



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS (PPGCF)**

**PAULO HENRIQUE VALENÇA NUNES**

**ATIVIDADE ESQUISTOSSOMICIDA DA JUGLONA FRENTE A *Schistosoma mansonii* (CEPA BH)**

**Recife**

**2020**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO**

**PAULO HENRIQUE VALENÇA NUNES**

**ATIVIDADE ESQUISTOSSOMICIDA DA JUGLONA FRENTE A *Schistosoma mansoni* (CEPA BH)**

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.

**Orientadora:** Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Mônica Camelo Pessoa de Azevedo Albuquerque

**Coorientador:** Prof<sup>º</sup>. Dr. André de Lima Aires

**Recife**

**2020**

Catálogo na fonte  
Bibliotecária: Mônica Uchôa, CRB4-1010

N972a Nunes, Paulo Henrique Valença.  
Atividade esquistossomicida da juglona frente a *Schistosoma mansoni* (CEPA BH) / Paulo Henrique Valença Nunes. – 2020.  
97 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 e anexo.

1. *Schistosoma mansoni*. 2. In vitro. 3. Esquistossomose. 4. Juglona. Esquistossomicida. I. Albuquerque, Mônica Camelo Pessoa de Azevedo (Orientadora). II. Título.

615.3 CDD (20.ed.)

UFPE (CCS2020-225)

**PAULO HENRIQUE VALENÇA NUNES**

**ATIVIDADE ESQUISTOSSOMICIDA DA JUGLONA FRENTE A *Schistosoma mansoni* (CEPA BH)**

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.

Aprovada em: 29/10/2020.

**COMISSÃO EXAMINADORA**

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Mônica Camelo Pessoa de Azevedo Albuquerque (Presidente)  
Universidade Federal de Pernambuco

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ivone Antônia de Souza (Examinador interno)  
Universidade Federal de Pernambuco

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Eulália Camelo Pessoa de Azevedo Ximenes (Examinador externo)  
Universidade Federal de Pernambuco

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus, por me abençoar e tornar possível essa conquista.

À minha orientadora Mônica Albuquerque por toda paciência e pelos muitos ensinamentos científicos transmitidos.

Ao meu coorientador André Aires pelas referências musicais, conversas divertidas, ensinamentos e orientações.

Aos meus pais (Joyce e Justino) que são incríveis. Foram eles que, sob tantas dificuldades, me apoiaram e sempre frisaram: o estudo é a maior herança que podem me oferecer.

Às minhas irmãs, Jéssica e Clara, pois são sinônimas de cumplicidade e força.

Ao Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami por toda estrutura oferecida para o desenvolvimento desse trabalho.

À professora Teresinha Gonçalves da Silva e a todos do Laboratório de Prospecção Farmacotológica de Produtos Bioativos (BIOFARMATOX), em especial Caroline Leal, que se dispuseram a auxiliar o desenvolvimento deste trabalho.

Aos meus parceiros do Laboratório de Imunologia e Fármacos Antiparasitários, em especial, Lucas, Victor Hugo e Renan Andrade, que sempre tornaram mais fáceis os experimentos de 120 horas em análise.

Aos que são da família de coração: Adson, Clênio, Fábio e Natali que me apoiaram e me perdoaram pela ausência nos rolês.

Aos meus tios e tias que me abrigaram e cuidaram de mim a todo momento, mesmo eu muitas vezes não podendo comparecer a eventos familiares e a algumas visitas.

A Rafael Quadros, pelo apoio, paciência e por sempre auxiliar no meu crescimento.

Ao Programa de Pós-Graduação de Ciências Farmacêuticas (PPGCF), em especial, os secretários Nerilin e Rilvan, que sempre se demonstraram solícitos e animaram cada ida a secretaria.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal e Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsa de estudo durante o curso de mestrado.

A todos que de forma direta ou indireta contribuíram com este trabalho.

## RESUMO

O praziquantel (PZQ) ainda é o único recurso terapêutico para a esquistossomose, um fármaco eficaz, seguro, de baixo custo. Entretanto, PZQ é incapaz de agir nas fases jovens de *Schistosoma* e está sob risco eminente do surgimento de cepas resistentes e/ou tolerantes. Assim, torna-se necessária a busca por novos compostos com potencial esquistossomicida. Este estudo teve como objetivo avaliar *in vitro* a susceptibilidade de diferentes estágios evolutivos de *Schistosoma mansoni* (cepa BH) frente a juglona, 5-hidroxi-1,4-naftoquinona. Para isso, esquistossômulos, vermes jovens e vermes adultos (macho, fêmeas e casais) de *S. mansoni* (cepa BH) foram cultivados em meio RPMI-1640 suplementado e submetidos a diferentes concentrações de juglona. Utilizou-se como critérios esquistossomicidas as alterações de motilidade, taxa de mortalidade e repercussões gerais (danos tegumentares, capacidade de oviposição e desacasalamento). Além disso, foi analisado o potencial citotóxico da juglona sob culturas primárias de células esplênicas de murinos. Esquistossômulos de *S. mansoni* (cepa BH) apresentaram maior susceptibilidade frente a juglona com valor da concentração letal média (CL<sub>50</sub>) igual a 0,1981 µM, seguido de vermes jovens com CL<sub>50</sub> determinada em 3,175 µM e vermes adultos fêmeas, machos e casais com CL<sub>50</sub> 11,32 µM, 19,01 µM e 22,38 µM, respectivamente. Além disso, a juglona reduziu significativamente a quantidade de ovos postos por vermes fêmeas acasaladas na concentração de 3,125 e inibiu completamente a oviposição entre 6,25-100 µM. Em adição, alterações tegumentares como: bolhas, aspecto granuloso, irregularidade, rupturas no tegumento e modificações topográficas, foram observadas em todas fases evolutivas analisadas. E, juglona não apresentou efeitos citotóxicos sobre esplenócitos de murinos entre 1,56-100 µM. Contudo, esquistossômulos, vermes jovens e adultos de *S. mansoni* (cepa BH) demonstraram susceptibilidade ao composto juglona mesmo nos vermes expostos a concentrações subletais, havendo redução na motilidade, contração muscular/retração, incapacidade de adesão e alteração na estrutura tegumentar do parasito.

Palavras-chave: *Schistosoma mansoni*. *In vitro*. Esquistossomose. Juglona. Esquistossomicida.

