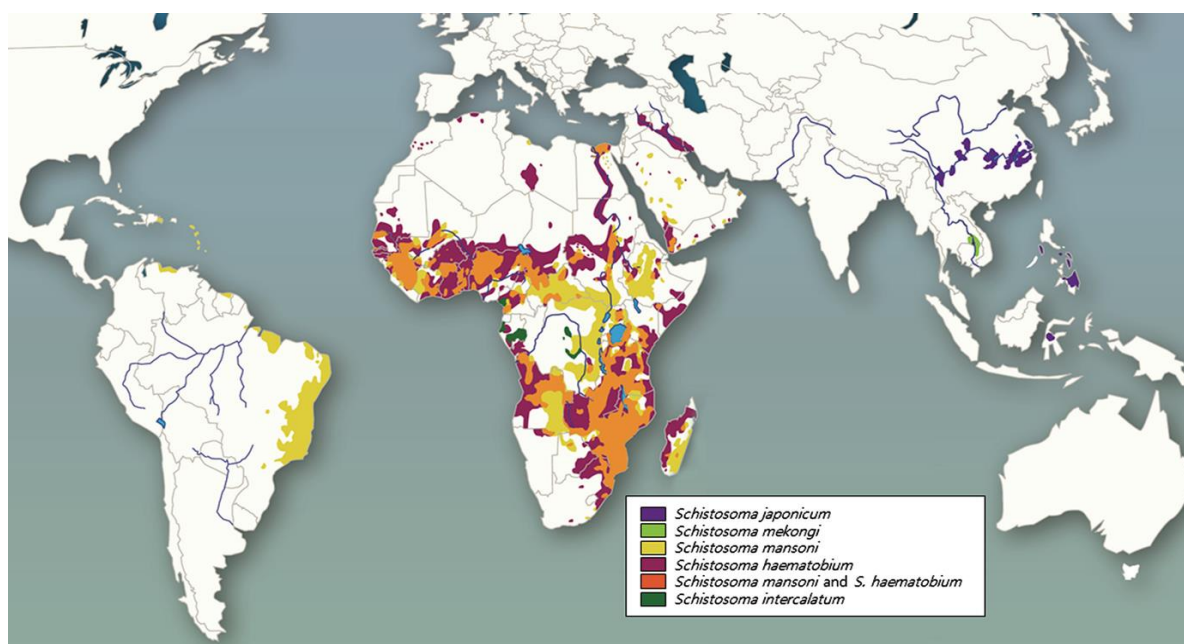
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Esquistossomose

3.1.1 Epidemiologia

A esquistossomose é uma doença parasitária negligenciada, causada por metazoários acelomados do gênero *Schistosoma* e está intimamente ligada a ambientes aquáticos. Esses parasitas pertencem ao filo Platyhelminthes, classe Trematoda, Subclasse Digenea, ordem Strigeiformes e família Schistosomatidae. Cerca de 779 milhões de pessoas vivem em áreas de risco para a infecção e por volta de 252 milhões de pessoas encontram-se infectadas, em 78 países e territórios (WHO, 2019; MORAES et al., 2019; MCMANUS, 2018). Está presente em regiões tropicais e subtropicais do globo, principalmente em comunidades em situação de pobreza crônica em áreas rurais e urbanas, em áreas sem acesso à água potável e saneamento básico adequado (WHO, 2019). A inexistência de um serviço de saneamento adequado facilita a contaminação de coleções hídricas por fezes contendo ovos de *S. mansoni*, acarretando no início do ciclo da doença (GOMES et al., 2016; PERNAMBUCO, 2013). Portanto, é classificada como uma Doença Relacionada ao Saneamento Ambiental Inadequado (DRSAI) (NUGEM, 2015). Sendo assim, está associada ao ciclo doença-empobrecimento-pobreza, sendo seu perfil epidemiológico determinado por fatores ecológicos, biológicos, socioeconômicos e culturais de uma sociedade (MELO et al., 2019; DAWAKI et al., 2016). Está presente em grande parte do continente africano, desde as margens do rio Nilo, até as florestas tropicais da República Democrática do Congo, Angola e outras nações africanas, no Oriente Médio, na América Latina (Brasil, Venezuela, Suriname), Caribe, Sudeste Asiático (compreendendo áreas da República Popular da China, Indonésia, Filipinas, Camboja, Laos etc.) a ilha francesa da Córsega e a ilha italiana de Lampedusa (Figura 1) (WHO, 2019; BARRETO et al., 2016).

Figura 1 - Distribuição geográfica das espécies de *Schistosoma* com importância em saúde pública humana.



Fonte: JUNG et al., 2019.

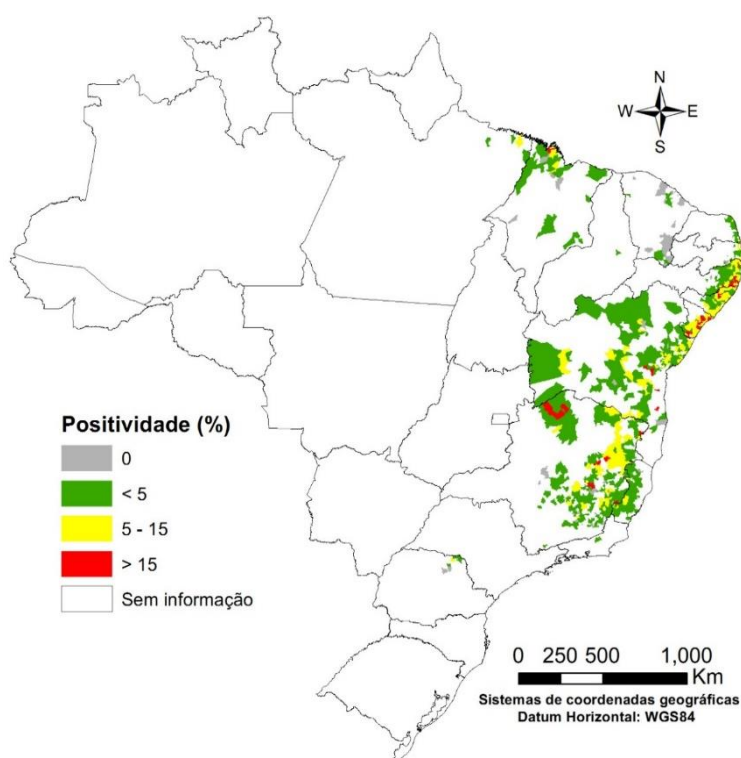
No Brasil, a esquistossomose mansônica, também conhecida como xistose, barriga d'água ou mal-do-caramujo, é considerada uma endemia, atingindo 18 estados (Maranhão, Piauí, Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Alagoas, Sergipe, Bahia, Espírito Santo, Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo, Pará, Goiás, Rio Grande do Sul, Paraná e Santa Catarina) e o Distrito Federal, podendo, assim, ser detectada em todas as regiões do país (Figura 2). Aproximadamente 2 milhões de pessoas estão infectadas pelo *S. mansoni* no Brasil (DUBEUX et al., 2019; BRASIL, 2017). Estima-se que o país tenha um gasto aproximado de 155 milhões de reais por ano com a doença (NASCIMENTO et al., 2018).

O *S. mansoni* chegou ao Brasil através do tráfico de escravos advindos do continente africano, realizado pelo então Império Português. Estabeleceu-se aqui devido ao encontro de condições favoráveis como clima e hospedeiro intermediário favoráveis e abundância de córregos, lagoas e outros ambientes aquáticos (SOUZA, 2011). Esses fatores favoreceram a infecção de trabalhadores rurais, principalmente àqueles que laboravam em canaviais. Com a queda da indústria canavieira e o fim do tráfico de escravos, ocorreu uma intensa migração para outras regiões do país,

expandindo a área favorável para a infecção por *S. mansoni* (Figura 3) (BRASIL, 2018).

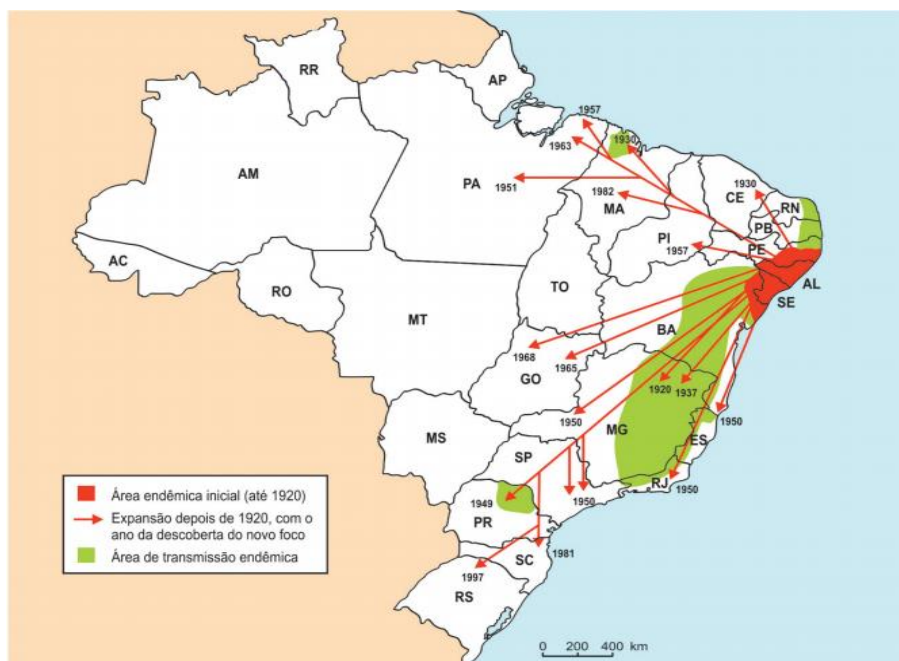
A região Nordeste apresenta o maior número de casos da doença, representando cerca de 91,3% dos casos em regiões endêmicas e 29,7% dos casos em regiões não-endêmicas em 2017 (BRASIL, 2019). Além disso, detém a maior taxa de óbitos decorrente da esquistossomose (64,5%) e 45,7% do número de internações. Dentre os estados que compõem a região, Pernambuco, Bahia, Sergipe, Alagoas e Maranhão se destacam com as maiores taxas de casos confirmados da doença. Tendo, Pernambuco e Bahia, o maior número de casos confirmados tanto em áreas endêmicas, quanto em áreas não endêmicas (BRASIL, 2019).

Figura 2 - Distribuição epidemiológica da esquistossomose mansônica no território brasileiro.



Fonte: <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/leia-mais-o-ministerio/656-secretaria-svs/vigilancia-de-a-a-z/esquistossomose/11244-situacao-epidemiologica>. Acesso em: 07/02/2019.

Figura 3 – Expansão da esquistossomose no território brasileiro a partir da área endêmica inicial.



Fonte: BRASIL, 2018.

Em Pernambuco, a esquistossomose é considerada endêmica em 103 dos 185 municípios que compõem o estado, concentrando-se nas zonas da mata norte e sul e na Região Metropolitana do Recife (RMR) (DUBEUX et al., 2019). O município de Vitória de Santo Antão, por exemplo, possui alta incidência e prevalência da doença, sendo considerado um município prioritário para ações de vigilância e controle da esquistossomose pela Secretaria de Saúde do Estado (GOMES et al., 2016). A migração de populações parasitadas do ambiente rural para o urbano tem promovido o alastramento da doença, atingindo áreas urbanas e litorâneas do estado (GOMES et al, 2016; GOMES et al., 2012). O processo desordenado de ocupação observado nas periferias das cidades brasileiras, associado à ausência de infraestrutura sanitária, facilita a promoção de criadouros de caramujos, devido aos detritos orgânicos existentes na água e esgoto não tratados que servirão de alimento para esses moluscos (GOMES et al., 2016). Os períodos de fortes chuvas facilitam o aparecimento de criadouros, temporários e permanentes, do hospedeiro intermediário, levando a maior chance de contato com o homem e, consequentemente, favorecendo a transmissão da enfermidade (GOMES et al., 2014). Isto é observado atualmente na Zona da Mata e Litoral pernambucanos, o

crescimento desordenado de suas cidades, associado ao transbordamento de rios que as cortam, podem deslocar caramujos para a região urbana, contribuindo para a formação de novos criadouros e, em consequência, para a transmissão da esquistossomose, podendo levar à infecção em massa (GOMES et al., 2016; BARBOSA et al., 2014). Apesar de estar mais confinada ao ambiente rural, vários casos de esquistossomose aguda surgiram em ambientes como o Forte Orange, em Itamaracá e Porto de Galinhas, em Ipojuca (Figura 4) (BARBOSA, 2017). Em consequência, Pernambuco é o estado brasileiro de maior endemicidade para esta parasitose, apresentando uma média de óbitos correspondente ao quádruplo da média nacional (BRASIL, 2019; PERNAMBUCO, 2015). Em virtude disso, o governo do estado desenvolveu o Programa de Enfrentamento às Doenças Negligenciadas – SANAR, visando a redução e/ou eliminação da carga de 7 doenças transmissíveis negligenciadas, dentre elas a esquistossomose (PERNAMBUCO, 2015). Assim, o Projeto SANAR selecionou 40 municípios situados em áreas endêmicas do estado para fortalecer ações de controle tanto para a esquistossomose, quanto para geohelmintíases, distribuindo-os em Gerências Regionais de Saúde, as GERES (Figura 5) (PERNAMBUCO, 2015).

Figura 4 – Principais focos de esquistossomose na Zona da Mata e Litoral de Pernambuco.



Fonte: <http://slideplayer.com.br/slide/5610025/>. Acesso em 28/03/2019.

Figura 5 – Municípios prioritários para esquistossomose por Geres.



Fonte: Secretaria Executiva de Vigilância em Saúde/SES-PE, 2014.

Distribuição dos municípios prioritários para esquistossomose por Geres. Pernambuco, 2011.

I GERES	Araçoiaba, Cabo de Santo Agostinho, Chã de Alegria, Moreno e Vitória de Santo Antão.
II GERES	Bom Jardim, João Alfredo, Lagoa do Carro, Machados, Nazaré da Mata, Paudalho, Tracunhaém e Vicência.
III GERES	Água Preta, Belém de Maria, Cortês, Escada, Jaqueira, Marial, São Benedito do Sul e Tamandaré.
V GERES	Bom Conselho.
XII GERES	Aliança, Ferreiros, Goiana, Itambé, Itaquitinga, São Vicente Férrer e Timbaúba.

Fonte: Secretaria Executiva de Vigilância em Saúde/SES-PE.

Fonte: PERNAMBUCO, 2015.

3.1.2 Biologia e morfologia

O *S. mansoni* apresenta seis fases evolutivas durante seu ciclo evolutivo, são elas: ovo, miracídio, esporocisto, cercária, esquistossômulo e vermes adultos (NEVES, 2016).

- **Ovo**

O ovo (Figura 6 - A) mede aproximadamente 150 µm de comprimento e 60 µm de largura. No seu interior há o miracídio, o qual pode ser visto devido a transparência da casca. Sua principal característica é a presença de um espículo lateral voltado para trás. A presença e a localização dos espículos são cruciais para a diferenciação das espécies de helmintos do gênero *Schistosoma* (NEWMAN, 2019; LOVERDE, 2019; NEVES, 2016).

- **Miracídio**

O miracídio (Figura 6 – B) possui formato cilíndrico e mede aproximadamente 180 µm de comprimento por 64 µm de largura. É liberado do ovo em ambientes aquáticos e apresenta cílios para se locomover neste ambiente. Estes cílios auxiliam o miracídio na procura do hospedeiro intermediário (*Biomphalaria sp.*). Apresenta, na região anterior, uma estrutura denominada *Terebratorium*, onde estão localizadas as terminações das glândulas adesivas e da glândula de penetração, sendo importante para a penetração no hospedeiro intermediário. Portanto, é a forma infectante para o molusco (NEWMAN, 2019; LOVERDE, 2019; NEVES, 2016)

- **Esporocisto**

O esporocisto (Figura 6 – C) é caracterizado por se apresentar como um tubo enovelado repleto de células germinativas em multiplicação. Esta fase é imóvel. Há três tipos de esporocisto: primário, secundário e terciário (CAVALCANTI, 2008; NEVES, 2016).

- **Cercária**

A cercária (Figura 6 – D) possui o corpo dividido em cabeça e cauda, apresenta 2 ventosas (oral e ventral), com a cauda não apresentando órgãos definidos. Na ventosa oral situam-se as terminações das glândulas de penetração, já a ventosa ventral auxiliará na sua fixação à pele do hospedeiro (NEWMAN, 2019; LOVERDE, 2019; NEVES, 2016).

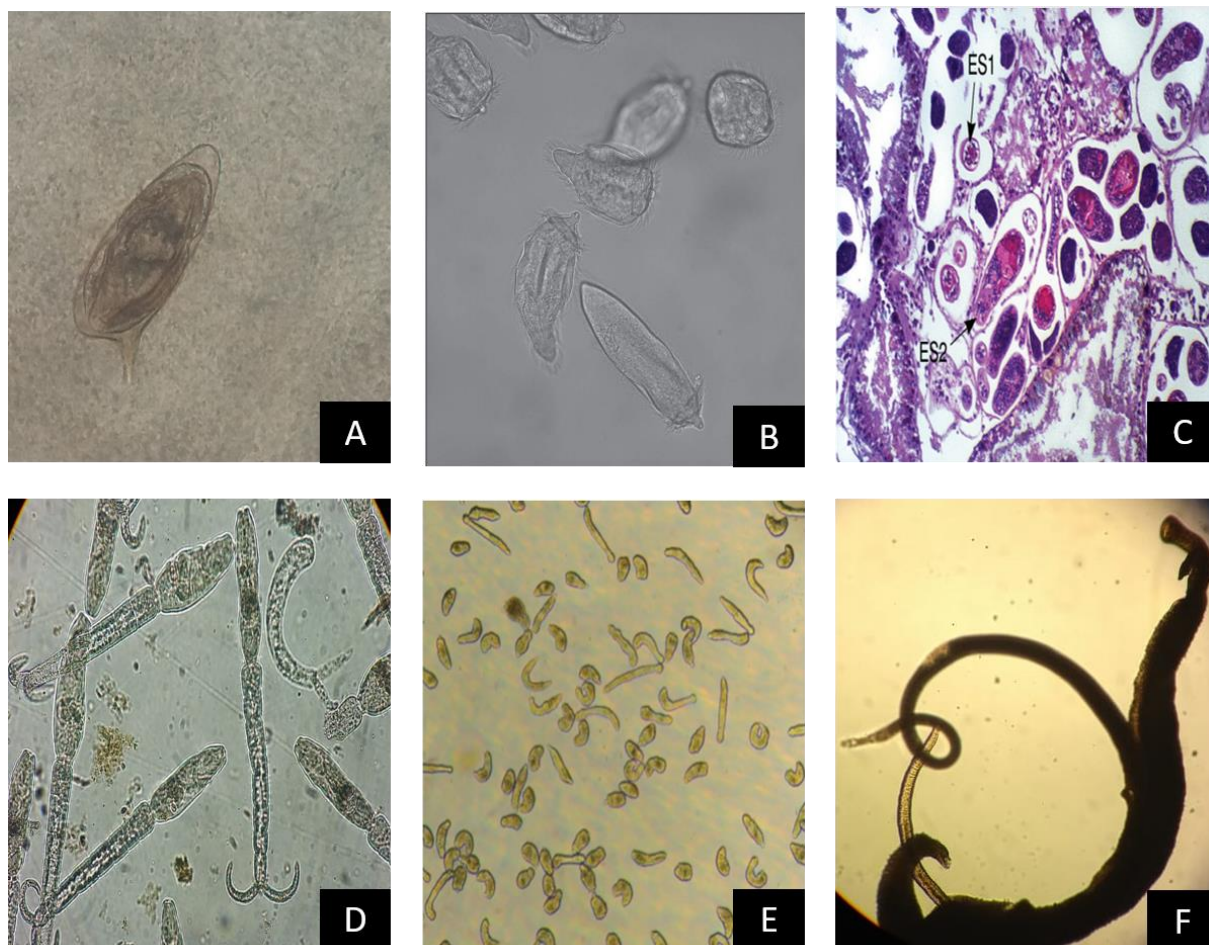
- **Esquistossômulo**

O esquistossômulo (Figura 6 – E) representa a fase de transição de um organismo de vida livre para um organismo de vida parasitária. Algumas características presentes nos esquistossômulos e ausentes nas cercarias são ausência de cauda e glicocálix, e respiração anaeróbia. Devido à ausência de glicocálix, o esquistossômulo é mais permeável à água (LOVERDE, 2019; CAVALCANTI, 2008).

- **Vermes adultos**

Os vermes adultos (Figura 6 – F) possuem dimorfismo sexual, ou seja, macho e fêmea são morfologicamente distintos. O macho mede cerca de 1cm de comprimento, é esbranquiçado e possui o tegumento recoberto de tubérculos (que são pequenas projeções deste tegumento). Possui 2 ventosas: oral e ventral. Além disso, uma característica marcante no macho é a presença do canal ginecóforo, que é formado quando ele se dobra para albergar a fêmea e posterior fecundação. Isto é importante devido à ausência de órgão copulador no macho, ele libera os espermatozoides dentro do canal ginecóforo, para que estes possam alcançar a fêmea. Já a fêmea mede cerca de 1,5 cm, é mais escura devido a presença de sangue semidigerido e seu tegumento é liso. Também possui 2 ventosas: oral e ventral. Na ventosa ventral estão localizadas estruturas reprodutivas como a vulva, útero e ovário. Possui ainda, na sua metade posterior, glândulas vitelínicas, que serão de crucial importância na manutenção e nutrição dos ovos (NEWMAN, 2019; LOVERDE, 2019; NEVES, 2016).

Figura 6 – Fases evolutivas do *S. mansoni* (A – ovo; B – miracídio; C – esporocisto; D – cercárias; E – esquistossômulos; F – vermes adultos).



Fonte: A, D, F – do autor; B – <http://www.fiocruz.br/ioc/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?infoid=511&sid=32&tpl=printview>; C, E – CARVALHO, 2008.

3.1.3 Ciclo biológico

Seis espécies do gênero *Schistosoma* são agentes etiológicos da esquistossomose em diferentes continentes do planeta: *Schistosoma mansoni*, *S. guineensis*, *S. haematobium*, *S. japonicum*, *S. intercalatum* e *S. mekongi* (WHO, 2019; MCMANUS et al., 2018). O *S. japonicum* está presente na China, Indonésia, Japão e Filipinas, é agente da esquistossomose japônica ou moléstia de Katayama (WHO, 2019). O *S. haematobium* está presente na África, Oriente Médio e na Córsega, é agente da esquistossomose vesical ou hematúria do Egito (WHO, 2019; NEVES, 2016). O *S. guineensis* e o *S. intercalatum* estão presentes nas florestas da África Central, agentes da esquistossomose intestinal (WHO, 2019; NEVES, 2016).

O *S. mekongi* está presente em áreas do Camboja e do Laos (sub-região do rio Mekong), ocasionando dores abdominais, melema, podendo levar a danos hepáticos e falência renal (DA SILVA et al., 2013; ELBAZ and ESMAT, 2013; MUTH et al., 2010). O *S. mansoni* está presente na África, Oriente Médio, Caribe, Brasil, Venezuela e Suriname, agente da esquistossomose mansônica (WHO, 2019). Além dessas espécies, *S. bovis* e *S. margrebowiei* podem infectar humanos (NELWAN, 2019).

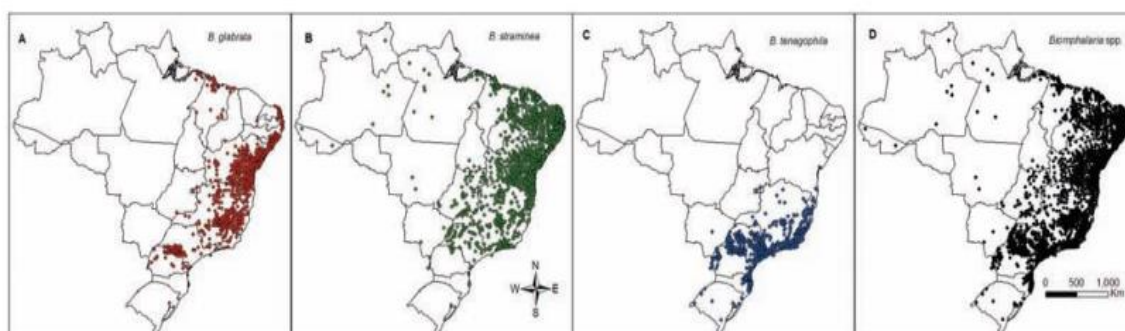
O ciclo do *S. mansoni* necessita de dois hospedeiros para ser completado, portanto, constitui-se como um ciclo heteroxênico. O hospedeiro definitivo é o vertebrado *Homo sapiens sapiens* e outros mamíferos, enquanto os hospedeiros intermediários são metazoários invertebrados pertencentes ao filo Mollusca, classe Gastropoda, ordem Basommatophora, família Planorbidae e gênero *Biomphalaria*, de concha planispiral e dulcícolas. No Brasil, as espécies encontradas naturalmente infectadas são *Biomphalaria glabrata* (Figura 7), *B. tenagophila* e *B. straminea*, possuindo distribuições diferentes ao longo do território brasileiro (Figura 8). Outras espécies, como *B. amazonica* e *B. peregrina*, foram infectadas experimentalmente, levando a classificá-las como potenciais hospedeiras. O ciclo do *S. mansoni* envolve dois ambientes distintos: o ambiente aquático e o interior dos hospedeiros. (MCMANUS et al., 2018; NEVES, 2016).

Figura 7 – *Biomphalaria glabrata*.



Fonte: do autor.

Figura 8 – Distribuição das espécies *B. glabrata* (A), *B. straminea* (B) e *B. tenagophila* (C) no território brasileiro.



Fonte: SCHOLTE et al., 2012.

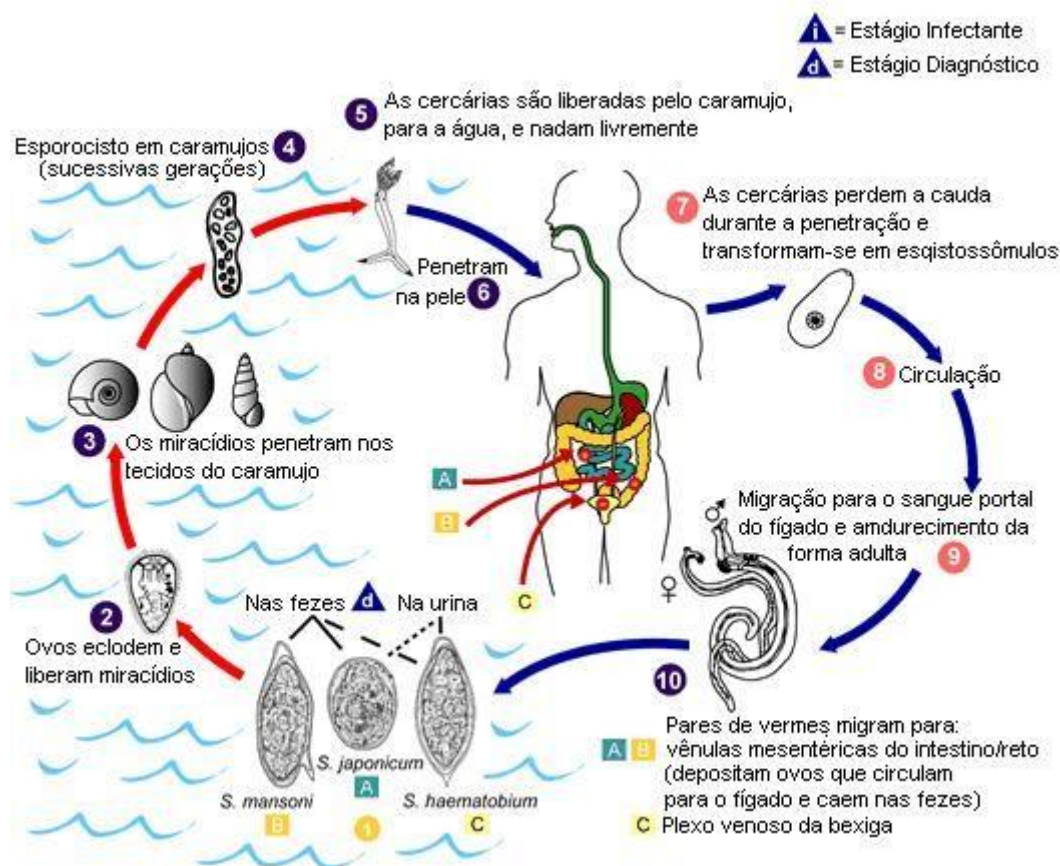
O ciclo se inicia com a deposição de fezes contendo ovos do parasita em coleções hídricas. Os miracídeos, contidos nos ovos, são liberados através de estímulos, como temperaturas altas, oxigenação da água e intensidade da luz. Após a liberação, esta fase evolutiva ciliada buscará o hospedeiro intermediário, *Biomphalaria sp.* Ao encontrar o caramujo, o *terebratorium* descarrega o conteúdo das glândulas adesivas e realiza movimentos rotatórios e contráteis levando à penetração nos tecidos do hospedeiro intermediário. Além disso, há liberação de enzimas proteolíticas que auxiliam nesse processo. Esta fase ciliada perde, progressivamente, estruturas no processo de penetração, originando o esporocisto. Este é inicialmente móvel (movimentos amebóides), tornando-se imóvel. Possui células germinativas que se multiplicam (poliembrionia), fazendo com que esta fase, também denominada de esporocisto-primário, esporocisto-mãe ou esporocisto I, dobre seu tamanho. A formação do esporocisto secundário começa com aglomerados de células germinativas nas paredes do esporocisto I que originam septos, dividindo o esporocisto-mãe em centenas de camadas, e cada camada ou septo deste é considerado um esporocisto II. A partir de células embrionárias contidas no esporocisto secundário há a formação do esporocisto III ou terciário. A partir destes serão originadas as cercárias. Um único miracídio pode gerar de 100 a 300.000 cercárias e *Biomphalaria glabrata* pode eliminar cerca de 4500 cercárias por dia. As cercárias serão liberadas sob ação de estímulos como luminosidade e temperatura. Irão, com auxílio da cauda, nadar em busca do seu hospedeiro definitivo, o *Homo sapiens*. Ao encontrá-lo irão penetrar na pele e mucosas (podendo penetrar em outros animais). Após a penetração a cercária perde sua

cauda e, a partir deste evento, passa a ser denominada como esquistossômulo. Este migrará pelo tecido subcutâneo até penetrarem em um vaso sanguíneo. Assim, serão levados aos pulmões, posteriormente ao coração, chegando através da circulação ao sistema porta, onde irão se alimentar e desenvolver, dando origem a vermes adultos machos e fêmeas. Os vermes adultos migrarão para a veia mesentérica inferior, onde acontecerá a oviposição. Os ovos são depositados ainda imaturos, ocorrendo a formação do miracídio e consequente amadurecimento dos ovos. Uma fêmea põe cerca de 400 ovos por dia, onde aproximadamente metade destes alcançam o ambiente exterior. Estes serão eliminados nas fezes, assim reiniciando o ciclo (Figura 9) (ALMEIDA, 2018; MCMANUS et al., 2018; LOYO, 2018; NEVES, 2016).

Já foram achados helmintos de *S. mansoni* em roedores selvagens, primatas, marsupiais, camundongos, hamsters, cães, suínos, caprinos, ruminantes, lagomorfos etc., com eliminação de ovos nas fezes, porém a participação desses animais, denominados hospedeiros permissivos ou reservatórios, na transmissão e epidemiologia da esquistossomose ainda não está clara (BRASIL, 2017; SOUZA, 2011). Roedores como *Holochilus sp.* e *Nectomys squamipes* hospedam parasitas adultos e liberam ovos maduros nas fezes, tornando-se um problema no controle desta helmintose em regiões de ocorrência desses mamíferos (GENTILE, 2010).

Profissionais que trabalham em contato com coleções hídricas contendo caramujos infectados, como pescadores, lavadeiras e marisqueiras, são caracterizados como população de risco para esquistossomose (MELO, 2019). Além disso, atividades de lazer e plantio de culturas irrigadas nestes locais são potenciais locais de risco para a infecção pelo helminto (BRASIL, 2017).

Figura 9 – Ciclo Biológico do *Schistosoma mansoni*.



Fonte: <https://www.todamateria.com.br/esquistossomose/>

3.1.4 Patogenia

A esquistossomose pode ser clinicamente classificada em duas fases: aguda e crônica. Ocorrendo a postura dos ovos, sempre estes estarão presentes, sob a condição de que os vermes permaneçam viáveis. Portanto, a fase aguda pode ainda ser dividida em pré-patente e patente, que ocorrem antes e depois da oviposição, respectivamente. Tal patência se refere ao encontro dos ovos na amostra biológica utilizada para diagnóstico, que na esquistossomose, são as fezes (LOVERDE, 2019).

A fase aguda é relatada principalmente em indivíduos expostos ao *S. mansoni* pela primeira vez, como viajantes e imigrantes. Indivíduos que habitam áreas endêmicas apresentam poucos sintomas nessa fase, pois estão em contato contínuo com o parasita. A intensidade dos sintomas depende da carga parasitária, cepa do parasita, do sistema imunológico do hospedeiro, padrão alimentar, entre outros fatores (LOVERDE, 2019; NEWMAN, 2019; SOUZA et al., 2011).