## ABSTRACT

Praziquantel is still the unique therapeutic resources for schistosomiasis, an effective, safe, low-cost drug. However, this drug is unable to act in the juvenile stages of *Schistosoma* and is at imminent risk of the emergence of resistant and tolerant strains. Thus it is necessary to search for new compounds with schistosomicidal potential. This study aimed to evaluate *in vitro* the susceptibility of different evolutionary stages of *Schistosoma mansoni* (strain BH) against juglone, 5-hydroxy-1,4-naphthoquinone. For that, schistosomules, juvenile worms, and adult worms (male, females, and couples) from *S. mansoni* (BH strain) were sustained in supplemented RPMI-1640 medium and submitted to different concentrations of juglone. Changes in motility, mortality rate, and general repercussions (tegumentary damage, oviposition capacity, and deletion) were used as schistosomicidal criteria. Also, the cytotoxic potential of juglone under primary murine splenic cell cultures was analyzed. Schistosomules of *S. mansoni* (strain BH) were more susceptible to juglone with a mean lethal concentration value (LC<sub>50</sub>) of 0.1981 μM, followed by juvenile worms with an LC<sub>50</sub> determined at 3.175 μM and adult female worms, males and couples with LC<sub>50</sub> 11.32 μM, 19.01 μM, and 22.38 μM, respectively. Also, juglone significantly reduced the number of eggs laid by female worms mated to a concentration of 3.125 μM and completely inhibited oviposition between 6.25-100 μM. Besides, were observed in all analyzed evolutionary phases integumentary changes such as bubbles, granular appearance, irregularity, integument ruptures, and topographic changes. In addition, juglone did not show cytotoxic effects on murine splenocytes between 1.56-100 μM. However, schistosomules, juvenile worms, and adults of *S. mansoni* (strain BH) demonstrated susceptibility to the compound juglone even in worms exposed to sublethal concentrations, with reduced motility, muscle contraction, inability to adhere, and alteration in the parasitic integumentary structure.

Keywords: *Schistosoma mansoni*. *In vitro*. Schistosomiasis. Juglone. Schistosomicidal.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	Distribuição dos países com áreas de alto e baixo risco de infecção, 2015.....	20
Figura 2 –	Distribuição da Esquistossomose Mansônica de acordo com a taxa de positividade no Brasil, 2015.....	21
Figura 3 –	Distribuição das espécies do gênero <i>Biomphalaria</i> no Brasil. Em (a), (b) e (c) observa-se a distribuição espacial das espécies <i>B. glabrata</i> , <i>B. straminea</i> e <i>B. tenagophila</i> , respectivamente.....	22
Figura 4 –	Municípios pernambucanos distribuídos em GERES, considerados prioritários para esquistossomose em 2015.....	24
Figura 5 –	Ovo de <i>Schistosoma mansoni</i> . (M) Miracídio interiorizado e (EL) Espículo lateral evidente.....	26
Figura 6 –	Miracídio de <i>S. mansoni</i> : (a) exemplos de miracídio em microscopia de luz. (b) Miracídio com ênfase nas estruturas: Tb: <i>terebratorium</i> ; Gp: glândulas de penetração; Pe: poro excretor; Cf: células flama.....	27
Figura 7 –	Esporocistos de <i>S. mansoni</i> : (a) Região posterior do esporocisto evidenciando as células germinativas (gc); (b) Esporocisto mostrando em seu interior a massa neural (nm), <i>terebratorium</i> (t) vesículas (v) e gc. As linhas delimitam as regiões anterior (A) e posterior (P); (c) região posterior evidenciando como vesículas.....	29
Figura 8 –	Cercária de <i>Schistosoma mansoni</i> .....	31
Figura 9 –	Esquistossômulo de <i>Schistosoma mansoni</i> : (a) esquistossômulos em aumento de 200X; (b) esquistossômulo em aumento de 400X. Ambos sob microscopia óptica invertida.....	32

Figura 10 – Verme jovem (21 dias) de <i>Schistosoma mansoni</i> .....	33
Figura 11 – Verme adulto macho de <i>Schistosoma mansoni</i> . Ventosa oral (V.O.), ventosa ventral (V.V.) e canal ginecóforo (C.G.) .....	34
Figura 12 – Fêmea de <i>Schistosoma mansoni</i> . Ventosa oral (V.O.), ventosa ventral (V.V.), ovário (Ov). Glândulas vitelínicas (Gv) .....	35
Figura 13 – Casal de <i>Schistosoma mansoni</i> . (Cg) Canal ginecóforo.....	35
Figura 14 – Ciclo biológico do <i>Schistosoma mansoni</i> .....	38
Figura 15 – Dermatite cercariana.....	39
Figura 16 – Granuloma de <i>Schistosoma mansoni</i> .....	40
Figura 17 – Hepatoesplenomegalia.(a) vista frontal; (b) vista lateral.....	41
Figura 18 – Estrutura do Praziquantel e de seus enantiômeros.....	44
Figura 19 – Estrutura dos tipos de Quinonas.....	47
Figura 20 – Estrutura da Juglona.....	48
Figura 21 – Microfotografia de esquistossômulos <i>S. mansoni</i> (A-H). (A) Vermes cultivados por 120 horas em meio RPMI 1640 e (B) meio com DMSO 1,6% evidenciando ventosa oral (seta amarela) ventosa ventral (seta branca) e tegumento íntegro (seta cinza). (C) PZQ, 250 $\mu$ M, em 120 horas, exibindo bolhas (círculos), aspecto granuloso (seta preta) e contração muscular longitudinal (colchete). Juglona (D) na concentração de 1,25 $\mu$ M em 3 horas e (E) na concentração de 0,625 $\mu$ M exibiu bolhas e aspecto granuloso em 12 h, (F) além de bordas irregulares/ rupturas em 72h. (G) em 0,3125 $\mu$ M houve bolhas evidentes em 72 h. Juglona (H) a 0,635 e (I) 0,0781 $\mu$ M exibiram bolhas, aspecto granuloso e irregularidade/edema no tegumento no tempo de 120 horas. Imagens capturadas em 400X .....	61
Figura 22 – Microfotografia de vermes jovens de <i>S. mansoni</i> (A-I). (A) Vermes cultivados por 120 horas em meio RPMI 1640 e (B) meio com DMSO 1,6% evidenciando ventosa oral (seta laranja) e ventral (seta branca) e ceco (seta cinza). (C) PZQ, 250 $\mu$ M, em 120 horas, aspecto granuloso (seta preta) e contração muscular	

longitudinal (colchete). Juglona (D) na concentração de 50  $\mu\text{M}$  e (E) 25  $\mu\text{M}$  exibiram aspecto granuloso, bolhas no tegumento e ventosas (círculos) e retração dorso ventral (colchete). (F) Na concentração de 12,5  $\mu\text{M}$  em 24 horas exibiu as aspecto granuloso e contração muscular. (G) a concentração de 6,25  $\mu\text{M}$  exibiu aspecto granuloso e contração muscular em 72h, (H) com bolhas e extravasamento de material intracelular (quadrado) às 120 h. Ao final do experimento, (I) 3,125  $\mu\text{M}$  evidenciou aspecto granuloso, bolha e contração muscular. Imagens capturas em 200X, exceto para figura B a qual foi obtida em 100X.....

64

Figura 23 – Microfotografia Vermes Adultos Machos de *S. mansoni* (A-H). (A) Vermes cultivados por 120 horas em meio RPMI 1640 e (B) meio com DMSO 1,6%, evidenciando canal ginecóforo (seta amarela), ventosas orais e ventrais (setas brancas) e tegumento íntegro (seta cinza). (C) PZQ, 10  $\mu\text{M}$ , evidenciando bolhas e aspecto granuloso (círculo), ausência de adesão (seta) e contração muscular (colchete), em 24 h. Juglona (D) na concentração de 100  $\mu\text{M}$  demonstra as bolhas (círculo) e microbolhas (quadrado) no tegumento, ausência de adesão (seta preta) e contração dorso ventral (colchete) em 3 horas de incubação. (E) em 50  $\mu\text{M}$  gerou bolhas, contração muscular em forma espiral e sem adesão, em 12 horas. (F) em 25  $\mu\text{M}$  foi observado ventosa não aderida (seta), bolhas e microbolhas em todo tegumento, após 24 horas. Em 120 h (G) na concentração de 12,5  $\mu\text{M}$  houve contração muscular dorso ventral (colchete), bolhas no tegumento e ventosas (círculos) e (H) em 6,25  $\mu\text{M}$ , bolhas (círculo). As imagens foram capturadas em 40X, exceto as figuras F e H que estão em 200X e 100X, respectivamente.....