Inicia-se com a penetração das cercárias, gerando uma resposta de hipersensibilidade sistêmica, acarretando numa reação prurítica maculopapular, denominada de dermatite cercariana (Figura 10). Em dois dias, tal reação inflamatória constitui-se principalmente por linfócitos e neutrófilos, há produção local de quimiocinas e citocinas como IL-1 β , IL-6, e IL-10. Aproximadamente 5 dias depois, há também a presença de IFN- γ , IL-4 e linfócitos T CD4+ (LOVERDE, 2019; NEWMAN, 2019; MCMANUS, 2018; OLIVEIRA, 2016; SOUZA, et al., 2011).

Figura 10 – Dermatite cercariana. A – dermatite cercariana em camundongos infectados por via caudal; B – dermatite cercariana em humanos.



Fonte: A – do autor; B – https://edisciplinas.usp.br/pluginfile.php/4469213/mod_resource/content/1/Aula_Esq_uisto_IMT2005.pdf.

A migração dos esquistossômulos pode gerar hepatite aguda, infiltrados de neutrófilos, eosinófilos e linfócitos, calafrios, tosse não produtiva, diarreia, anorexia entre outros. Os sintomas surgem de 3 a 4 semanas após a infecção, são eles: mal-estar, febre, linfadenopatia, diarreia, sudorese, entre outros (LOVERDE, 2019; NEWMAN, 2019; MCMANUS, 2018; OLIVEIRA, 2016; BRASIL, 2014; SOUZA, et al., 2011).

Na fase aguda, antes da oviposição, uma resposta imune do tipo Th1 é desencadeada pelo *S. mansoni*, havendo intensa produção de TNF- α , IFN- γ , IL-2,

IL-6 e IL-12. Na fase aguda, após o início da oviposição, a liberação de antígenos pelos ovos estimulam a produção de IL-4 e IL-5, que, por sua vez, estimulam a produção de IgE e eosinófilos. Há aumento na produção de IL-10 e IL-13, importantes na diferenciação da resposta imune de um perfil Th1 para Th2. Todo esse aparato é necessário para ativação e convocação das células envolvidas na formação do granuloma (Figura 11) (LOVERDE, 2019; NEWMAN, 2019; MCMANUS, 2018; OLIVEIRA, 2016; SOUZA, et al., 2011).

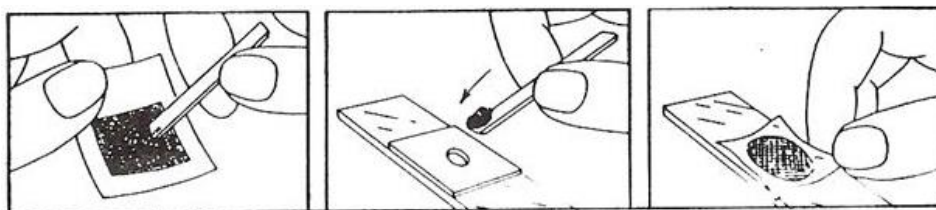
A produção de antígenos pelos ovos faz com que linfócitos T CD4⁺ e linfócitos B, eosinófilos e macrófagos interfiram na produção e deposição da matriz extracelular, gerando uma estrutura esférica ao redor dos ovos, denominada granuloma. No granuloma podem ser encontrados fibroblastos, e células gigantes multinucleadas, por exemplo. Com o passar da infecção, esta estrutura conterá outros tipos celulares como linfócitos, macrófagos, eosinófilos, plasmócitos e miofibroblastos, originando o granuloma maduro. A estrutura fibrosa do granuloma maduro é lamelar (zonas central, periférica e medial). Posteriormente, os ovos começam a se degenerar, havendo maior concentração de fibras de colágeno e fibrócitos ao redor do granuloma, levando, ao final, à calcificação dos ovos e sua destruição (Figura 12) (LOVERDE, 2019; NEWMAN, 2019; MCMANUS, 2018; OLIVEIRA, 2016; SOUZA, et al., 2011).

Na fase crônica, os granulomas possuem menor quantidade de células inflamatórias, ausência de necrose ao redor dos ovos e aumento da deposição de colágeno (Figura 11). Sendo assim, os indivíduos que evoluem para a fase crônica da doença, geralmente apresentam modulação satisfatória do granuloma. Os pacientes nesta fase da doença podem apresentar as formas hepatointestinal, hepática, hepatoesplênica compensada e descompensada. Podendo também apresentar a forma vasculopulmonar, hipertensão pulmonar, glomerulopatia, neuroesquistossomose, além de formas ectópicas (GOMES et al., 2017; BRASIL, 2014).

3.1.5 Diagnóstico

A Organização Mundial de Saúde (OMS) recomenda a visualização de ovos viáveis de *S. mansoni* nas fezes de indivíduos infectados como padrão-ouro. Além deste método, a técnica de Kato-Katz (Figura 13) é muito utilizada em inquéritos epidemiológicos devido à simplicidade do método. Com esta técnica é possível detectar e quantificar os ovos de uma amostra. Para a realização do Kato-Katz, é necessário que a infecção esteja ocorrendo a pelo menos 2 meses, tempo esse que representa o desenvolvimento do *S. mansoni* a fase evolutiva de vermes adultos, com consequente oviposição. Os indivíduos podem apresentar 3 perfis: baixa carga parasitária (até 99 ovos/g de fezes), infecção moderada (100 a 500 ovos/g de fezes) e infecção intensa (mais de 500 ovos/g de fezes). Este método possui deficiências em relação à eficiência e sensibilidade, principalmente em áreas com indivíduos que possuem carga parasitária baixa (NELWAN, 2019; LOYO, 2018).

Figura 13 – Método de Kato-Katz.



Fonte: <https://slideplayer.com.br/slide/5849404/>.

A detecção de antígenos e anticorpos dos ovos e dos vermes adultos, no plasma ou soro do paciente, através do método ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay), imunofluorescência e teste intradérmico também podem ser utilizados. Porém, métodos imunológicos como os citados não possuem especificidade e sensibilidade para confirmar o diagnóstico de esquistossomose. Além de não conseguirem diferenciar uma infecção passada de uma infecção recente, gerando resultados positivos, mesmo depois da terapia medicamentosa. Também podem ocorrer reações cruzadas, pois não conseguem diferir infecções geradas por outros vermes. Técnicas moleculares, como a PCR (Polymerase Chain Reaction), também vêm sendo empregadas como complemento ao diagnóstico. Técnicas que envolvem metabolômica, transcriptômica e proteômica vêm sendo

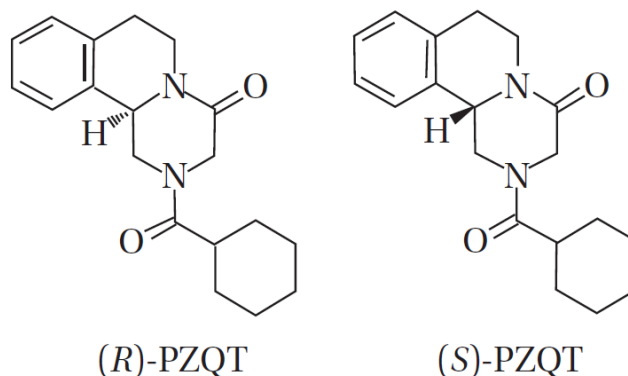
estudadas e otimizadas para auxiliar no diagnóstico da esquistossomose (NELWAN, 2019; LOYO, 2018; UTZINGER et al., 2015).

3.2 Praziquantel (PZQ)

O PZQ (2-ciclohexilcarbonil-1,2,3,6,7,11b-hexahidropirazino (2,1-a) isoquinolin-4-ona) é um derivado tetrahidrogenado sintético da isoquinolina-pirazina, sendo uma mistura racêmica de dois enantiômeros, R-PZQ (ativo) e S-PZQ (inativo) (Figura 14). R-PZQ é uma agente vermífida de baixa toxicidade, enquanto S-PZQ possui baixa atividade vermífida, e induz toxicidade. É o único fármaco utilizado para o controle e tratamento da esquistossomose, administrado por via oral, sob a forma de comprimidos de 600 mg, em dose única de 60 mg/kg de peso para crianças e 50 mg/kg de peso para adultos, e disponibilizado gratuitamente pelo Ministério da Saúde. Possui ação contra os vermes adultos de todas as espécies de *Schistosoma sp.*, com importância na medicina humana, porém nas doses recomendadas, PZQ apresenta baixa ou ineficaz cura parasitária nas fases mais jovens do parasito. É um fármaco de baixa solubilidade em água e alta permeabilidade no trato gastrointestinal (NELWAN, 2019; BRASIL, 2018; HONG, 2018; GOMES et al., 2017; VALE et al., 2017; SILVA et al., 2017).

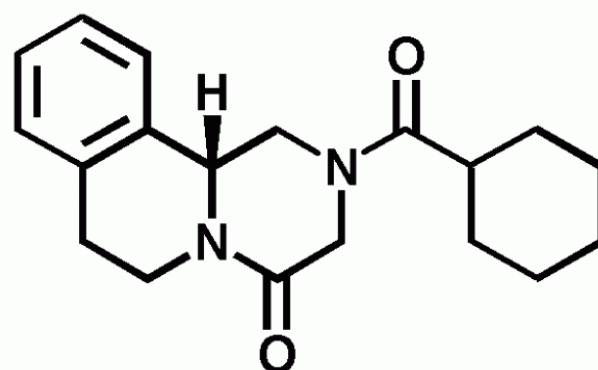
PZQ (Figura 15) foi produzido e selecionado, dentre mais de 400 análogos testados, em meados da década de 70, pelas empresas Merck e Bayer, como fármaco a ser utilizado para o tratamento da esquistossomose, devido à sua baixa toxicidade, alta eficácia e tolerabilidade. Em primeiro plano, foi utilizado para o tratamento veterinário da esquistossomose. Nos anos 80, passou a ser também utilizado no tratamento humano de infecções por cestódeos. Nesse mesmo período, novos estudos aumentaram a eficácia do fármaco, diminuindo o custo do tratamento (HONG, 2018; SILVA et al., 2017).

Figura 14 – Enantiômeros que compõem o praziquantel.



Fonte: HONG, 2018.

Figura 15 – Estrutura química do praziquantel.



Fonte: <http://www.usp.br/aunantigo/exibir?id=5111&ed=902&f=6>.

Além da ação contra helmintos do gênero *Schistosoma*, PZQ também demonstra eficácia contra vermes adultos e larvas de *Taenia solium*, *T. saginata*, *Hymenolepis nana*, *Hymenolepis diminuta* e *Diphyllobothrium latum*, mas não é ativo contra nematódeos (HONG, 2018; SILVA et al., 2017).

Em vermes adultos de *Schistosoma* sp., o PZQ interfere na permeabilidade da membrana, gerando vacuolização no tegumento, acarretando a paralisação do helminto e consequente exposição ao sistema imune do hospedeiro. Poucos minutos após a administração desse fármaco, observa-se contração muscular nos parasitas devido ao influxo de Ca^{++} , levando a perda da sua capacidade de fixação através da ventosa oral ou acetábulo. Assim sendo, eles são embolizados para o fígado, onde reações inflamatórias são desencadeadas com a finalidade de eliminar os parasitas. Outro efeito farmacológico observado é a formação de bolhas no tegumento de vermes adultos. O mecanismo de ação do PZQ ainda não está

totalmente elucidado, sendo a mudança de função nos canais de Ca^{++} a hipótese mais aceita. (HONG, 2018; SILVA et al., 2017).

A utilização exclusiva do PZQ para o tratamento da esquistossomose há 40 anos, incluindo tratamentos semestrais e programas de controle em larga escala com a utilização extensiva do PZQ em diversos países africanos, além de não prevenir contra a reinfecção e de não atuar nas fases mais jovens dos parasitas (nas doses recomendadas), levou ao aparecimento de cepas resistentes/tolerantes ao fármaco. Segundo Almeida e colaboradores (2015), “a resistência ao PZQ é definida como a perda de suscetibilidade geneticamente transmitida em populações de vermes que eram anteriormente susceptíveis ao PZQ”. Sendo assim, há o surgimento de vermes com genótipos que os tornam resistentes ao fármaco, levando, após várias gerações, a um aumento no número de vermes resistentes dentro de uma população (VALE, et al., 2017; ALMEIDA, et al., 2015). Vermes resistentes podem transmitir genes resistentes para a próxima geração, através da reprodução (ALLAM et al., 2013).

Doenhoff et al. (1994), obtiveram uma cepa de *S. mansoni* resistente ao PZQ pela administração de doses sub-letais do PZQ, sendo necessárias apenas 2 gerações após o emprego do fármaco. Ademais, a administração do PZQ em larga escala em alguns países, como Egito e Senegal, acarretou em baixas taxas de cura em 10-15 anos após o tratamento (ISMAIL et al., 1996). Em adição, áreas que recebem vários tratamentos anuais, exibem menores taxas de redução de ovos e de cura (CRELLEN, et al., 2016).

Além dos problemas com a resistência de cepas, o tratamento com PZQ pode causar hemorragia no tecido pulmonar, dor abdominal, gosto metálico na boca, cansaço, tonturas, dor de cabeça e diarreia (BRASIL, 2018; FABRI et al., 2014).

Ainda não existe vacina para o tratamento da esquistossomose. Estima-se que a vacina poderia proteger cerca 600 a 700 milhões de pessoas. Algumas formulações estudando cisteína-peptidase, captesina B1, receptor de insulina 1 (rSjLD1), acetilcolinesterase (SjAChE) e alguns antígenos como o SM-14, vêm sendo estudadas (NELWAN, 2019).

A produção de medicamentos é um processo oneroso e demorado. Estima-se que para lançar um novo medicamento sejam necessários bilhões de dólares.

Acrescenta-se a isso, o fato de que o investimento de novos fármacos para o tratamento de doenças negligenciadas carece de incentivos (LAGO et al., 2019).

Para evitar estas problemáticas, novos fármacos vêm sendo estudados, visando descrever seus potenciais esquistossomicidas e moduladores da resposta inflamatória, muitos desses, de origem vegetal. De acordo com Newman e Cragg (2016), entre 1981 e 2014, aproximadamente 50% dos novos compostos lançados no mercado farmacêutico tiveram origem, direta ou indiretamente, de derivados vegetais. Além disso, cerca de 80% das pessoas do mundo dependem de medicamentos a base de plantas para alguns de seus cuidados primários em saúde (ZHANG et al., 2015). Atualmente, vem sendo sugerido uso combinado do praziquantel com drogas antimaláricas, como o artesunato, que matam vermes imaturos, para um processo de cura mais abrangente (KABUYAYA et al., 2018).

3.3 Gênero *Plumbago*

A família Plumbaginaceae, pertencente às angiospermas, compreende ervas perenes, arbustos e lianas, possuindo diversas inflorescências do tipo racemo ou espiga. Suas flores são pentâmeras, bissexuadas e de simetria radial (actinomórficas). Seus frutos são secos e indeiscentes, do tipo aquênio, raramente apresentam frutos do tipo cápsula. É uma família monofilética, compreendendo de 27 a 30 gêneros e 650 a 1000 espécies, de distribuição quase cosmopolita. Compreende 2 sub-famílias: Plumbaginoideae e Staticoidae. No Brasil está representada por 2 gêneros: *Plumbago* e *Limonium*, podendo ser encontrados em todas as regiões do país (Figura 16). *Limonium brasiliense* e *Plumbago scandens* são espécies supostamente nativas. *Plumbago scandens* vem sendo tratada como sinônimo de *Plumbago zeylanica* (MARREIRA, 2018).

O gênero *Plumbago* envolve embriófitas que formam arbustos, repletas de inflorescências de flores bissexuadas e com frutos secos deiscentes do tipo cápsula (deiscência valvar) (Figura 17) (FUNEZ, 2019). *Plumbago capensis*, *Plumbago zeylanica* e *Plumbago rosea* são as principais espécies do gênero, sendo principalmente diferidas pela coloração de suas flores que é azul, branco e rosa, respectivamente (Figura 18) (TRIPATHI et al., 2019).

As plantas produzem diversos tipos de substâncias, como os metabólitos secundários, que estão envolvidos em processos de defesa contra herbivoria,

fitopatógenos e estresses ambientais, por exemplo. Muitos desses metabólitos secundários possuem significantes atividades biológicas, os tornando alvo de estudos nas mais diferentes áreas das ciências biológicas e farmacêuticas (PADHYE et al., 2010).

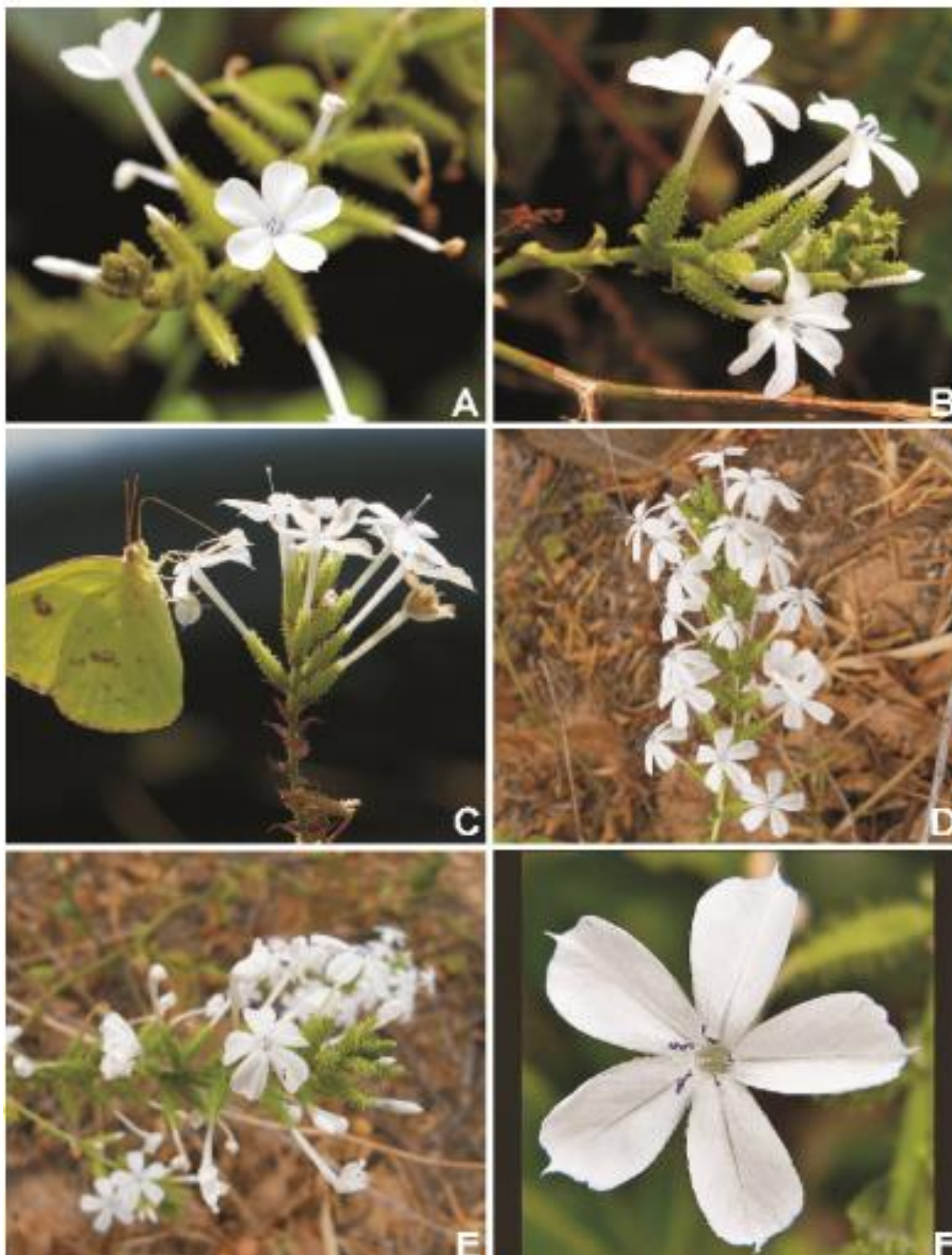
Plumbago auriculata, popularmente conhecida como bela-emília, é muito utilizada para ornamentação, principalmente de jardins (TURCHETTI, 2016). O potencial farmacêutico dessa espécie foi testado contra diversas enfermidades, como a leishmaniose (SILVA, 2016), assim como sua atividade antimicrobiana (SINGH et al., 2018). Possui propriedades analgésicas e auxilia no trato gastrointestinal (LUCENA et al., 2018).

Figura 16 – Distribuição do gênero *Plumbago* no Brasil (as diferentes cores apenas representam as regiões onde as plantas são encontradas).



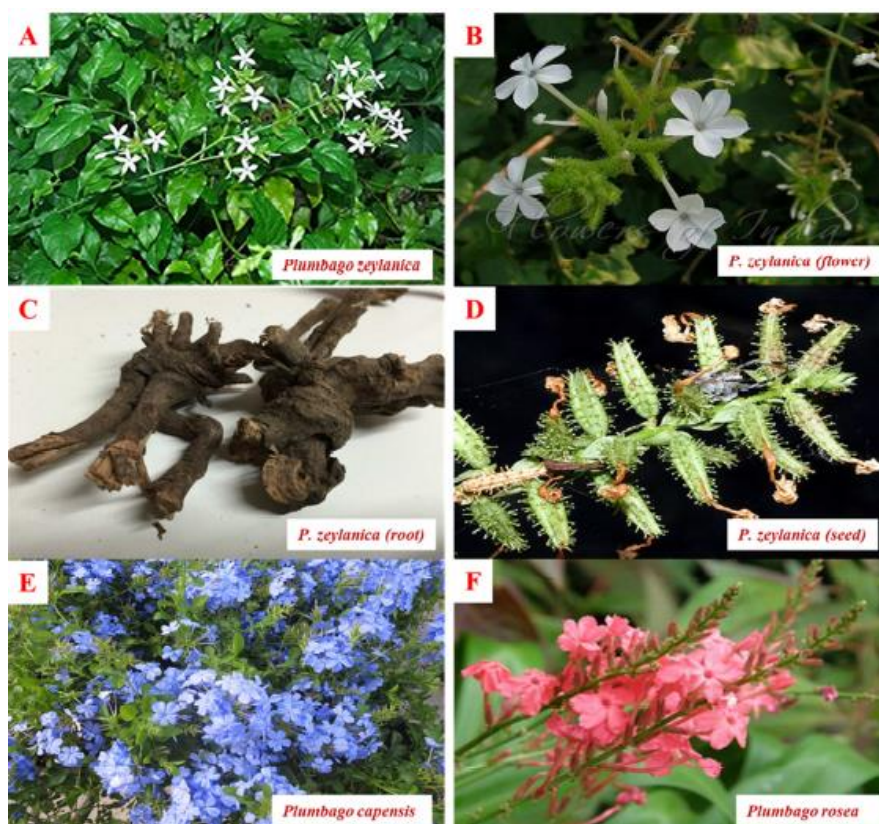
Fonte: FUNEZ, 2019.

Figura 17 – Inflorescência (A-E) e flor (F) de *Plumbago zeylanica*.



Fonte: MARREIRA et al., 2018.

Figura 18 – Caracterização de *P. zeylanica* e diferenciação das principais espécies do gênero *Plumbago*.



Fonte: TRIPATHI et al., 2019.

Outras espécies do gênero *Plumbago*, possuem diversas propriedades farmacológicas. *Plumbago zeylanica* é muito utilizada na medicina popular indiana como base do Chitrak (Figura 19) (que também é o nome popular da planta, que em sânscrito significa “manchado”), que basicamente é um extrato das raízes da planta. Suas raízes são muito utilizadas nos sistemas “Ayurveda”, supostamente o mais antigo sistema de cura existente, com bases no conhecimento védico da Índia antiga, “Siddha” e “Unani”, para o tratamento de diarreias, hanseníase e reumatismo, por exemplo (NAYAK et al., 2015). Diversos países utilizam, de modo tradicional, espécies deste gênero no âmbito medicinal, como China e Filipinas, que utilizam *P. zeylanica*; México com a *P. pulchella*; *P. rosea* na Guiana; e *P. scandens* no Brasil (PADHYE et al., 2010).

Figura 19 – Produto ayurvédico: Chitrak.

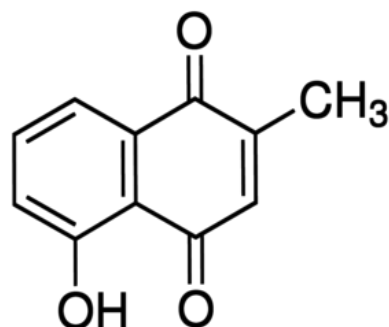


Fonte: <https://www.herbalhills.in/ayurvedic/products/ayurvedic-herbal-powders/chitrak-root-powder/>

3.4 Plumbagina

Plumbagina (5-hidroxi-2-metil-1,4-naftoquinona) (Figura 20) é uma naftoquinona extraída das raízes de embriófitas do gênero *Plumbago*, mais comumente na espécie *Plumbago zeylanica*. Esta classe de compostos constitui uma defesa natural das plantas contra parasitas (KAPUR et al., 2017). As naftoquinonas podem ser divididas em 1,2- e 1,4-naftoquinonas, podendo ainda serem classificadas de acordo com a presença de anel heterocíclico oxigenado (prenilnaftoquinonas, furanonaftoquinonas, difuronaftoquinonas e piranonaftoquinonas) (SILVA et al., 2012). Sua fórmula molecular é $C_{11}H_8O_3$ e 188.17 g/mol seu peso molecular, sendo ela uma análoga da vitamina K3 (LIU et al., 2017; PANICHAYUPAKARANT et al., 2016). Plumbagina foi encontrada em outras espécies, como em *Juglans regia* (nogueira comum ou noqueira inglesa), *Juglans cinerea* (nogueira branca) e *Juglans nigra* (nogueira negra), ambas da família Juglandaceae. Também foi encontrado em outras espécies vegetais das famílias Plumbaginaceae, Dioncophyllaceae, Anastrocladaceae, Droseraceae e Ebenaceae.

Figura 20 – Estrutura molecular da Plumbagina.



Fonte:

<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/p7262?lang=en®ion=US>.

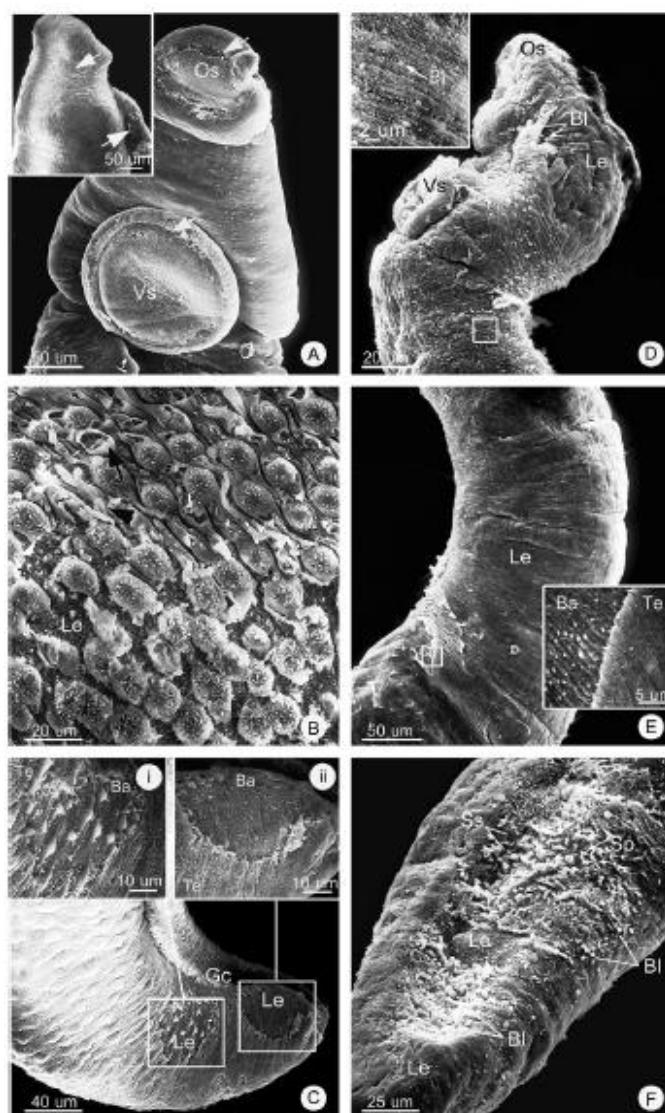
Plumbagina tem sido amplamente explorada em inúmeras atividades farmacológicas e biológicas. Em alta quantidade (doses acima de 30 $\mu\text{mol/L}$), a plumbagina induz a parada do ciclo celular na fase G1 e apoptose em células cancerígenas, além de elevar a expressão da proteína p53. Em doses mais baixas (menores que 5 $\mu\text{mol/L}$), não há indução da morte celular, notando-se atividade anti-inflamatória em linfócitos T e macrófagos (KAPUR et al., 2017; ZHANG et al., 2016). Além disto, a plumbagina apresenta atividades antiangiogênica, antioxidante, antifúngica, antibacteriana, antiaterosclerótica, anti-alérgica e hepatoprotetiva, é um inibidor da DNA topoisomerase II humana e reprime a atividade da telomerase (PEREYRA et al., 2019; LIU et al., 2017; WANG et al., 2016; NAYAK et al., 2015).

Ademais, modula favoravelmente a lesão hepática em fibrose hepática por CCl_4 e fibrose hepática crônica induzida por tioacetamida (WANG et al., 2016; CHEN et al., 2015).

Com relação a atividade antiparasitária da plumbagina, estudos destacam sua ação contra *Leishmania sp.* (AWASTHI et al., 2016), *Plasmodium sp.* (GUPTA et al., 2018), *Trypanosoma cruzi* (PINTO et al., 2009), nematódeos como *Caenorhabditis elegans* (ATJANASUPPAT et al., 2009) e contra platelmintos como *Fasciola gigantica* (LORSUWANNARAT et al., 2014), *Paramphistomum cervi* e *Paramphistomum epiclitum* (SAOWAKON et al., 2013; ATJANASUPPAT et al., 2009) e *Schistosoma mansoni* (LORSUWANNARAT et al., 2013; ZHANG e COUTLAS, 2013). Nos estudos desenvolvidos com *S. mansoni*, Lorsuwannarat e colaboradores (2013) avaliaram o efeito esquistossomicida da plumbagina *in vitro*. Observando alterações como inchaço dos tubérculos, formação de sulcos, bolhas e rupturas no

tegumento e erosão nas bordas das ventosas oral e ventral (Figura 21). Demonstraram, ainda, que a plumbagina teve maior efeito (menores taxas de sobrevivência e motilidade) em vermes adultos machos, na dose de 100 µg/mL. Zhang e Coutlas observaram que a plumbagina ocasiona, também, contrações musculares em todo o corpo do verme adulto.

Figura 21 – Alterações no tegumento de vermes adultos machos (A-C) e fêmeas (D-F) de *S. mansoni* tratados com plumbagina. A – erosão nas bordas das ventosas oral e ventral; B – descamação e inchaço dos tubérculos; C – lesões no canal ginecóforo; D – lesões e bolhas na região dorso-lateral da extremidade anterior; E – áreas de lesão e descamação do tegumento; F – lesões, descamações e bolhas no tegumento.



Fonte: LORSUWANNARAT, et al., 2013.

Acredita-se que as atividades biológicas da plumbagina se devem a produção de espécies reativas de oxigênio, como H_2O_2 e O_2^- . A hidroxila da molécula de plumbagina pode torná-la citotóxica (tanto para células cancerígenas, quanto para células normais, sendo mais tóxica para células cancerígenas), devido ao aumento de suas propriedades eletrofílicas, aumentando, assim, sua capacidade de aceitar elétrons e de originar espécies reativas de oxigênio. Sendo assim, a plumbagina é descrita como uma forte indutora de espécies reativas de oxigênio e agente depletor da glutathiona celular. A exposição à plumbagina e consequente aumento nos níveis intracelulares de radicais de oxigênio, leva à quebra de DNA de fita dupla, contribuindo, possivelmente, para a morte celular. Ademais, este aumento em células cancerígenas interfere no transporte de elétrons mitocondriais, devido à proximidade estrutural entre as moléculas de plumbagina e ubiquinona, ocasionando diminuição no consumo de oxigênio e produção de radicais de oxigênio.

Hwang e colaboradores (2015) pesquisaram o mecanismo molecular e alvos intracelulares da plumbagina, associando com o seu efeito citotóxico em células HepG2 (células de carcinoma hepatocelular). Dentre os seus principais alvos estão as cinases ativadas pelo mitogênio (MAPK), glutathiona redutase e tioredoxina redutase, todas envolvidas na sinalização redox. O fármaco impede a tioredoxina redutase de reagir com seus alvos intracelulares e inibe a glutathiona redutase. (TRIPATHI et al., 2019; KAPUR et al., 2017; SUKKASEM et al., 2016).

Alguns efeitos colaterais decorrentes do tratamento com plumbagina são os rashes cutâneos, diarreia, aumento do nível sérico de fosfatases e leucocitose (SUKKASEM et al., 2016).

4 METODOLOGIA

4.1 Fármacos e reagentes

Plumbagina e praziquantel foram obtidos da Sigma Chemical, St. Louis, MO, USA. Todos os reagentes de grau analítico foram adquiridos da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA).