67

Figura 24 – Microfotografia de vermes adultos fêmeas de *S. mansoni* (A-H). (A) Vermes cultivados por 120 horas em meio RPMI 1640 e (B) meio com DMSO 1,6% evidenciando ventosas oral e ventral (setas brancas), ovário (seta amarela) e glândulas vitelínicas (seta cinza). (C) PZQ a 10  $\mu$ M, evidenciando bolhas (círculo), e intensa contração muscular (colchete), no tempo de 72 horas. Juglona (D) na concentração de 100  $\mu$ M exibiu contração muscular intensa e sem adesão a placa, em 3 horas de incubação. (E) concentração de 50  $\mu$ M, em 6 horas, evidencia bolhas, contração muscular em forma espiral e aspecto granuloso (seta). (F) a 25  $\mu$ M exibiu contração intensa em forma de espiral e incapacidade de aderência em 24 h. (G) em 12,5  $\mu$ M visualiza-se bolhas, aspecto granuloso, contração muscular, em 72 horas. (H) 6,25  $\mu$ M exibe bolhas no intervalo de 120 horas. Imagens capturadas em 40X ..... 70

Figura 25 – Microfotografia de Casais de *S. mansoni* (cepa BH) (A-H). Microfotografia de Casais de *S. mansoni* (cepa BH) (A-H). (A) Vermes cultivados por 120 horas em meio RPMI 1640 e (B) meio com DMSO 1,6% evidenciando tegumento íntegro, ventosas orais e ventrais (setas brancas), ovário (seta cinza) e canal ginecóforo. (C) PZQ, 10  $\mu$ M, exibiu bolhas no tegumento (círculo), aspecto granuloso (seta) e contração muscular intensa (colchete), em 72 horas de incubação. Juglona (D) na concentração de 100 $\mu$ M evidenciando contração muscular e irregularidade no tegumento (quadrado), após 3 horas. (E) a 50 $\mu$ M, no tempo de 12 h, exibindo bolhas no tegumento e ventosas (círculo) e sem aderência (seta preta). (F) em 25  $\mu$ M ausência de adesão e bolhas na ventosa, após 24 horas. (G) concentração de 12,5  $\mu$ M com ausência de adesão e incapacidade de pareamento (asterisco), em 72 horas. (H) em 6,25  $\mu$ M exibindo incapacidade de adesão e contração muscular

evidenciada pela borda irregular (círculo), em 120 horas. Imagens capturadas em 40X .....	<b>73</b>
Figura 26 – Influência <i>in vitro</i> da juglona sobre oviposição de fêmeas acasaladas de <i>Schistosoma mansoni</i> (Cepa BH) durante 120 horas. Valores expressos em média ± desvio padrão (DP) .....	<b>75</b>
Figura 27 – Efeito citotóxico da Juglona sobre a cultura primária de Esplenócitos murino após 72h de tratamento, avaliado pelo ensaio do MTT. Valores em média ± desvio padrão, analisados por ANOVA, seguido do pós-teste de Bonferroni.....	<b>76</b>

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Municípios prioritários por Região de Saúde entre 2015 e 2018.....	24
Tabela 2 – Avaliação <i>in vitro</i> da susceptibilidade de esquistossômulos (3 horas) de <i>Schistosoma mansoni</i> (cepa BH) controles e tratados com diferentes concentrações de juglona, durante 120 horas.....	62
Tabela 3 – Avaliação <i>in vitro</i> da susceptibilidade de vermes jovens de <i>Schistosoma mansoni</i> (cepa BH), controles e tratados com diferentes concentrações de juglona durante 120 horas.....	65
Tabela 4 – Avaliação <i>in vitro</i> da susceptibilidade de vermes adultos machos de <i>Schistosoma mansoni</i> (cepa BH), controles e tratados com diferentes concentrações de juglona durante 120 horas.....	68
Tabela 5 – Avaliação <i>in vitro</i> da susceptibilidade de vermes adultos fêmeas de <i>Schistosoma mansoni</i> (cepa BH), controles e tratados com juglona durante 120 horas.....	71
Tabela 6 – Avaliação <i>in vitro</i> da susceptibilidade de casais de <i>Schistosoma mansoni</i> (cepa BH), controles e tratados com juglona durante 120 horas.....	74

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>16</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>19</b>
2.1	ASPECTOS GEOGRÁFICOS E EPIDEMIOLÓGICOS DA ESQUISTOSSOMOSE MANSÔNICA .....	19
2.2	<i>Schistosoma mansoni</i> .....	25
<b>2.2.1</b>	<b>Aspectos morfológicos dos diferentes estágios evolutivos .....</b>	<b>25</b>
2.2.1.1	Ovos .....	25
2.2.1.2	Miracídios .....	26
2.2.1.3	Esporocistos Primários e Secundários .....	28
2.2.1.4	Cercárias .....	30
2.2.1.5	Esquistossômulos .....	31
2.2.1.6	Vermes Jovens .....	32
2.2.1.7	Vermes Adultos .....	33
<b>2.2.2</b>	<b>Ciclo biológico .....</b>	<b>35</b>
<b>2.2.3</b>	<b>Patogenia .....</b>	<b>38</b>
<b>2.2.4</b>	<b>Tratamento .....</b>	<b>42</b>
2.2.4.1	Praziquantel .....	43
2.3	JUGLONA .....	46
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>52</b>
3.1	OBJETIVO GERAL .....	52
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	52
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>53</b>
4.1	CONSIDERAÇÕES ÉTICAS E ANIMAIS EXPERIMENTAIS .....	53
4.2	COMPOSTOS .....	53
4.3	MANUTENÇÃO DA CEPA BH DE <i>Schistosoma mansoni</i> : INFECÇÃO DE CARAMUJOS, OBTENÇÃO DE CERCÁRIAS E INFECÇÃO DE CAMUNDONGOS .....	53