4.2 Considerações éticas, animais e formação dos grupos experimentais

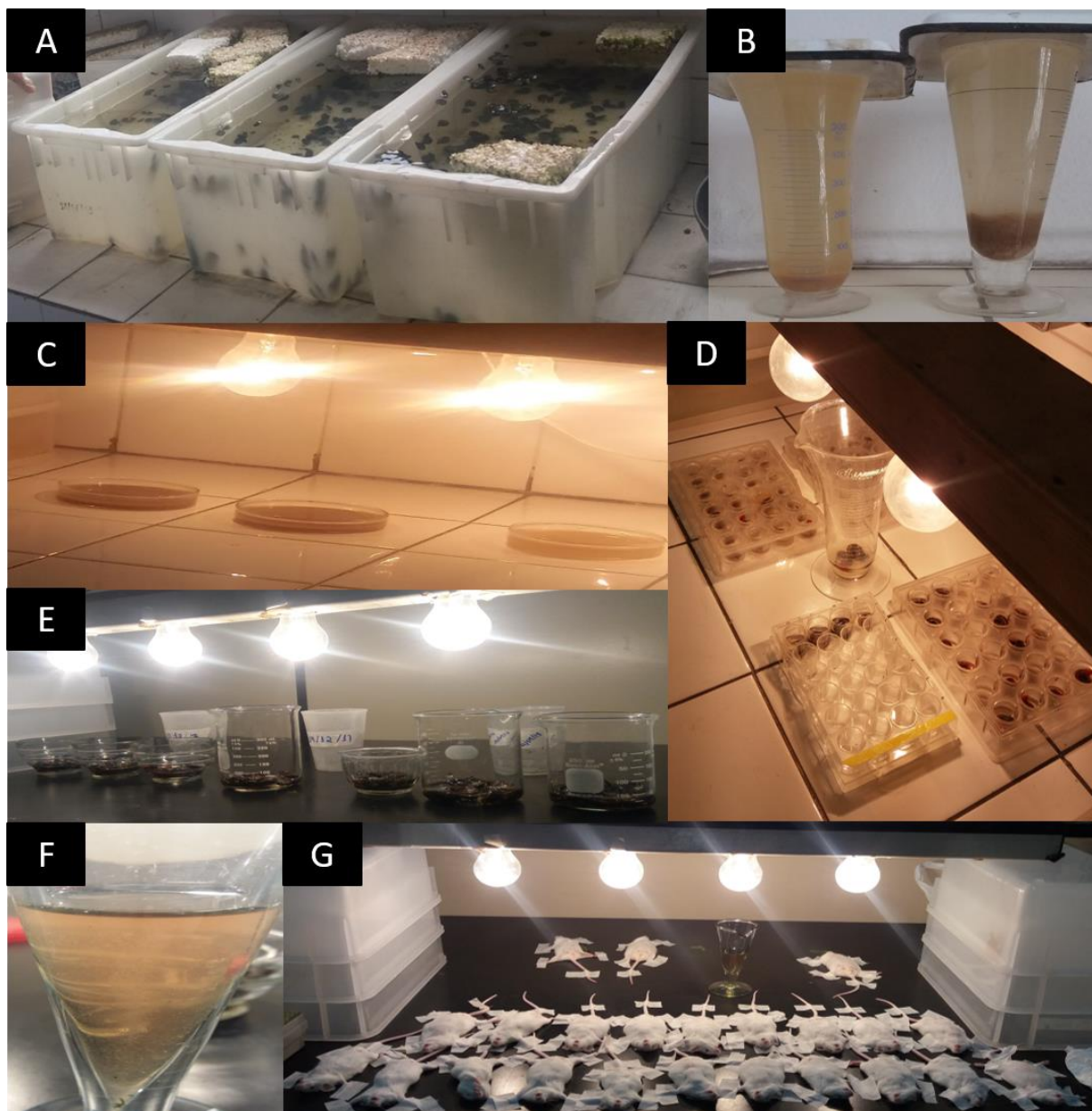
Todo procedimento experimental foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal do Centro de Biociências da UFPE (CEEAA/UFPE) (processo nº23076.011182/2018-01). Foram utilizados 90 camundongos (*Swiss Webster*), fêmeas, 28-30g, 30 dias de idade, fornecidos e mantidos no biotério do LIKA/UFPE de acordo com condições padronizadas de criação. O experimento foi realizado em duplicata. Os camundongos foram randomicamente distribuídos em cinco grupos experimentais (9 animais em cada grupo) em ambos os experimentos, de acordo com a exposição cercariana e esquema terapêutico adotado.

4.3 Infecção de caramujos da espécie *Biomphalaria glabrata* e camundongos *Swiss Webster* pela cepa Belo Horizonte (BH)

Fezes de camundongos infectados com *S. mansoni* foram coletadas e processadas de acordo com o método de Hoffman (sedimentação espontânea). Após lavagens sucessivas do sedimento, o precipitado foi disposto em placas de Petri e exposto a luz artificial para eclosão dos miracídios. Os miracídios foram capturados com o auxílio de uma lupa e postos em contato com os caramujos *B. glabrata* durante 2 horas. Para cada caramujo, cinco miracídios foram caçados. Após a infecção, os hospedeiros intermediários foram realocados em ambiente livre de iluminação no Departamento de Medicina Tropical – Disciplina de Parasitologia da UFPE (Figura 22).

Para infecção dos camundongos, os caramujos, após 30 dias de infecção, foram expostos à luz artificial para a liberação de cercárias, obtendo uma suspensão cercariana. Os camundongos foram infectados com 50 cercárias por via percutânea. Cada camundongo foi anestesiado com uma mistura envolvendo xilazina 2% e cloridrato de ketamina 11,6% na proporção de 2:1 (OLIVIER; STIREWALT, 1952) (Figura 22).

Figura 22 – Infecção de caramujos e camundongos. A – criadouro dos caramujos; B – Método de Hoffman; C – precipitado de fezes exposto à luminosidade e calor para liberação de miracídios; D – caramujos em contato com miracídios; E – caramujos expostos à luminosidade e calor para liberação de cercárias; F – suspensão cercariana; G – infecção dos camundongos por via percutânea.



Fonte: do autor.

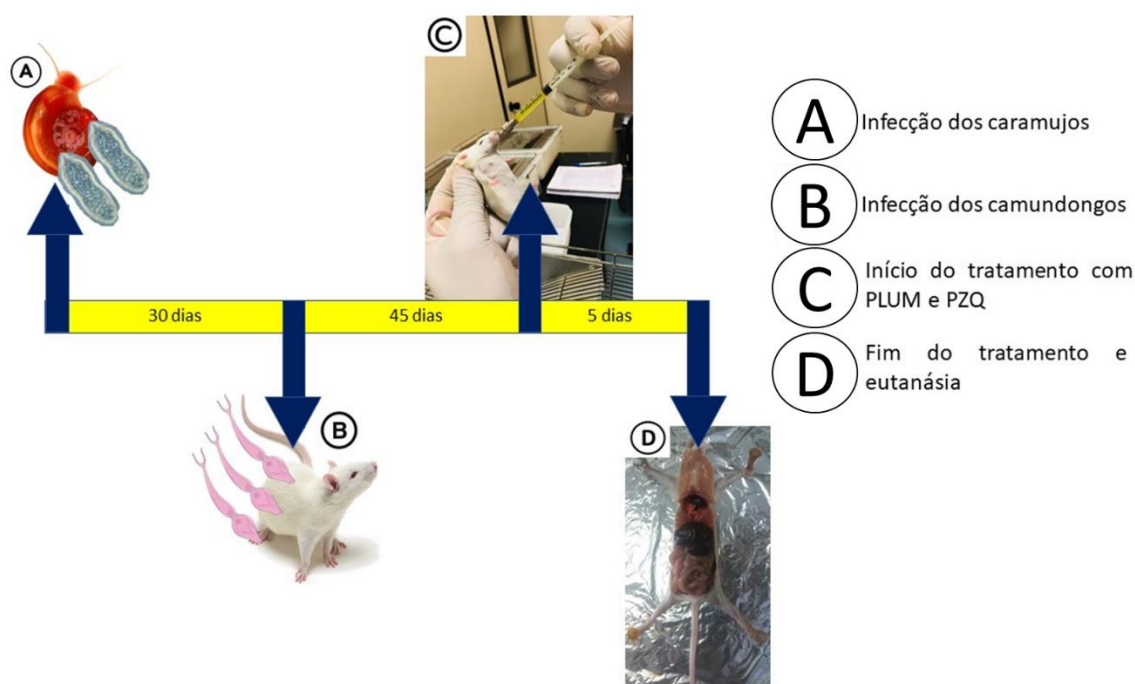
4.4 Protocolo terapêutico e grupos experimentais

Durante o delineamento experimental, dois critérios foram estabelecidos: (1) o início da intervenção terapêutica e (2) a dose de plumbagina. O início da intervenção

terapêutica foi estabelecido de acordo com o tempo de migração e desenvolvimento do *S. mansoni* durante ciclo biológico no hospedeiro definitivo (AIRES et al., 2014a). As doses de 8, 16 e 32 mg/Kg de plumbagina foram estabelecidas a partir dos estudos de farmacocinética, toxicidade e modulação do citocromo P450 empregando plumbagina (SUMSAKUL et al., 2016a). A dose de PZQ (50 mg/kg) foi estabelecida de acordo com os estudos de Aires e colaboradores (2014a). Plumbagina e PZQ foram diluídos em Cremophor a 2%.

A administração foi realizada por via oral através de gavagem, iniciando-se 45 dias após a infecção e tendo duração de 5 dias.

Figura 23 – Infecção de caramujos e camundongos e protocolo terapêutico.



Fonte: do autor.

4.5 Parâmetros parasitológicos

4.5.1 Contagem de ovos de *S. mansoni*

Fezes de camundongos infectados foram coletadas ao término do tratamento e processadas conforme o método de Kato-Katz (KATZ et al., 1972). Sendo este método uma técnica quantitativa de ovos de parasito por grama de fezes, foi utilizado para determinar o número total de ovos de *Schistosoma mansoni* por grama de fezes. Essa quantificação foi realizada um dia após o término do tratamento.

4.5.2 Recuperação dos vermes

No 50º dia de infecção todos os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical e perfundidos. Para tal, foram mantidos em decúbito dorsal, e as regiões torácica e abdominal foram higienizadas com álcool 70%. Efetuou-se uma incisão xifo-púbica com rebatimento lateral das paredes abdominais, expondo o sistema porta e os vasos mesentéricos. A partir da exposição e perfusão destes, os vermes foram recuperados, quantificados e classificados de acordo com o sexo, como descrito por Smithers e Terry (1965). Foram realizadas a contagem dos vermes, pesagem do intestino, fígado e baço, e coleta de porções do fígado e intestino para a realização do oograma e digestão.

A porcentagem de redução do número de vermes após o tratamento foi calculada da seguinte forma:

$$\% \text{ de redução} = C - V / C \times 100$$

Onde:

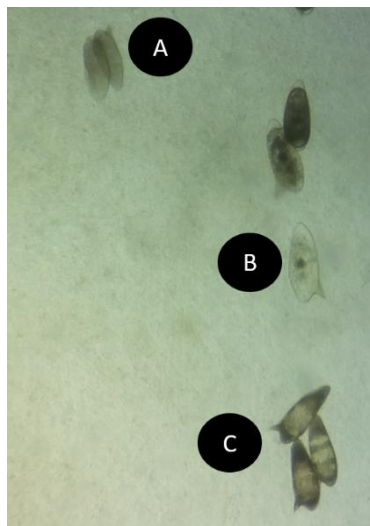
C = o número médio de parasitas obtidos a partir de animais infectados não tratados.

V = o número médio de parasitas obtidos a partir de animais tratados.

4.5.3 Oograma

Fragmentos da porção média do intestino delgado foram removidos e empregados para avaliar o desenvolvimento de maturação dos ovos de *S. mansoni* de acordo com os estudos de Pellegrino et al. (1962). Com esse método foi possível classificar os ovos de *S. mansoni* quanto ao seu estágio de maturação (imaturos, maduros e mortos) (Figura 23). Assim, foi avaliado o padrão de oviposição, demonstrando os efeitos ovicidas e/ou supressores provocados pela plumbagina ou PZQ sobre fêmeas de *S. mansoni*.

Figura 24 – Estádios de maturação dos ovos de *S. mansoni* avaliados no oograma (A – morto; B – maduro; C – imaturo).



Fonte: do autor.

4.5.4 Quantificação de ovos em tecido hepático e intestinal

Para estimar o número de ovos por grama de tecido hepático, um fragmento de 0,3 gramas de tecido foi removido da parte central do lóbulo direito de cada animal, enquanto que para a estimativa do número de ovos por grama de tecido intestinal foi utilizado todo o órgão de cada animal. Em seguida, cada amostra foi processada individualmente sendo submetidas à digestão por hidróxido de potássio a 5% (KOH) por 3h, como descrito por Cheever e colaboradores (1968). A contagem foi realizada em triplicata para cada amostra.

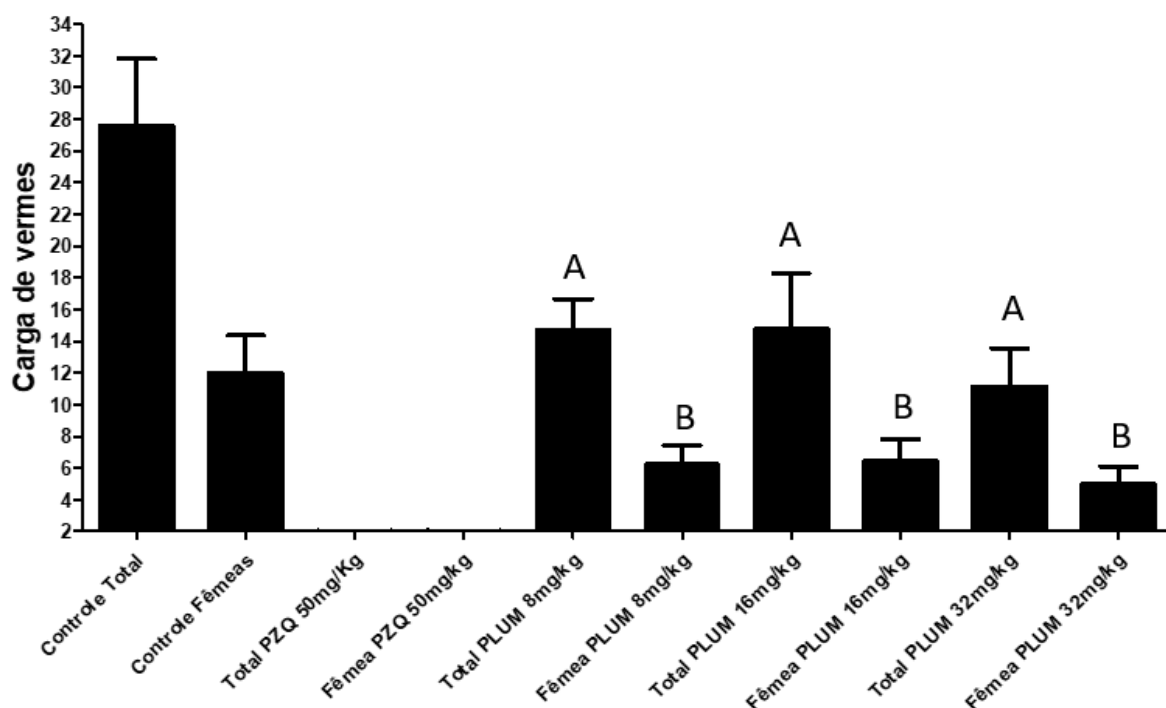
4.6 Análises estatísticas

Para avaliação dos resultados utilizamos o programa GraphPad Prism 5.0. As variáveis para as diferenças estatísticas foram determinadas por meio de análise de variância (ANOVA) em conjunto com o teste Tukey's. Em todos os casos, os resultados foram considerados significativos para $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

Em nosso estudo, a plumbagina foi capaz de reduzir o número total de vermes e de vermes fêmeas. As doses de 8, 16 e 32 mg/kg reduziram o número de vermes total em 46.85, 46.56 e 59.64%, respectivamente. Há diferença estatística quando são analisados o número total de vermes nas doses de 16 e 32 mg/kg ($p < 0,1$), destacando um considerável impacto no percentual de redução da carga parasitária. Em relação a carga de vermes fêmeas, plumbagina nas doses de 8, 16 e 32 mg/kg reduziu em 48.17, 46.525 e 58.33%, quando comparados ao grupo controle ($p < 0.001$), respectivamente. No grupo tratado com PZQ a redução foi de 100% e 98.91% para vermes fêmeas e vermes total (Gráfico 1).

Figura 25 - Carga de vermes (total e fêmeas) recuperados do sistema porta-hepático e vasos mesentéricos de camundongos infectados pelo *S. mansoni*. Praziquantel (PZQ), Plumbagina (PLUM). A - $p < 0.001$ quando comparado ao grupo controle total; B - $p < 0.001$ quando comparado ao grupo controle fêmea.



Fonte: do autor

Na avaliação pelo método do Kato-Katz, foi possível observar redução no número de ovos em todos os grupos tratados após tratamento, quando comparados ao grupo controle ($p < 0,001$). PLUM nas doses de 8, 16 e 32, reduziu o número de ovos em 58.29, 74.67 e 70.4%, respectivamente. Já o PZQ reduziu em 66.67% (Tabela 1). Com relação a carga de ovos depositada nos tecidos hepático e intestinal, um menor número de ovos foi encontrado nas amostras dos grupos tratados, quando comparados ao grupo controle. Não houve diferença estatisticamente significativa quando comparados os números de ovos encontrados no fígado do grupo controle com o grupo tratado com PZQ. PLUM levou à uma redução do número de ovos no tecido hepático de 55.36, 15.07 e 10.43%, nas doses de 8, 16 e 32 mg/kg, respectivamente. No tecido intestinal, houve redução de 57.49, 45.97% ($p < 0,001$) e 36.18% ($p < 0,1$), no número de ovos, respectivamente (Tabela 1). O PZQ reduziu em 40,29% o número de ovos no tecido hepático e 91,53% no tecido intestinal ($p < 0,001$).

No oograma, os fragmentos intestinais de camundongos tratados com PLUM apresentaram maior quantidade de ovos imaturos, quando comparados ao grupo controle. Nas doses de 8, 16 e 32 mg/kg, o número de ovos imaturos foi de 62.03, 65 e 71% ($p < 0,01$), respectivamente. O número de ovos maduros nas doses de 8, 16 e 32 mg/kg foi de 19.5 ($p < 0,001$), 27.2 e 19.75% ($p < 0,001$), respectivamente. Por fim, o número de ovos mortos nessas mesmas doses foi de 18.47 ($p < 0,1$), 7.8 e 9.25%, respectivamente. Nos animais tratados com PZQ, observou-se maior número de ovos mortos (81,5%), quando comparados ao grupo controle. Ovos maduros e imaturos contabilizaram 12.25 e 6.25%, respectivamente ($p < 0,001$) (Tabela 1).

Tabela 1 – Avaliação da PLUM e PZQ sobre a eliminação de ovos nas fezes, carga de ovos nos tecidos hepático e intestinal e no padrão de oviposição em camundongos infectados com *Schistosoma mansoni*.

Grupos experimentais	Ovos eliminados nas fezes		Número de ovos/g de tecido x 10 ³				% de ovos por estágio de desenvolvimento		
	Número por grama de fezes	Redução (%)	Hepático	Redução (%)	Intestinal	Redução (%)	Imaturos ^a	Maduros	Mortos
Controle	186±104,4	-	3,45±0,81	-	9,81±2,54	-	58±2,55	35,4±2,4	6,6±3,05
PZQ	66,67±50,45	64,16	2,06±0,46	40,29	0,83±0,35	91,53	6,25±2,75 ^a	12,25±2,06 ^a	81,5±2,64 ^a
PLUM (mg/Kg)									
8	58,29±38,49	68,66	1,54±0,61	55,36	4,17±2,46	57,49	62,03±1,24	19,50±4,38 ^b	18,47±3,14 ^c
16	74,67±43,31	59,85	2,93±1,23	15,07	5,30±2,69	45,97	65±6,67	27,2±7,66	7,80±3,03 ^d
32	70,4±26,39	62,15	3,09±0,54	10,43	6,26±2,04	36,18	71±4,89 ^e	19,75±2,75 ^b	9,25±2,21

Nota: ^asoma das % de ovos de I, II, III e IV estádios.

^a – p<0,001% quando comparado aos grupos controle de ovos imaturos, maduros e mortos;

^b – p<0,001% quando comparado ao grupo controle de ovos maduros;

^c – p<0,1% quando comparado ao grupo controle de ovos mortos;

^d – p<0,1% quando comparado ao número de ovos mortos do grupo tratado com 8 mg/kg de plumbagina;

^e – p<0,01% quando comparado ao grupo controle de ovos imaturos.

6 DISCUSSÃO

O PZQ é o único fármaco utilizado no tratamento de todos os tipos de esquistossomose. Porém seus efeitos colaterais, baixa eficácia contra vermes jovens e fases evolutivas mais imaturas e relatos de resistência, têm gerado discussões e buscas por novas alternativas de tratamento (ALLAM et al., 2013). Nos últimos anos, a análise da eficácia de produtos naturais frente a agentes etiológicos de doenças negligenciadas vem ganhando destaque. Dentre esses produtos, sobressaem as naftoquinonas, metabólitos secundários produzidos por fungos, plantas, algas e animais. As naftoquinonas apresentam atividades anticâncer, contra *Leishmania sp.*, *Plasmodium sp.*, fungos, bactérias, nematódeos, *Schistosoma mansoni*, entre outros (SILVA et al., 2012; LORSUWANNARAT et al., 2013; AIRES et al., 2014a; FERREIRA et al., 2014; FARDIN et al., 2015; AWASTHI et al., 2016; WELLINGTON et al., 2019; ROYO et al., 2019; CHA et al., 2019). Atualmente, a combinação de diferentes drogas para o tratamento da esquistossomose vem sendo recomendada. A artemisina combinada ao praziquantel desponta como uma possível alternativa. A artemisina também vem sendo testada associada à naftoquinonas, na busca de um tratamento mais efetivo (EL-BESHBISHI et al., 2015).

No esquema terapêutico adotado em nossos experimentos, a plumbagina demonstrou ação esquistossomicida, reduzindo a carga parasitária total e de vermes fêmeas e o número de ovos nas fezes e nos tecidos hepático e intestinal, além de afetar o padrão do oograma. A ação esquistossomicida da plumbagina demonstrada em nossos experimentos, corrobora com diversos estudos que testaram a ação de diversas outras naftoquinonas frente a vermes adultos de *S. mansoni* e outras fases evolutivas (LORSUWANNARAT et al., 2013; AIRES et al., 2014a; AIRES et al., 2014b; JOHANN et al., 2015; KAPADIA et al., 2017).

Lorsuwannarat e colaboradores (2013), testaram o efeito anti-helmíntico *in vitro* da plumbagina frente a vermes adultos de *Schistosoma mansoni*. A atividade antiesquistossomicida mostrou-se mais eficaz que a do praziquantel nas doses de 10 µg/mL e 100 µg/mL. Reduzindo o movimento dos vermes e o índice de sobrevivência nos intervalos de 1h, 6h e 24h após exposição ao fármaco. Até o momento, não existem estudos que demonstrem o efeito esquistossomicida da plumbagina em modelos *in vivo*, sendo o nosso trabalho pioneiro nessa avaliação. Outras naftoquinonas foram avaliadas como potenciais fármacos anti-*Schistosoma*

mansoni, através de modelos animais, ou seja, *in vivo*. Aires e colaboradores (2014a), demonstraram que a β -lapachona, naftoquinona extraída de raízes de embriófitas da família Bignoniaceae, possui atividade *in vivo* contra esquistossômulos de pele, esquistossômulos de pulmão, vermes jovens e vermes adultos. Na avaliação *in vitro*, β -lapachona altera a motilidade e viabilidade dos vermes adultos, em concentrações de 50 μ M e 100 μ M, gerando lesões no tegumento de vermes adultos machos (AIRES et al., 2014b).

Johann e colaboradores (2015), avaliaram o potencial esquistossomicida da 2-metil-1,4-naftoquinona (menadiona) e derivados, através da capacidade do composto de inibir a enzima *SmtGR* (tioredoxina-glutationa do *Schistosoma mansoni*), que desempenha um papel crucial no metabolismo redox de tióis. Esta enzima é dita bifuncional, pois em outros eucariotos sua função é desempenhada por duas enzimas: glutationa (GSH) e tioredoxina (Trx). Todos os compostos demonstraram ser eficientes inibidores da enzima, tendo alguns deles maior potencial inibitório, como os derivados da difluoromenadiona.

Kapadia e equipe (2017) avaliaram a atividade antiparasitária da menadiona *in vitro* em camundongos BALB/c. Observou-se que esta naftoquinona altera a viabilidade dos vermes adultos em todas as concentrações testadas. Já *in vivo*, a menadiona reduziu o número de vermes adultos e interferiu na formação dos ovos em mais de 50% nas doses testadas, através da análise da perfusão e da digestão hepática através do KOH, respectivamente. Efeito semelhante foi observado em nossos experimentos, onde a plumbagina reduziu significativamente o número de vermes em 46.85, 46.56 e 59.64%, nas doses de 8, 16 e 32 mg/kg, respectivamente. Além de também ter afetado a formação dos ovos, reduzindo em 58.29, 74.67 e 70.4%, nas doses de 8, 16 e 32 mg/kg, respectivamente, quando comparados ao grupo controle.

Acredita-se que os helmintos do gênero *Schistosoma*, sejam uns dos raros helmintos parasitas que conseguem produzir energia através de processos aeróbios, utilizando a ubiquinona (CoQ) como carreadora de elétrons, substituindo a rodoquinona (comum nos helmintos que produzem energia por processos anaeróbios). Portanto, sugere-se que a plumbagina compita com a CoQ na cadeia transportadora de elétrons, atuando como antagonista da CoQ, assim como outras naftoquinonas. Ademais, o potencial da plumbagina de aumentar os níveis de ROS e

de peróxido de hidrogênio leva à diminuição das reservas de glutathione, oxidando-a, expondo os vermes à ação dos radicais livres (LORSUWANNARAT et al., 2013).

Um importante alvo para a ação dos fármacos esquistossomicidas é o tegumento do verme adulto. Este tem papel indispensável em sua sobrevivência, atuando na obtenção de nutrientes, na proteção ao sistema imune do hospedeiro, excreção, percepção sensorial e osmorregulação. (HALTON, 2004; PEREIRA et al., 2011).

Lorsuwannarat e colaboradores observaram o efeito esquistossomicida da PLUM *in vitro*. Constataram que a PLUM ocasionou alterações no tegumento dos vermes adultos como inchaço dos tubérculos, formação de sulcos, bolhas e rupturas no tegumento e erosão nas bordas das ventosas oral e ventral. Houve ruptura dos tubérculos e dos sulcos, expondo a lâmina basal, observando-se a ausência de tegumento em grandes áreas da superfície do corpo do trematódeo (2013). Zhang e Coutlas (2013) observaram que essa lesão pode expor os antígenos do parasita ao sistema imunológico do hospedeiro. Constataram, ainda, que a PLUM gera contrações musculares em todo o corpo do verme adulto.

Em outro estudo, Lorsuwannarat e colaboradores (2014) compararam o efeito do tratamento com PLUM e TCZ (triclabendazol) em vermes jovens de *Fasciola gigantica*, também um platelminto trematódeo, agente etiológico da fasciolíase em ruminantes e em humanos (PHALEE et al., 2015). Observaram que ambos os fármacos geraram lesões no tegumento, porém essas alterações ocorriam precocemente nos grupos tratados com PLUM, no mesmo intervalo de tempo e concentrações utilizados nos grupos tratados com TCZ.

O efeito da PLUM em vermes adultos de *Paramphistomum cervi*, também um trematódeo, se mostrou semelhante aos observados em *S. mansoni* e *F. gigantica*, com importante ação no tegumento. Além disso, a depender da dosagem utilizada, PLUM pode alterar a motilidade dos vermes, reduzindo-a, podendo resultar na morte do helminto (SAOWAKON et al., 2013). Shalaby e colaboradores observaram que a PLUM danifica as papilas em *Paramphistomum microbothrium*, o que pode gerar perda de funções sensoriais (2010).

Lima e colaboradores (2002), testaram o potencial moluscicida e cercaricida do lapachol, de ocorrência natural (também uma naftoquinona), e do isolapachol, sintético. Esses compostos demonstraram alta eficiência na eliminação dos *B.*

glabrata adultos e de seus ovos, mesmo em pequenas concentrações. Também foi descrita significativa atividade cercaricida, eliminando aproximadamente 90% das cercárias na concentração de 2ppm (partes por milhão).

O oograma é utilizado para análise da oviposição dos vermes adultos. O PZQ possui ação ovicida, inviabilizando os ovos, através da retração do miracídio, geralmente em ovos maduros. Portanto, os camundongos tratados com PZQ, demonstraram grande quantidade de ovos mortos e pequena quantidade de ovos maduros e imaturos, concordando com os estudos de Aires e colaboradores (2014a). Nos animais tratados com PLUM, houve predominância de ovos imaturos, quando comparados ao grupo controle. Uma possível explicação seria a de que a PLUM acomete estruturalmente os vermes fêmeas, gerando danos nas glândulas vitelínicas, alterando sua aptidão reprodutiva, efeito semelhante provocado pela artemisina (ABDUL-GHANI et al., 2011). Com a diminuição da postura dos ovos, há um menor número de infiltrados inflamatórios granulomatosos, alterações imunológicas e fibrose hepática, atenuando os efeitos da infecção (AIRES et al., 2014a). A redução do número de ovos nas fezes nos grupos tratados com plumbagina, pode ser relacionada à diminuição da carga parasitária, corroborando com outros estudos que avaliaram a ação esquistossomicida de produtos de origem natural como o fitol e a epiisopiloturina (DE MORAES et al., 2014; GUIMARÃES et al., 2015). Além disso, a redução da oviposição é de caráter crucial para o uso terapêutico, visto que o ovo é responsável pela transmissão do parasita e manutenção de seu ciclo biológico.

A maior redução do número de ovos nos tecidos hepático e intestinal na dose de plumbagina de 8 mg/kg, quando comparada à redução obtida nas doses de 16 e 32 mg/kg, pode ser explicada com os estudos farmacocinéticos envolvendo plumbagina (TOKUNAGA et al., 2004; HSIEH et al., 2006; RAYABANDHA et al., 2010; SUMSAKUL et al., 2016a; SUMSAKUL et al., 2016b). Tais estudos demonstram que os perfis farmacocinéticos da plumbagina sugerem que uma baixa exposição sistêmica ao fármaco pode ser um fator farmacocinético limitante, levando a uma concentração inadequada do fármaco. E isto pode afetar o desenvolvimento da plumbagina como um medicamento de formulação oral. Em busca de melhoras na biodisponibilidade oral da plumbagina, diversos estudos foram realizados, incluindo a preparação de microesferas à base de quitosana e preparação de

formulação lipossômica (TOKUNAGA et al., 2004; HSIEH et al., 2006; RAYABANDHA et al., 2010; SUMSAKUL et al., 2016a; SUMSAKUL et al., 2016b). Além disso, Sumsakul et al. (2016a, 2016b), avaliou a distribuição do fármaco pelo organismo através da utilização do complexo ^{99m}Tc -plumbagina, que se acumulou extensivamente no fígado e nos pulmões, cinco minutos após a administração. Ademais, a biodisponibilidade oral da plumbagina demonstrou ser relativamente baixa (39%), relacionada às suas limitadas propriedades biofarmacêuticas como insolubilidade em água e alta lipofilicidade (SUMSAKUL et al., 2016a).

Provavelmente, a diferente resposta da PLUM sobre o sexo se deve ao tegumento mais espesso dos machos, possuindo maior superfície devido aos seus tegumentos elevadamente dobrados, gerando maior área de absorção de drogas. Já as fêmeas encontram-se albergadas no canal ginecóforo do macho, o que a assegura proteção contra ações farmacológicas e do sistema imune do hospedeiro. Lorsuwannarat et al. (2013) e Zhang e Coutlas (2012) juntamente com suas equipes, comprovaram, *in vitro*, que a PLUM causou maiores danos em vermes adultos machos de *S. mansoni*.

As naftoquinonas representam alvos de estudos para o desenvolvimento de novas terapias contra a esquistossomose. Experimentos demonstram que, esse grupo de compostos naturais, atuam contra fases maduras e imaturas do *S. mansoni*, além de atuarem contra os hospedeiros intermediários da enfermidade, os planorbídeos *B. glabrata* (AIRESa et al., 2014; AIRESb et al., 2014; RIBEIRO et al., 2009; CAMARA et al., 2008; LIMA et al., 2002; PINTO et al., 1977). Novos trabalhos devem ser realizados visando a elucidação do mecanismo de ação das naftoquinonas, além da descrição de seus potenciais protetivos em relação ao surgimento de granulomas e fibrose.

De acordo com a Organização Mundial de Saúde, um fármaco com potencial atividade esquistossomicida deve reduzir cerca de 80% da carga parasitária, quando administrado por via oral, durante 5 dias, na dose de 100 mg/kg. Sendo assim, a plumbagina nas doses de 8, 16 e 32 mg/kg, conseguiu reduzir em 46.85, 46.56 e 59.64% a carga parasitária. As doses empregadas são menores do que a recomendada, mas alcançaram elevado percentual de redução da carga parasitária.