4.4	OBTENÇÃO DE ESQUISTOSSÔMULOS DE <i>Schistosoma mansoni</i> E AVALIAÇÃO <i>in vitro</i> DA SUA SUSCETIBILIDADE À JUGLONA .....	54
4.5	AVALIAÇÃO <i>in vitro</i> DA SUSCEPTIBILIDADE À JUGLONA DE VERMES JOVENS (21 DIAS) DE <i>Schistosoma mansoni</i> (CEPA BH) .....	55
4.6	AVALIAÇÃO <i>in vitro</i> DA SUSCEPTIBILIDADE À JUGLONA DE VERMES ADULTOS (50 DIAS) DE <i>Schistosoma mansoni</i> (CEPA BH) .....	55
4.7	CRITÉRIOS PARA DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ESQUISTOSSOMICIDA DA JUGLONA FRENTE A DIFERENTES ESTÁGIOS EVOLUTIVOS DE <i>Schistosoma mansoni</i> (CEPA BH) .....	56
4.7.1	<b>Escores de motilidade e taxa de sobrevivência .....</b>	<b>56</b>
4.7.2	<b>Capacidade de oviposição durante exposição à Juglona .....</b>	<b>57</b>
4.7.3	<b>Avaliação de citotoxicidade da juglona em células esplênicas .....</b>	<b>57</b>
4.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	58
<b>5</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>59</b>
5.1	A JUGLONA CAUSA MORTE E REDUÇÃO DE MOTILIDADE EM DIFERENTES ESTÁGIOS EVOLUTIVOS DE <i>Schistosoma mansoni</i> (CEPA BH) .....	59
5.1.1	<b>Atividade da juglona frente a Esquistossômulos .....</b>	<b>59</b>
5.1.2	<b>Atividade da juglona frente a Vermes Jovens .....</b>	<b>63</b>
5.1.3	<b>Atividade da juglona frente a Vermes Adultos de <i>S. mansoni</i> (machos, fêmeas e casais) .....</b>	<b>66</b>
5.1.3.1	Efeitos da juglona sobre Vermes Machos .....	66
5.1.3.2	Efeitos da juglona sobre Vermes Fêmeas .....	69
5.1.3.3	Efeitos da juglona sobre casais .....	72

5.2	ATIVIDADE DA JUGLONA NA OVIPOSIÇÃO DE <i>S. mansoni</i> .....	75
5.3	AVALIAÇÃO DE CITOTOXICIDADE DA JUGLONA .....	76
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>77</b>
<b>7</b>	<b>PERSPECTIVAS</b> .....	<b>83</b>
<b>8</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>84</b>
	REFERÊNCIAS .....	85
	ANEXO A- APROVAÇÃO DO CEUA/UFPE .....	97

## 1 INTRODUÇÃO

A esquistossomose, também conhecido como bilharzíase, é causada por helmintos trematódeos do gênero *Schistosoma* (*S. guineensis*, *S. intercalatum*, *S. japonicum*, *S. mekongi*, *S. mansoni* e *S. haematobium*). É uma doença parasitária de extrema importância para a saúde pública, pois ainda acomete a saúde de milhares de indivíduos no mundo e está relacionada a condições socioeconômicas adversas. Apresenta ainda alta taxa de mortalidade no mundo, gerando um significativo impacto econômico e social (COLLEY et al., 2014; GRIMES et al., 2015; CAROD-ARTAL et al., 2018).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), ainda existem 221 milhões de pessoas infectadas por *Schistosoma* no mundo. Estima-se que 78 países e/ou territórios são considerados endêmicos para esquistossomose (WHO, 2018). Destes, 54 países, têm *Schistosoma mansoni* como espécie mais prevalente, sendo a África subsaariana, Ásia e Américas, as regiões que apresentam maior número de indivíduos infectados (MCMANUS et al., 2018; WHO, 2018).

Na América Latina, o Brasil possui maior número de casos positivos para *S. mansoni* (ZONI et al., 2016). Cerca de 1,5 milhões de brasileiros estão infectados pelo trematódeo e 25 milhões vivem em regiões de constante risco à infecção. A região Nordeste, em especial, os estados de Alagoas, Rio Grande do Norte, Sergipe e Pernambuco são os mais acometidos por focos de transmissão e número de infecção. Pernambuco é a unidade federativa brasileira com maior taxa de internações e de mortes causadas pela esquistossomose mansônica (MARTINS et al., 2015; MS, 2017; KATZ, 2018).

Embora o *Schistosoma* cause impacto socioeconômico nas regiões endêmicas, até o momento, existe apenas uma molécula eficaz para o tratamento dessa parasitose: o praziquantel (PZQ). PZQ é um composto de baixo custo e eficiente em todas as espécies do gênero *Schistosoma* (BERTÃO et al., 2012). Entretanto, está há mais de 40 anos no mercado, sendo utilizado extensivamente para tratamentos em massa. Tal fato torna preocupante o surgimento de cepas resistente e/ou tolerantes (ISMAIL et al., 1994; ISMAIL et al., 1996; CIOLI et al., 2004 MELMAN et al., 2009). Além disso, o PZQ não

impede reinfecção e não apresenta ações significativas em todas as fases evolutivas do verme, limitando-se aos vermes adultos (VALE et al., 2017; HOTEZ et al., 2019).

Diante desta problemática, fica evidente a necessidade do desenvolvimento de novos fármacos seja de origem naturais, sintéticas ou semissintética afim de combater e/ou controlar a esquistossomose. Neste contexto, os produtos naturais são amplamente empregados nas pesquisas de fármacos esquistossomicidas, visto que são fontes de biomoléculas promissoras, como os compostos fenólicos que apresentam ação sobre estágios evolutivos de *Schistosoma* (AIRES et al., 2014; LAGO et al., 2017; SILVA et al., 2019).

Um dos subgrupos de moléculas de extrema relevância em pesquisas anti-esquistossomóticas são as naftoquinonas, visto que apresentam efeitos biológicos e farmacológicos únicos (KAPADIA et al., 2017; METWALY et al., 2020). Em estudo recente com a orto-naftoquinona  $\beta$ -lapachona, realizada por nosso grupo de pesquisa, foi demonstrado a capacidade dela agir, *in vitro*, no tegumento de vermes adultos machos de *S. mansoni* (cepa BH) e induzir 100% mortalidade no intervalo de 24 horas (AIRES et al., 2014). Quando administrada em camundongos com diferentes estágios de desenvolvimento do *S. mansoni* (esquistossômulos de pele, esquistossômulos pulmonar, vermes jovens e vermes adultos) a  $\beta$ -lapachona reduziu significativamente a carga de vermes e ovos e no tecido hepático, reduziu a densidade numérica e o diâmetro médio de granulomas (AIRES et al., 2012).

Neste estudo, nos propomos avaliar a atividade esquistossomicida da Juglona (5-hidroxi-1,4 naftoquinona), uma naftoquinona natural isolada de caules, folhas, sementes e raízes das árvores da família Juglandaceae, comumente utilizada na medicina popular como anti-inflamatório, antibacteriano e antifúngico (STRUGSTAD e DESPOTOVSKI, 2012). Além dessas propriedades, a juglona é eficiente na interrupção de ciclos biológicos de helmintos e protozoários que afetam animais e humanos. Em protozoários, a juglona demonstra atividade em *Trypanosoma cruzi*, *T. brucei rhodesiense* e *Leishmania donovani* (ELLENDORFF et al., 2015). Em helmintos, é também eficaz na espécie *Hymenolepis nana* em camundongos (DAMA e JADHAV, 1997) e sobre o desenvolvimento de *Meloidogyne spp.*, nematóide frequente em cultivos de *Arachis hypogaea* L. (amendoim) (Dama et al., 1999).

Visto a importância na busca de novas moléculas esquistossomicidas e considerando o potencial antiparasitário das naftoquinonas, este trabalho teve como objetivo avaliar *in vitro* o efeito de juglona (5-hidroxi-1,4 naftoquinona) contra diferentes estágios evolutivos do parasito *S. mansoni* (cepa BH).