Desta forma, nossos resultados representam um ponto de partida para realização de novas pesquisas envolvendo outras doses da PLUM, associação da PLUM com outras drogas, entre outros.

7 CONCLUSÃO

Nosso estudo demonstra que a plumbagina possui ação esquistossomicida através da redução da carga de vermes totais e vermes fêmeas, do número de ovos nos tecidos hepático e intestinal e nas fezes, além de modificar o padrão do oograma. Novos estudos devem ser realizados, como a combinação da plumbagina com outros fármacos, visando melhorar sua biodisponibilidade oral e ação terapêutica.

REFERÊNCIAS

- ABDUL-GHANI, R.; LOUTFY, N.; SHETA, M.; HASSAN, A. **Artemether shows promising female schistosomicidal and ovicidal effects on the Egyptian strain of *Schistosoma mansoni* after maturity of infection.** Parasitology Research (2011), 108: 1199-1205.
- AIRES, A.L.; XIMENES, E.C.P.A.; BARBOSA, V.X.; GOES, A.J.S.; SOUZA, V.M.O.; ALBUQUERQUE, M.C.P.A. **β -Lapachone: A naphthoquinone with promising antischistosomal properties in mice.** Phytomedicine (2014) 21, 261–267 (A)
- AIRES, A.L.; XIMENES, E.C.P.A.; SILVA, R.A.R.; BARBOSA, V.X.; GÓES, A.J.S.; PEIXOTO, C.A.; SOUZA, V.M.O.; ALBUQUERQUE, M.C.P.A. **Ultrastructural analysis of b-lapachone-induced surface membrane damage in male adult *Schistosoma mansoni* BH strain worms.** Experimental Parasitology (2014) 142, 83–90 (B).
- ALLAM, G.; EWEAS, A.F.; ABUELSAAD, A.S.A. ***In vivo* schistosomicidal activity of three novels 8-hydroxyquinoline derivatives against adult and immature worms of *Schistosoma mansoni*.** Parasitology Research (2013) 112, 3137–3149.
- ALMEIDA, A.P.; MENDES, T.; ARMADA, A.; BELO, S.; CARRILHO, E.; VIVEIROS, M.; AFONSO, A. **The Role of Efflux Pumps in *Schistosoma mansoni* Praziquantel Resistant Phenotype.** PLoS ONE 10(10): e0140147. 2015.
- ALMEIDA, M.R. **Esquistossomose Mansoní no município de Santa Inês/Ba: políticas públicas e fatores associados à prevalência endêmica.** 2018. 168 p. Tese (Doutorado em Planejamento Territorial e Desenvolvimento Social) – Universidade Católica do Salvador - UCSAL, Salvador, 2018.
- ATJANASUPPAT, K.; WONGKHAM, W.; MEEPOWPAN, P.; KITTA KOOP, P.; SOBHON, P.; BARTLETT, A.; WHITFIELD, P.J. ***In vitro* screening for anthelmintic and antitumor activity of ethnomedicinal plants from Thailand.** J. Ethnopharmacology, 2009, v. 123, n.3, p. 475-482.
- AWASTHI, B.P.; KATHURIA, M.; PANT, G.; KUMARI, N.; MITRA, K. **Plumbagin, a plant-derived naphthoquinone metabolite induces mitochondria mediated apoptosis-like cell death in *Leishmania donovani*: an ultrastructural and physiological study.** Apoptosis (2016) 21:941–953.
- BARBOSA, C.S.; SANTOS, R.S.; GOMES, E.S.; ARAUJO, K.; ALBUQUERQUE, J.; MELO, F.; SEVILHA, M.A.; BRASILEIRO, D.; BARRETO, M.I.; NETO, O.B.L.; BARBOSA, V.; CORREIA, W.; GUIMARAES, R.J.P.S. **Epidemiologia da Esquistossomose no Litoral de Pernambuco.** Revista de Patologia Tropical 2014, Vol. 43 (4): 436-445. out.-dez.

BARRETO, M.S.; GOMES, E.C.S.; BARBOSA, C.S. **Turismo de risco em áreas vulneráveis para a transmissão da esquistossomose mansônica no Brasil.** Caderno de Saúde Pública, Rio de Janeiro, 2016, 32(3):e00190815.

BRASIL, Ministério de Saúde. **Doenças Infecciosas e Parasitárias: guia de bolso.** 8 ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2010.

BRASIL, Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. 2014. **Vigilância da Esquistossomose mansoni: diretrizes técnicas** / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento das Doenças Transmissíveis. – 4. Ed. – Brasília: Ministério da Saúde. 144 p.

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

BRASIL, Ministério da Saúde. **Esquistossomose: causas, sintomas, tratamento, diagnóstico e prevenção.** Ministério da Saúde, 2019. Disponível em: <http://portalms.saude.gov.br/saude-de-a-z/esquistossomose>. Acesso em: 15/02/19.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. **Educação em saúde para o controle da esquistossomose** / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. – Brasília: Ministério da Saúde, 2018. 40 p.

CAMARA, C.A.; SILVA, T.M.S.; DA-SILVA, T.G.; MARTINS, R.M.; BARBOSA, T.P.; PINTO, A.C.; VARGAS, M.D. **Molluscicidal activity of 2-hydroxy-1,4 naphthoquinone and derivatives.** Anais da Academia Brasileira de Ciências (2008) 80(2): 329-334.

CARVALHO, O.S., COELHO, P.M.Z., LENZI, H.L. **Schistosoma mansoni e esquistossomose: uma visão multidisciplinar** [online]. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2008, pp. 43-84.

CAVALCANTI, M.G.S. **Caracterização citoquímica ultraestrutural da cercária de Schistosoma mansoni.** 2007. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2008.

CHA, D.J.; KIM, J.; KIM, D.S. **Nematicidal Activities of Three Naphthoquinones against the Pine Wood Nematode, Bursaphelenchus xylophilus.** Molecules 2019, 24, 3634.

CHEEVER, A.W. et al. **A quantitative pos-mortem study of schistosomiasis mansoni in man.** The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 1968, 17: 38-64.

CHEN, S.; CHEN, Y.; CHEN, B.; CAI, Y.; ZOU, Z.; WANG, J.; LIN, Z.; WANG, X.; FU, L.; HU, Y.; CHEN, Y.; CHEN, F. **Plumbagin Ameliorates CCl₄-Induced Hepatic Fibrosis in Rats via the Epidermal Growth Factor Receptor Signaling Pathway**. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. 2015.

COLLEY, D. G. et al. **Human schistosomiasis**. Lancet, London, 2014, v. 383, n. 9936, p.: 2253–2264.

CRELLEN, T.; WALKER, M.; LAMBERTON, P.H.; KABATEREINE, N.B.; TUKAHEBWA E.M.; COTTON, J.A., et al. **Reduced efficacy of praziquantel against *Schistosoma mansoni* is associated with multiple rounds of mass drug administration**. Clinical Infectious Diseases. 2016; 63(9):1151–9.

DA SILVA, G.B., DUARTE, D.B., BARROS, E.J.G., DAHER, E.D.F. **Schistosomiasis-associated kidney disease: A review**. Asian Pacific Journal of Tropical Diseases 2013, 3, 79-84.

DAWAKI S, AL-MEKHLAFI HM, ITHOI I, IBRAHIM J, ABDULSALAM AM, AHMED A, et al. **Prevalence and risk factors of schistosomiasis among Hausa Communities in Kano State, Nigeria**. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo. 2016, 58:1-9.

DE MORAES, J.; DE OLIVEIRA, R.N.; COSTA, J.P.; JUNIOR, A.L.G.; DE SOUSA, D.P. et al. **Phytol, a Diterpene Alcohol from Chlorophyll, as a Drug against Neglected Tropical Disease Schistosomiasis Mansoni**. PLoS Neglected Tropical Diseases. 2014; 8: e2617.

DUBEUX, L.S.; JESUS, R.P.F.S.; SAMICO, I.; MENDES, M.F.M.; WANDERLEY, F.S.O.; TOMASI, E.; NUNES, B.P.; FACCHINI, L.A. **Avaliação do Programa de Enfrentamento às Doenças Negligenciadas para o controle da esquistossomose mansônica em três municípios hiperendêmicos, Pernambuco, Brasil, 2014**. Epidemiologia e Serviços de Saúde, Brasília, 2019, 28(2):e2018085.

EL-BESHBISHI, S.N.; EL BARDICY, S.; TADROS, M.; AYOUB, M.; TAMAN, A. **Spotlight on the *in vitro* effect of artemisinin–naphthoquine phosphate on *Schistosoma mansoni* and its snail host *Biomphalaria alexandrina***. Acta Tropica (2015) 141, 37–45.

ELBAZ, T., ESMAT, G. **Hepatic and intestinal schistosomiasis: Review**. Journal of Advanced Research. 2013, 4, 445-452.

FABRI, R.L.; ARAGÃO, D.M.O.; FLORÊNCIO, J.R.; PINTO, N.C.C.; MATTOS, A.C.A.; COELHO, P.M.Z.; CASTAÑON, M.C.M.N.; VASCONCELOS, E.G.; PINTO, P.F.; SCIO, E. **Chromatographic Fingerprint Analysis and Effects of the Medicinal Plant Species *Mitracarpus frigidus* on Adult *Schistosoma mansoni* Worms**. BioMed Research International. 2014.

FALLON, P. G.; DOENHOFF, M. J. **Drug-resistant schistosomiasis: resistance to praziquantel and oxamniquine induced in *Schistosoma mansoni* in mice is drug specific.** American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 1994, 51, 83–88.

FARDIN, K.M.; YOUNG, M.C.M. **Antifungal potential of *Avicennia schaueriana* Stapf & Leech. (Acanthaceae) against *Cladosporium* and *Colletotrichum* species.** Letters in Applied Microbiology 2015, 61, 50-57.

FERREIRA, M.P.S.B.C.; CARDOSO, M.F.C.; SILVA, F.C.; FERREIRA, V.F.; LIMA, E.S.; SOUZA, J.V.B. **Antifungal activity of synthetic naphthoquinones against dermatophytes and opportunistic fungi: preliminary mechanism-of-action tests.** Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials 2014, 13:26.

FUNEZ, L.A. **Plumbaginaceae in Flora do Brasil 2020 em construção.** Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB12939>>. Acesso em: 14/06/2019.

GENTILE, R.; NETO, S.F.C.; D'ANDREA, P.S. **Uma Revisão Sobre a Participação do Rato D'água *Nectomys Squamipes* na Dinâmica de Transmissão da Esquistossomose Mansônica: Um Estudo Multidisciplinar de Longo Prazo em uma Área Endêmica.** Oecologia Australis, 2010, 14(3): 711-725.

GOMES E.C.S., LEAL-NETO O.B., ALBUQUERQUE J., SILVA H.P., BARBOSA C.S. **Schistosomiasis transmission and environmental change: a spatio-temporal analysis in Porto de Galinhas, Pernambuco – Brazil.** International Journal of Health Geographics. 2012; 11: 51.

GOMES ECS, LEAL-NETO OB, OLIVEIRA FJ, CAMPOS JV, SOUZA-SANTOS R, BARBOSA CS. **Risk analysis for occurrences of schistosomiasis in the coastal area of Porto de Galinhas, Pernambuco, Brazil.** BMC Infectious Diseases. 2014; 14: 101.

GOMES, E.C.S.; MESQUITA, M.C.S.; REHN, V.N.C.; NASCIMENTO, W.R.C.; LOYO, R.; BARBOSA, C.S. **Transmissão urbana da esquistossomose: novo cenário epidemiológico na Zona da Mata de Pernambuco.** Revista Brasileira de Epidemiologia, 2016; 19(4): 822-834.

GOMES, E.C.S.; DOMINGUES, A.L.C.; BARBOSA, C.S. **Esquistossomose: manejo clínico e epidemiológico na atenção básica.** 2017. Ministério da Saúde. Sistema Universidade Aberta do SUS. Fundação Oswaldo Cruz & Instituto Aggeu Magalhães – Fiocruz-PE.

GUIMARÃES, M.A.; OLIVEIRA, R.N.; VÉRAS, L.M.C.; LIMA, D.F.; CAMPELO, Y.D.M.; CAMPOS, S.A.; KUCKELHAUS, S.A.S.; PINTO, P.S.L.; EATON, P.; MAFUD, A.C.; MASCARENHAS, Y.P.; ALLEGRETTI, S.M.; MORAES, J.; LOLIC, A.; VERBIC, T.; LEITE, J.R.S.A. **Anthelmintic Activity *In Vivo* of Epiisopiloturine against Juvenile and Adult Worms of *Schistosoma mansoni*.** PLOS Neglected Tropical Diseases. 2015, 9(3): e0003656.

GUPTA, A.C.; MOHANTY, S.; SAXENA, A.; MAURYA, A.K.; BAWANKULE, D.U. **Plumbagin, a vitamin K3 analogue ameliorate malaria pathogenesis by inhibiting oxidative stress and infammation.** *Inflammopharmacology*, 2018, 26(4), 983-991.

HALTON, D. W. **Microscopy and the helminth parasite.** *Micron*, 2004, v. 35, n. 5, p. 361- 390.

HONG, S.T. **Albendazole and Praziquantel: Review and Safety Monitoring in Korea.** *Infection & Chemotherapy* 2018; 50(1):1-10.

HSIEH, Y.J.; LIN, L.C.; TSAI, T.H. **Measurement and pharmacokinetic study of plumbagin in a conscious freely moving rat using liquid chromatography/tandem mass spectrometry.** *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*. 2006; 844:1-5.

HWANG, G.H.; RYU, J.M.; JEON, Y.J.; CHOI, J.; HAN, H.J.; LEE, Y-M.; LEE, S.; BAE, J-S.; JUNG, J-W.; CHANG, W.; KIM, L.K.; JEE, J-G.; LEE, M.Y. **The role of thioredoxin reductase and glutathione reductase in plumbagin-induced, reactive oxygen species-mediated apoptosis in cancer cell lines.** *European Journal of Pharmacology*. 2015; 765:384–93.

ISMAIL, M.; METWALLY, A.; FARGHALY, A.; BRUCE, J.; TAO, L.F.; BENNETT, J.L. **Characterization of isolates of *Schistosoma mansoni* from Egyptian villagers that tolerate high doses of praziquantel.** *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 1996, 55,214–218.

JOHANN, L.; BELORGEY, D.; HUANG, H. H.; DAY, L.; CHESSE, M.; BECKER, K.; WILLIAMS, D.L.; CHARVET, E.D. **Synthesis and evaluation of 1,4-naphthoquinone ether derivatives as SmTGR inhibitors and new antischistosomal drugs.** *The FEBS Journal*. 2015; 282(16): 3199–3217

JUNG, B.K.; CHAI, J.Y. **Epidemiology of Trematode Infections: An Update.** *Digenetic Trematodes, Advances in Experimental Medicine and Biology* 2019, 1154.

KABUYAYA, M.; CHIMBARI, M.J.; MUKARATIRWA, S. **Efficacy of praziquantel treatment regimens in pre-school and school aged children infected with schistosomiasis in sub-Saharan Africa: a systematic review.** *Infectious Diseases of Poverty*. 2018, 7:73.

KAPADIA, G.J.; SOARES, I.A.O.; RAO, G.S.; BADOCO, F.R.; FURTADO, R.A.; CORREA, M.B.; TAVARES, D.C.; CUNHA, W.R.; MAGALHÃES, L.G. **Antiparasitic activity of menadione (vitamin K3) against *Schistosoma mansoni* in BABL/c mice.** *Acta Tropica*. 2017, 167,163–173.

KAPUR, A.; BERES, T.; RATHI, K.; NAYAK, A.P.; CZARNECKI, A.; FELDER, M.; GILLETTE, A.; ERICKSEN, S.S.; SAMPENE, E.; SKALA, M.C.; BARROILHET, L.; PATANKARI, M.S. **Oxidative stress via inhibition of the mitochondrial**

electron transport and Nrf-2-mediated antioxidative response regulate the cytotoxic activity of plumbagin. Scientific REPOrTS. 2018, 8:1073.

KATZ, N. et al. **A simple device for quantitative stool thick-smear technique in schistosomiasis mansoni.** Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo. 1972,14:397-400.

KUNTZ, E.R. **Effect of light and temperature on shedding of *Schistosoma mansoni* cercarie.** Naval Medical Research Institute. 1946: 7-16.

LAGO, E.M.; SILVA, M.P.; QUEIROZ, T.G.; MAZLOUM, S.F.; RODRIGUES, V.C.; CARNAÚBA, P.U.; PINTO, P.L.; ROCHA, J.A.; FERREIRA, L.L.G.; ANDRICOPULO, A.D.; MORAES, J. **Phenotypic screening of nonsteroidal anti-inflammatory drugs identified mefenamic acid as a drug for the treatment of schistosomiasis.** EBioMedicine. 2019, 43, 370–379.

LIMA, N.M.F.; SANTOS, A.F.; PORFÍRIO, Z.; GOULART, M.O.F.; SANT'ANA, A.E.G. **Toxicity of lapachol and isolapachol and their potassium salts against *Biomphalaria glabrata*, *Schistosoma mansoni* cercariae, *Artemia salina* and *Tilapia nilotica*.** Acta Tropica 2002, 83, 43–47.

LIU, Y.; CAI, Y.; HE, C.; CHEN, M.; LI, H. **Anticancer Properties and Pharmaceutica Applications of Plumbagin: A Review.** The American Journal of Chinese Medicine. 2017, Vol. 45, No. 3, 1–19.

LORSUWANNARAT, N.; SAOWAKON, N.; RAMASOOTTA, P.; WANICHANON, C.; SOBHON, P. **The anthelmintic effect of plumbagin on *Schistosoma mansoni*.** Experimental Parasitology. 2013, 133, 18–27.

LORSUWANNARAT, N.; PIEDRAFITA, D.; CHANTREE, P.; SANSRI, V.; SONKOOKRONG, S.; BANTUCHAI, S.; SANGPAIROT, K.; KUEAKHAI, P.; CHANGKLUNGMOA, N.; CHAICHANASAK, P.; CHANSELA, P.; SOBHON, P. **The *in vitro* anthelmintic effects of plumbagin on newly excysted and 4-weeks-old juvenile parasites of *Fasciola gigantica*.** Experimental Parasitology. 2014, 136, 5–13.

LOVERDE, P.T. **Schistosomiasis.** Digenetic Trematodes, Advances in Experimental Medicine and Biology 1154, 2019.

LOYO, R.M. **Avaliação do Perfil Metabólico da Esquistossomose Mansônica em Modelo Animal.** Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia em Saúde) - Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, 2018.

LUCENA, R.F.P., LUCENA, C.M., CARVALHO, T.K.N., FERREIRA, E.C. **Plantas e animais medicinais da Paraíba: um olhar da etnobiologia e etnoecologia** [recurso eletrônico - ebook] Cabedelo, PB: Editora IESP, 2018, 280 p.

MARIA, Maria. Intérprete: Milton Nascimento. Compositores: Fernando Brant e Milton Nascimento. In: Clube da Esquina 2. Intérprete: Milton Nascimento [M.N.]: EMI, 1978. 2 LPs, lado 4, faixa 2.

MARREIRA, E.M.; ALMEIDA, P.R.M.; GIULIETTI, A.M.; OLIVEIRA, R.P. **Flora da Bahia: Plumbaginaceae**. Sitientibus série Ciências Biológicas. 2018. ISSN 2238-4103.

MCMANUS, D.P.; DUNNE, D.W.; SACKO, M.; UTZINGER, J.; VENNERVALD, B.J.; ZHOU, X.N. **Schistosomiasis**. Nature Reviews. Disease Primers. Article citation ID: (2018) 4:13.

MELO, A.G.S.; MELO, C.M.; OLIVEIRA, C.C.C.; OLIVEIRA, D.S.; SANTOS, V.B.; JERALDO, V.L.S. **Esquistossomose em área de transição rural-urbana: reflexões epidemiológicas**. Ciência, Cuidado e Saúde. 2011, 10(3):506-513.

MELO, A.G.S.; IRMAO, J.J.M.; JERALDO, V.L.S.; MELO, C.M. **Esquistossomose mansônica em famílias de trabalhadores da pesca de área endêmica de Alagoas**. Escola Anna Nery. 2019, 23(1):e20180150.

MOLYNEUX, D. **Neglected tropical diseases**. Community Eye Health, London. 2013, v. 26, n. 82, p. 21–24.

MORAES, V.S.; SHOLLENBERGER, L.M.; SIQUEIRA, L.M.V.; BORGES, W.C.; HARN, D.A.; GRENFELL, R.F.Q.; RABELLO, A.L.T.; COELHO, P.M.Z. **Diagnosis of *Schistosoma mansoni* infections: what are the choices in Brazilian low-endemic areas?** Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. 2019, Vol. 114: e180478.

MUTH, S., SAYASONE, S., ODERMATT-BIAYS, S., PHOMPIDA, S., DUONG, S., ODERMATT, P. **Chapter 7 - *Schistosoma mekongi* in Cambodia and Lao People's Democratic Republic**, in: Xiao-Nong Zhou, R.B.R.O., Jürg, U. (Eds.), Advanced Parasitology. 2010, 179-203.

NASCIMENTO, G.L.; PEGADO, H.M.; DOMINGUES, A.L.C.; XIMENES, R.A.A.; ITRIA, A.; CRUZ, L.N.; OLIVEIRA, M.R.F. **The cost of disease targeted for elimination in Brazil: the case of schistosomiasis mansoni**. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. 2018, vol. 114: e180347.

NAYAK, P.; SHARMA, M.; BEHERA, S.N.; THIRUNAVOUKKARAS, M.; CHAND, P.K. **High-Performance Liquid Chromatographic Quantification of Plumbagin from Transformed Rhizoclones of *Plumbago zeylanica* L.: Inter-Clonal Variation in Biomass Growth and Plumbagin Production**. Applied and Biochemistry and Biotechnology. 2015, 175: 1745.

NELWAN, M.L. **Schistosomiasis: Life Cycle, Diagnosis, and Control**. Current Therapeutic Research. 2019, 91, 5–9.

NEVES, D. P. **Parasitologia Humana**. 13^a ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 2016.

NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M. **Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014**. Journal of Natural Products. 2016, 79 (3), 629-661.

NEWMAN, M.L. **Schistosomiasis: Life Cycle, Diagnosis, and Control**. Current Therapeutic Research 91 (2019) 5–9.

NOLLEN, P. M.; NADAKAVUKAREN, M. J. **Megalodiscus temperatus: scanning electron microscopy of the tegumental surfaces**. Experimental Parasitology. 1974, v. 36, n. 1, p. 123- 130.

NOYA, O.; KATZ, N., et al. **Neglected Tropical Diseases - Latin America and the Caribbean. Schistosomiasis in America**. Springer. 2015.

NUGEM, R.C. **Doenças Relacionadas ao Saneamento Ambiental Inadequado (DRSAI) em Porto Alegre – RS**. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Escola de Enfermagem, Programa de Pós-Graduação em Saúde Coletiva, Porto Alegre, 2015.

OLIVEIRA, V.G. **Participação de eosinófilos na evolução da infecção experimental por *Schistosoma mansoni* em camundongos**. 2016. 89 p. Tese (Mestrado em Parasitologia) – Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG, Belo Horizonte, 2016.

OLIVIER, L.; STIREWALT, M. A. **An efficient method for exposure of mice to cercariae of *Schistosoma mansoni***. The Journal of Parasitology. 1952, v. 38, n. 1, p. 19-23.

PADHYE, S.; DANDAWATE, P.; YUSUFI, M.; AHMAD, A.; SARKAR, F.H. **Perspectives on Medicinal Properties of Plumbagin and Its Analogs**. Medicinal Research Reviews. 2010.

PANICHAYUPAKARANANT, P.; AHMAD, M.I. **Plumbagin and Its Role in Chronic Diseases**. Drug Discovery from Mother Nature, Advances in Experimental Medicine and Biology. 2016, 929.

PHALEE, A.; WONGSAWAD, C.; ROJANAPAIBUL, A.; CHAI, J.Y. **Experimental Life History and Biological Characteristics of *Fasciola gigantica* (Digenea: Fasciolidae)**. Korean Journal of Parasitology. 2015, Vol. 53, No. 1: 59-64.

PEREIRA, A. S.; PADILHA, R. J.; LIMA-FILHO, J. L.; CHAVES, M. E. **Scanning electron microscopy of the human low-density lipoprotein interaction with the tegument of *Schistosoma mansoni***. Parasitology Research. 2011, v. 109, n. 5, p. 1395–1402.

PEREYRA, C.E.; DANTAS, R.F.; FERREIRA, S.B.; GOMES, L.P.; SILVA-JR, F.P. **The diverse mechanisms and anticancer potential of naphthoquinones**. Cancer Cell International. 2019, 19:207.

PERNAMBUCO. Secretaria Estadual de Saúde. Secretaria Executiva de Vigilância em Saúde. **Esquistossomose e geo-helmintíases: relatório das condições de saneamento das áreas/localidades hiperendêmicas em**

Pernambuco. Recife: Secretaria Estadual de Saúde de Pernambuco; 2013. 134p.

PERNAMBUCO. Secretaria Estadual de Saúde. Relatório de Gestão SANAR – **Programa de Enfrentamento às Doenças Negligenciadas** 2011-2014. 2015, 100p.

PINTO, A.V.; PINTO, M.C.R.; GILBERT, B.; PELLEGRINO, J.; MELLO, R.T. ***Schistosoma mansoni* blockage of cercarial skin penetration by chemical agents: i. Naphtoquinones and derivatives.** Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. 1977, 71(2): 133-5.

PINTO, A.V.; CASTRO, S.L. **The Trypanocidal Activity of Naphthoquinones: A Review.** Molecules. 2009, 14, 4570-4590.

RAYABANDHA, S.K.M.; AITHAL, K.; ANANDAM, A.; SHAVI, G.; NAYANABHIRAMA, U.; ARUMUGAM, K.; MUSMADE, P.; BHAT, K.; SADASHIVA, S.R.B. **Preparation, *in vivo* characterization, pharmacokinetic, and pharmacodynamic evaluation of chitosan-based plumbagin microspheres in mice bearing B16F1 melanoma.** Drug Delivery. 2010, 17:1003–13.

RIBEIRO, K.A.L.; CARVALHO, C.M.; MOLINA, M.T.; LIMA, E.P.; LÓPEZMONTERO, E.; REYS, J.R.M.; OLIVEIRA, M.B.F.; PINTO, A.V.; SANT'ANA, A.E.G.; GOULART, M.O.F. **Activities of naphthoquinones against *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae), vector of dengue and *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818), intermediate host of *Schistosoma mansoni*.** Acta Tropica. 2009, 111(1): 44-50.

ROYO, S.O.; ROJAS, P.L.; AMESTY, A. GUTIÉRREZ, D.; FLORES, N.; RODRÍGUEZ, P.M.; PÉREZ, L.F.; BRAUN, A.E. **Synthesis and Antiplasmodial Activity of 1,2,3-Triazole-Naphthoquinone Conjugates.** Molecules. 2019, 24, 3917.

SAOWAKON, N.; LORSUWANNARAT, N.; CHANGKLUNGMOA, N.; WANICHANON, C.; SOBHON, P. ***Paramphistomum cervi*: The *in vitro* effect of plumbagin on motility, survival and tegument structure.** Experimental Parasitology. 2013, 133, 179–186.

SCHOLTE, R.G.; CARVALHO, O.S.; MALONE, J.B.; UTZINGER, J.; VOUNATSOU, P. **Spatial distribution of *Biomphalaria* spp., the intermediate host snails of *Schistosoma mansoni*, in Brazil.** Geospatial Health. 2012, 6(3): S95-S101.

SCHWARTZ, C.; FALLON, P.G. ***Schistosoma* “Eggs-Itting” the Host: Granuloma Formation and Egg Excretion.** Frontiers in Immunology. 2018. Volume 9, Article 2492.

SHALABY, H. A.; EL NAMAKY, A. H.; KAMEL, R. A.; DERBALA, A. A. **Tegumental surface changes in adult *Paramphistomum microbothrium***

(Fischhoeder 1901) following *in vitro* administration of artemether. Journal of Helminthology, 2010, v. 84, n. 2, p. 115–122.

SILVA, A.M.P.; PAIVA, S.R.; FIGUEIREDO, M.R.; KAPLAN, M.A.C. **Atividade Biológica de Naftoquinonas de Espécies de Bignoniaceae.** Revista Fitos. 2012, Vol. 7.

SILVA, T.F.; OLIVEIRA, A.B. **Plantas leishmanicidas da Amazônia Brasileira: uma revisão.** Revista Fitos, Rio de Janeiro. 2016, Vol, 10(3), 220-372.

SILVA, V.B.R.; CAMPOS, B.R.K.L.; OLIVEIRA, J.F.; DECOUT, J.L.; LIMA, M.C.A. **Medicinal chemistry of antischistosomal drugs: Praziquantel and oxamniquine.** Bioorganic & Medicinal Chemistry. 2017, 25, 3259–3277.

SINGH, K.; NAIDOO, Y.; MOCKTAR, C.; BAIJNATH, H. **Biosynthesis of silver nanoparticles using *Plumbago auriculata* leaf and calyx extracts and evaluation of their antimicrobial activities.** Advances in Natural Sciences.: Nanoscience and Nanotechnology. 2018.

SMITHERS, S.R.; TERRY, R.J. **The infection of laboratory hosts with cercariae of *Schistosoma mansoni* and the recovery of worms.** Parasitology. 1965; 55:695-700.

SOUZA, F.P.C.; VITORINO, R.R.; COSTA, A.P.; JUNIOR, F.C.F.; SANTANA, L.A.; GOMES, A.P. **Esquistossomose mansônica: aspectos gerais, imunologia, patogênese e história natural.** Revista da Sociedade Brasileira de Clínica Médica. 2011, 9(4): 300-7.

STIREWALT, M.A. ***Schistosoma mansoni*: Cercaria to schistosomule.** In Advances in Parasitology. 1974, pp. 115-182, Academic Press, London.

SUKKASEM, N.; CHATUPHONPRASERT, W.; TATIYA-APHIRADEE, N.; JARUKAMJORN, K. **Imbalance of the antioxidative system by plumbagin and *Plumbago indica* L. extract induces hepatotoxicity in mice.** Journal of Intercultural Ethnopharmacology. 2016. Vol 5. Issue 2.

SUMSAKUL, W.; PLENGSURIAKARN, T.; NA-BANGCHANG, K. **Pharmacokinetics, toxicity, and cytochrome P450 modulatory activity of plumbagin.** Pharmacology and Toxicology. 2016, 17:50a.

SUMSAKUL, W.; KARBWANG, J.; NA-BANGCHANG, K. **Application of SPECT/CT imaging system and radiochemical analysis for investigation of blood kinetics and tissue distribution of radiolabelled plumbagin in healthy and *Plasmodium berghei*-infected mice.** Experimental Parasitology. 2016, 161:54–61b.

TOKUNAGA, T.; TAKADA, N.; UEDA, M. **Mechanism of antifeedant activity of plumbagin, a compound concerning the chemical defense in carnivorous plant.** Tetrahedron Letters. 2004, 45:7115–9.

TURCHETTI, N.L. **Paisagismo e ornamentação no distrito federal: comércio e uso de plantas nativas e exóticas.** Monografia – Universidade de Brasília / Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, 2016.

VALE, N.; GOUVEIA, M.J.; RINALDI, G.; BRINDLEY, P.J.; GÄRDNER, F.; COSTA, J.M.C. **Praziquantel for Schistosomiasis: Single-Drug Metabolism Revisited, Mode of Action, and Resistance.** Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2017, 61:e02582-16.

WANG, H.; ZHANG, H.; ZHANG, Y.; WANG, D.; CHENG, X.; YANG, F.; ZHANG, Q.; XUE, Z.; LI, Y.; ZHANG, L.; YANG, L.; MIAO, G.; LI, D.; GUAN, Z.; DA, Y.; YAO, Z.; GAO, F.; QIAO, L.; KONG, L.; ZHANG, R. **Plumbagin protects liver against fulminant hepatic failure and chronic liver fibrosis via inhibiting inflammation and collagen production.** Oncotarget, 2016, Vol. 7, pp: 82864-82875.

WELLINGTON, K.W.; HLATSHWAYO, V.; KOLESNIKOVA, N.I.; SAHA, S.T.; KAUR, M.; MOTADI, L.R. **Anticancer activities of vitamin K3 analogues.** Investigational New Drugs. Springer. 2019.

WHO, 2017. **Global Health Estimates 2015: Deaths by Cause, Age, Sex, by Country and by Region, 2000 – 2015.** http://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/estimates/en/index1.html Geneva.

WHO. **Schistosomiasis,** 2019. Disponível em: <
<https://www.who.int/schistosomiasis/disease/en/>>. Acesso em: 17/08/2019.

ZHANG, S.; COULTAS, K. **Identification of plumbagin and sanguinarine as effective chemotherapeutic agents for treatment of schistosomiasis.** International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance. 2013, 3, 28-34.

ZHANG, J.; ONAKPOYA, I.J.; POSADZKI, P.; EDDOUKS, M. **The Safety of Herbal Medicine: From Prejudice to Evidence.** Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. 2015, Vol. 15.

ZHANG, Z.; DENG, W.; KANG, R.; XIE, M.; BILLIAR, T.; WANG, H.; CAO, L.; TANG, D. **Plumbagin Protects Mice from Lethal Sepsis by Modulating Immunometabolism Upstream of PKM2.** Molecular Medicine. 2016, 22:162-172.