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

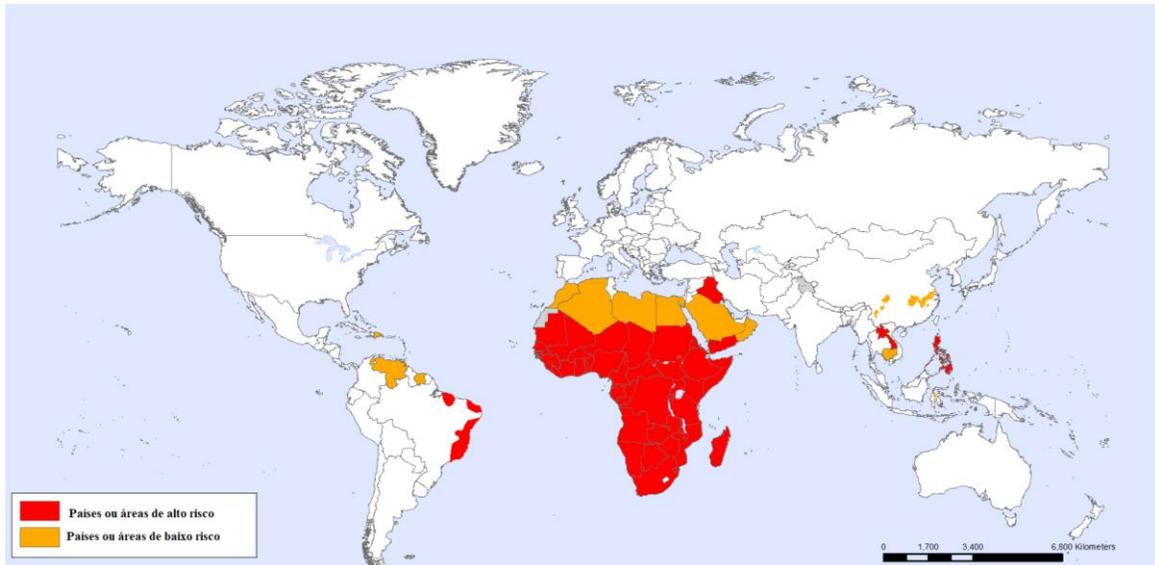
### 2.1 ASPECTOS GEOGRÁFICOS E EPIDEMIOLÓGICOS DA ESQUISTOSSOMOSE MANSÔNICA

O termo esquistossomose, também conhecido como bilharzíase, é uma designação utilizada para infecções causadas por helmintos trematódeos do gênero *Schistosoma*. É uma doença crônica e debilitante, de extrema importância no âmbito da saúde pública, por apresentar altas taxas de mortalidade e morbidade, gerando impacto social e econômico à nível mundial (BRUUN; AAGAARD-HANSEN, 2007; COLLEY et al., 2014). Devido a isso, a esquistossomose foi categorizada pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como a segunda maior doença parasitária negligenciada do mundo (MCMANUS et al., 2018; WHO, 2018).

As infecções causadas por *Schistosoma* ocorrem predominantemente em regiões ou comunidades pobres, onde há maior susceptibilidade das pessoas, devido aos fatores socioambientais propícios para transmissão do parasito, como: presença de caramujos hospedeiros intermediários, sistema de saneamento básico ineficiente, limitação ao acesso de água potável e ausência de educação sanitária (MCMANUS et al., 2018).

Segundo a OMS, mais de 700 milhões de pessoas vivem sob risco eminente de infecção por *Schistosoma* (Figura 1), 221 milhões estão infectadas, 150 mil apresentam sintomatologia e 500 mil vão a óbito anualmente (WHO, 2018). Atualmente seis espécies são responsáveis por esse perfil epidemiológico da esquistossomose humana, podendo se apresentar na forma intestinal (*S. guineensis*, *S. intercalatum*, *S. japonicum*, *S. mekongi* e *S. mansoni*) ou na forma urinária da doença (*Schistosoma haematobium*) (GRIMES et al., 2015; CAROD-ARTAL et al., 2018;). Dentre as espécies citadas, *S. haematobium* e *S. mansoni* são consideradas as mais prevalentes no mundo (WHO, 2017).

Figura 1 - Distribuição dos países com áreas de alto e baixo risco de infecção, 2015.

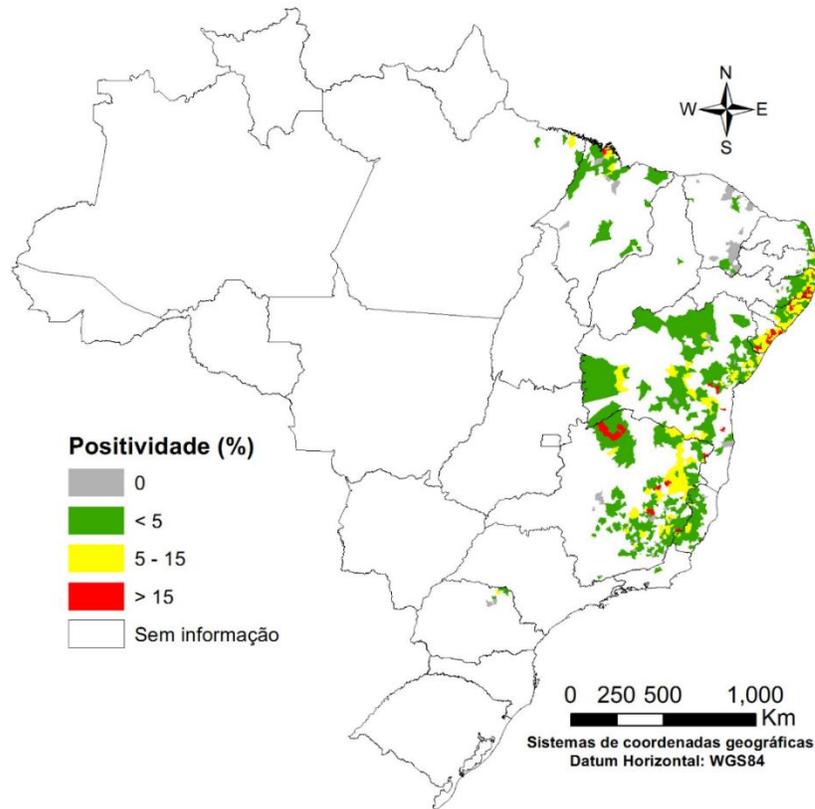


Fonte: (WHO, 2017).

A espécie *S. mansoni* é relatada em 54 países e territórios do mundo, com predomínio na África, no leste Mediterrâneo e nas Américas. No Brasil é a única espécie capaz de completar seu ciclo de vida, considerado, até 2014, o país mais endêmico da América Latina para esquistossomose mansônica, apresentando 58,6% de positividade em exames de crianças com idade escolar (MS, 2017a; ZONI et al., 2016). Em 2015, estimou-se 0,18 morte para cada 100 mil brasileiros com afetando pessoas em idade economicamente produtiva (NASCIMENTO et al., 2019). Pode-se sugerir que os resultados destes estudos estão associados ao clima tropical, a precariedade no saneamento básico e a vulnerabilidade socioeconômica na maioria da população (MS, 2014; ZONI et al., 2016).

Embora haja apenas a espécie *S. mansoni* instalada e apta a completar seu ciclo de vida por meio de caramujos do gênero *Biomphalaria*, estima-se que no Brasil 2,5 milhões de pessoas estejam infectadas e 25 milhões vivam em áreas de constante risco à infecção (MARTINS et al., 2015; MS, 2017a) (Figura 2). Cerca de 19 dos 26 estados brasileiros estão afetados, com maior taxa de positividade em Alagoas, Bahia, Rio Grande do Norte, Paraíba, Sergipe, Espírito Santo, Minas Gerais, Pernambuco e partes isoladas do sul do país (Katz, 2018).

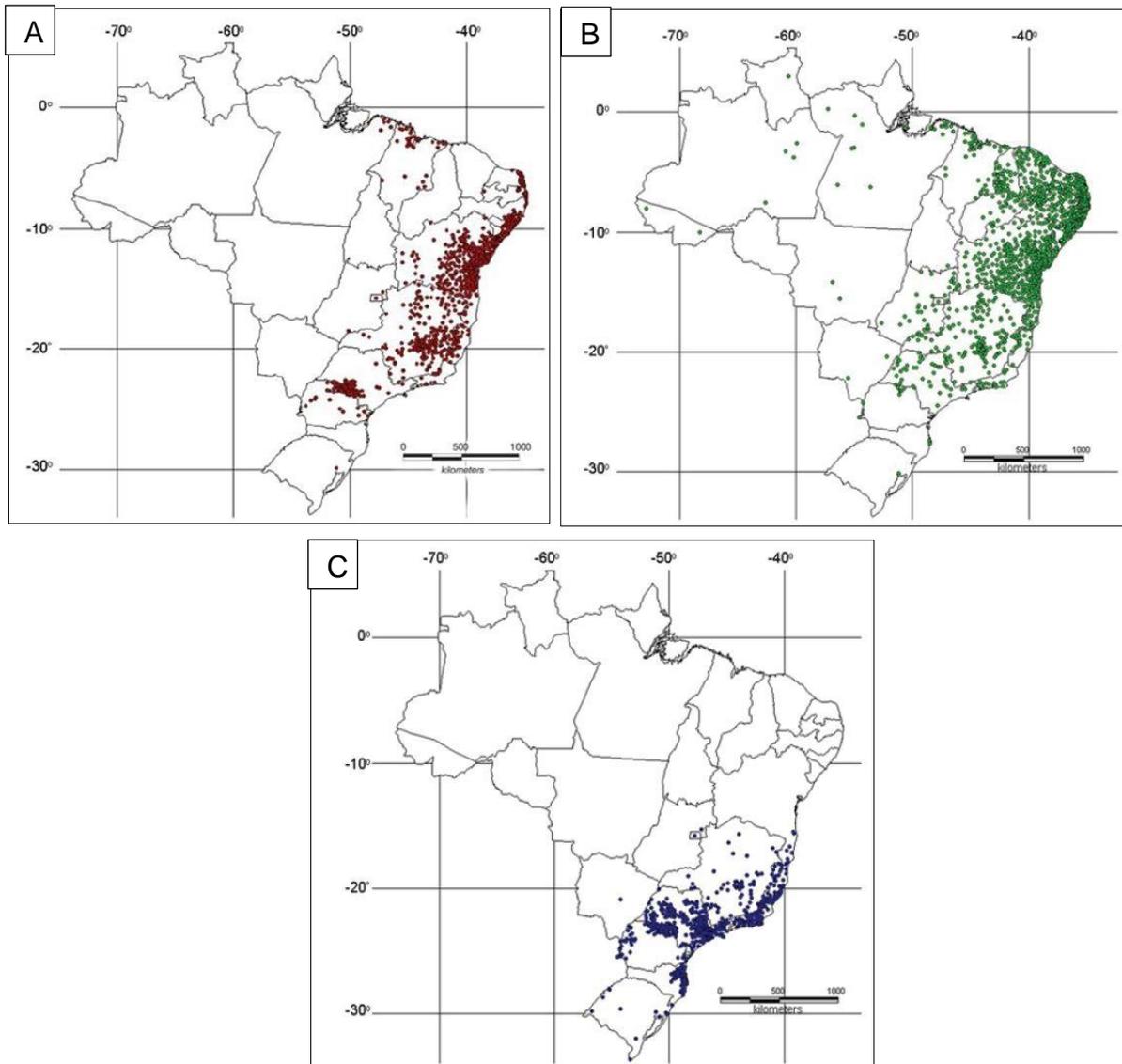
Figura 2 - Distribuição da Esquistossomose Mansônica de acordo com a taxa de positividade no Brasil, 2015.



Fonte: Ministério da Saúde.

As áreas de prevalência da esquistossomose mansônica estão correlacionadas com a distribuição geográfica de caramujos de água doce do gênero *Biomphalaria*. (CARVALHO et al., 2008). Existem 10 espécies e uma subespécie pertencentes a este gênero de molusco, fazendo parte do ecossistema brasileiro, no entanto, *Biomphalaria glabrata*, *Biomphalaria straminea* e *Biomphalaria tenagophila* são as únicas espécies consideradas susceptíveis a infecção por *S. mansoni* em todo país (Figura 3). *Biomphalaria glabrata* é a espécie considerada mais susceptível a infecção e é encontrada majoritariamente no nordeste e sudeste brasileiro (CARVALHO et al., 2008; LEAL NETO et al., 2013).

Figura 3 - Distribuição das espécies do gênero *Biomphalaria* no Brasil. Em A, B e C observa-se a distribuição espacial das espécies *B. glabrata*, *B. straminea* e *B. tenagophila*, respectivamente.



Fonte: (CARVALHO et al., 2008).

Apesar de existir ações de controle epidemiológico com atuação direta na população dos moluscos, o Nordeste permanece como a região de maior incidência em registro de novos casos de esquistossomose mansônica, apresentando maior número

de focos de transmissão e de casos confirmados de esquistossomose entre os anos 2000 e 2017 (PCE, 2016; KATZ, 2018).

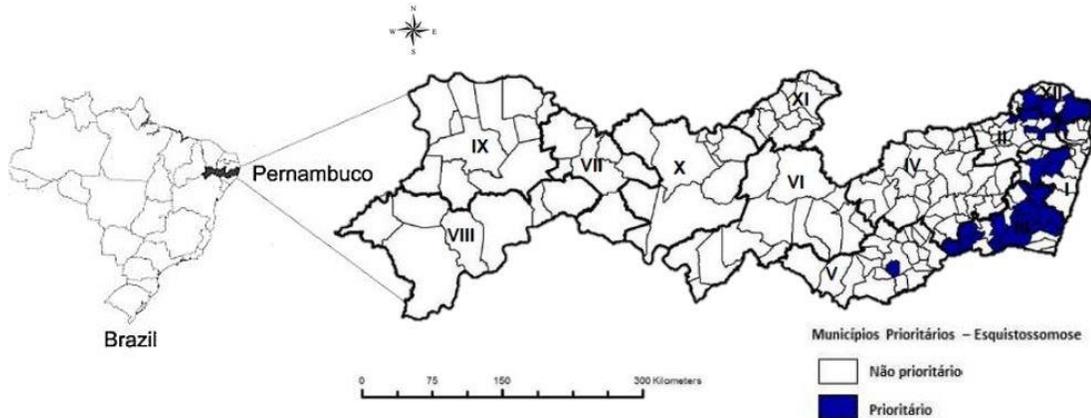
Pernambuco é considerado um dos estados brasileiros com maior endemicidade e taxa de mortalidade para a esquistossomose mansônica. Cerca de 56 localidades pernambucanas são consideradas de regiões risco de infecção por *S. mansoni*, distribuídas em 26 municípios considerados endêmicos, pertencentes as Gerências Regionais de Saúde (GERES) I, III, III, V e XII (Figura 4) (Tabela 1). Em 2015, 137 doentes evoluíram para o óbito. Em 2016, mais de 1.400 indivíduos não foram tratados após o diagnóstico laboratorial (PCE, 2016).

Recentemente, um novo perfil epidemiológico tem sido mostrado em inquéritos regionais. Observa-se que a esquistossomose deixou de ser prevalente apenas em regiões rurais, apresentando também alto índice de positividade ( $\geq 10\%$ ) em centros urbanos, sendo agora considerados prioritários. Esse novo padrão de incidência da doença pode ser justificado pelo intenso exodo rural e a inserção de migrantes parasitados em ambientes urbanos precários, estabelecendo a doença em regiões ainda não endêmicas (PAREDES et al., 2010; VITORINO; GOMES, 2011; BARBOSA et al., 2018; MS, 2017).

O Litoral, zona da mata e parte do Agreste de Pernambuco são as áreas que têm maior número de casos (COSTA et al., 2017). Segundo o DataSUS (2017), 240 casos foram confirmados no estado de Pernambuco, destes, 104 são localizados na região metropolitana do Recife e 121 na Zona da Mata e Agreste, afetando significativamente Santa Cruz do Capibaribe, Panelas, Palmeirina, Palmares, Chã de Alegria e Cabo de Santo Agostinho (COSTA et al., 2017).

Segundo a portaria SVS/MS nº 104, de 25 de janeiro de 2011 e o Decreto nº39.497, de 11 de junho de 2013, a esquistossomose é uma doença de notificação compulsória que necessita de medidas de prevenção e erradicação através do Programa de Enfretamento às Doenças Negligenciadas-SANAR (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011; PERNAMBUCO, 2018).

Figura 4 – Municípios pernambucanos distribuídos em GERES, considerados prioritários para esquistossomose em 2015.



Fonte: (PERNAMBUCO, 2018), adaptado.

Tabela 1 – Municípios prioritários por Região de Saúde entre 2015 e 2018.

<b>Geres</b>	<b>Municípios</b>
<b>I</b>	Araçoiaba, Moreno, São Lourenço da Mata e Vitória de Santo Antão
<b>II</b>	Carpina, Machados, Tracunhaém e Vicência
<b>III</b>	Água Preta, Escada, Gameleira, Jaqueira, Lagoa dos Gatos, Palmares, Primavera, Quipapá, Ribeirão, Rio Formoso, São Benedito do Sul, Sirinhaém e Xexéu
<b>V</b>	Brejão
<b>XII</b>	Aliança, Goiana, Itaquitinga e Timbaúba

Fonte: (PERNAMBUCO, 2018).

Por meio destes decretos tornou-se evidente a realidade pernambucana em relação a epidemiologia da esquistossomose mansônica, e foi possível observar melhorias significativa após a implantação do programa SANAR. Entre 2004 e 2014 a taxa de positividade para *S. mansoni* reduziu 17,6%. Em 2013, 103 municípios eram considerados prioritários, porém, nos últimos levantamentos, foram observados apenas 26 municípios na mesma classificação (COSTA et al., 2017; PERNAMBUCO, 2018). Entretanto, ainda está longe de erradicar a doença, pois os esforços realizados para combate e controle da esquistossomose não são suficientes sem medidas voltadas ao

saneamento básico, educação sanitária e ao tratamento de água, primordiais para o controle de infecções por *S. mansoni*.

## 2.2 *Schistosoma mansoni*

### 2.2.1 Aspectos morfológicos dos diferentes estágios evolutivos

Taxonomicamente, espécies de *Schistosoma* são platelmintos (vermes chatos), da classe trematoda, pertencentes a família Schistosomatidae, apresentando-se com dimorfismo sexual, ou seja, separação nítida entre vermes machos e fêmeas. A espécie *S. mansoni* habita no sistema porta e veias mesentéricas inferiores dos hospedeiros vertebrados (mamíferos), havendo várias formas evolutivas durante seu ciclo biológico, são elas: ovo, miracídio, esporocisto, cercária, esquistossômulo e vermes adultos (macho e fêmea) (REY, 2001; NEVES et al., 2011).

#### 2.2.1.1 Ovos

O ovo de *S. mansoni* é a forma evolutiva que permite a sobrevivência do parasito no meio ambiente, bem como, é o marcador utilizado para o diagnóstico coproparasitológico e histológico. Além disso, é o principal agente responsável pelo quadro inflamatório crônico em indivíduos parasitados, pois permanece retido nos órgãos e tecidos humanos (VITORINO e GOMES, 2011).

Em descrição estrutural, os ovos têm uma forma ovalado e apresentam tamanhos variáveis dependendo do seu estágio evolutivo, podendo chegar a 150 µm de comprimento por 60 µm de largura (Figura 6). Na parte externa, existe uma casca proteica porosa com uma série de micro espinhos e um espículo lateral saliente e agudo. Tal casca sofre adelgaçamento na sua espessura de acordo com a maturação para facilitar a entrada de nutrientes (DORSEY et al., 2002).

Na parte interna, é observado a membrana interna, o espaço granuloso entre a membrana e a casca (camada de Reynolds) e as células vitelínicas que dão origem aos miracídios. As membranas plasmáticas destas células vitelínicas entram em contato direto com a membrana interna do ovo no decorrer do processo de maturação, pois estas

células passam por modificações fisiológicas e morfológicas para o desenvolvimento adequado do miracídio (DORSEY et al., 2002; TEIXEIRA et al., 2008).

Os ovos podem ser eliminados no material fecal após 45 dias da infecção do indivíduo (Teixeira et al., 2008; Neves et al., 2011; MS, 2017). A expectativa de vida do ovo é de aproximadamente 20 dias, caso não haja eclosão durante esse período, devido à ausência de fatores ambientais e climáticos como luminosidade intensa, temperatura elevada e ambientes aquáticos, os miracídios vão à óbito em seu interior (NEVES, 2004).

Figura 5 – Ovo de *Schistosoma mansoni*. (M) Miracídio interiorizado e (EL) Espículo lateral evidente.



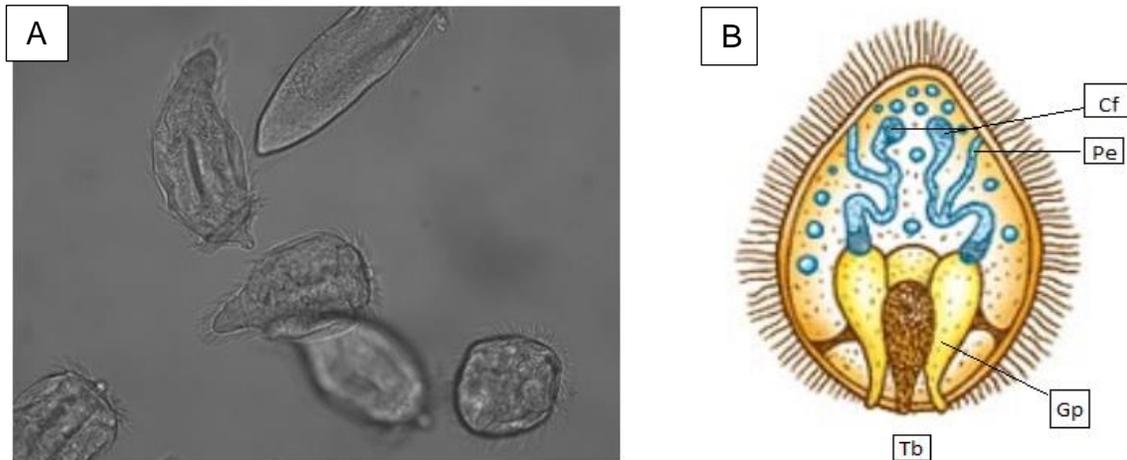
Fonte: Arquivo pessoal, 2020.

#### 2.2.1.2 Miracídios

Os miracídios apresentam forma cilindro-cônica em dimensões de 180  $\mu\text{m}$  de comprimento por 64  $\mu\text{m}$  de largura. A sua superfície é revestida por células epiteliais pavimentosas escamosas dotadas de inumeráveis cílios, que auxiliam na movimentação em ambientes aquáticos (Figura 6) (NEVES et al., 2011a).

Na extremidade anterior possui uma papila apical, ou *terebratorium*, representada por pregas no tegumento, não ciliadas e retráteis, que podem se moldar na forma de ventosa para facilitar a penetração nos moluscos. Além disso, na mesma região, existem terminações nervosas com funções táteis e sensoriais, e as glândulas adesivas e de penetração. A estrutura do corpo é composta por fibras musculares (NEVES et al., 2011a).

Figura 6 - Miracídio de *S. mansoni*: (a) exemplos de miracídio em microscopia de luz. (b) Miracídio com ênfase nas estruturas: Tb: *terebratorium*; Gp: glândulas de penetração; Pe: poro excretor; Cf: células flama.



Fonte: (LEVY, 2008).

Na extremidade posterior existem as células germinativas que darão continuidade ao ciclo de vida do *S. mansoni*. Além disto, possuem um sistema nervoso primitivo, responsável por sua contratilidade e motilidade; e um sistema excretor composto por quatro solenócitos, também conhecido como células flama, as quais se apresentam aos pares e estão ligadas a canalículos com terminação no poro excretor (Figura 6 b) (TEIXEIRA et al., 2008).

Acredita-se que esse estágio evolutivo não é capaz de obter alimento no ambiente e seu movimento ciliar é sensível a alta osmolaridade do meio aquático, portanto sua longevidade e infectividade dependem da sua reserva de glicogênio e das condições hídricas. Os miracídios podem sobreviver por cerca de 24 horas após sua eclosão. É válido ressaltar que o miracídio é um dos estágios evolutivos mais importantes no ciclo de vida do parasito, pois é o estágio infectante do caramujo, podendo todo ciclo ser interrompido caso esteja ineficiente a sua capacidade de localizar e penetrar os hospedeiros invertebrados apropriados (MS, 2014; WANG et al., 2019).

No processo de penetração no tecido do hospedeiro intermediário, o miracídio sofre alterações morfológicas, o qual perde suas estruturas internas resultando em uma

estrutura sacular contendo apenas as células germinativas conhecidas como esporocistos (REY, 2001;MS, 2017).

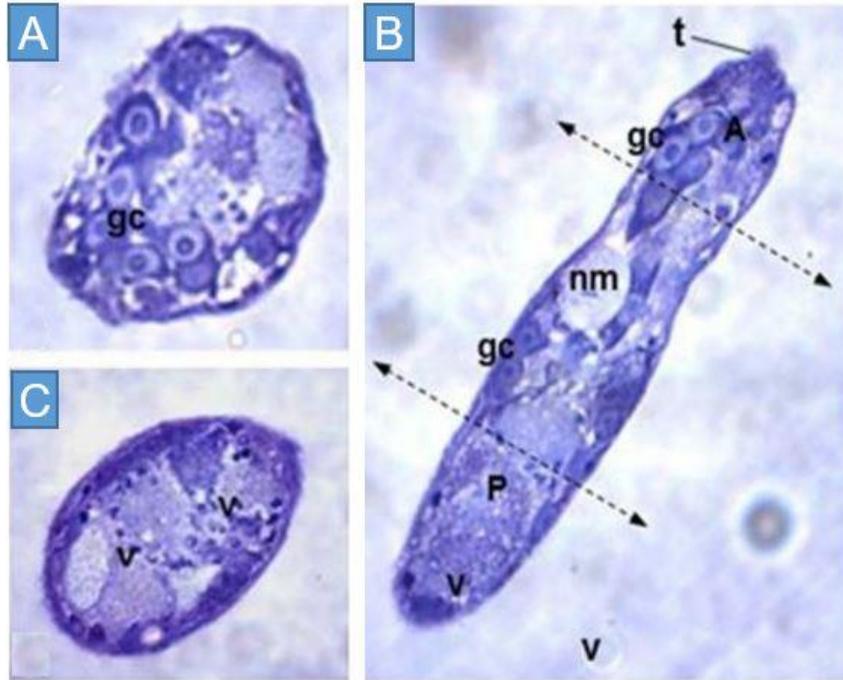
### 2.2.1.3 Esporocistos Primários e Secundários

Ao penetrar no interior do molusco, o miracídio permanece nos locais de penetração (tecidos moles dos caramujos) e é submetido a um novo ambiente com condições fisiológicas distintas. Em seguida, se inicia o processo de remodelação estrutural com a perda do seu revestimento epitelial ciliado, transformando seu corpo em uma estrutura sacular alongada ou ovalada (Figura 7 A, B e C) (MCMANUS et al., 2018).

No oitavo dia a estrutura sacular se transforma em um tubo enovelado, imóvel e cheio de células germinativas em constante multiplicação, passando a ser nomeado de esporocisto primário ou mãe. Sua superfície externa apresenta microvilosidades com uma camada eletrodensa, necessárias para troca metabólica com a hemolinfa e para interação com os hemócitos do molusco. O esporocisto não possui sistema digestivo, portanto todos os nutrientes necessários para evolução são absorvidos através do seu tegumento sincicial, rico em mitocôndrias, ribossomos, glicogênio, lipídio e envolto por corpos celulares situados na superfície (NEVES et al., 2011a; YOSHINO et al., 2017).

A troca de nutrientes auxilia na multiplicação das células germinativas contidas no interior do esporocisto mãe. Por volta da segunda semana de existência, as células germinativas medem cerca de 1,5 mm, se rompem e originam cerca de 40 esporocistos de segunda geração ou filhos. Estes, migram para o hepatopâncreas e ao ovotestis do molusco, onde permanecem crescendo. Nesta etapa os esporocistos medem 250 µm de comprimento, contém fibras musculares, *terebratorium*, sistema nervoso e protonefrídeos, além de possuir tegumento sincicial semelhante ao estágio anterior (MEULEMAN et al., 1980; REY, 2001).

Figura 7 – Esporocistos de *S. mansoni*: (a) Região posterior do esporocisto evidenciando as células germinativas (gc); (b) Esporocisto mostrando em seu interior a massa neural (nm), terebratorium (t) vesículas (v) e gc. As linhas delimitam as regiões anterior (A) e posterior (P); (c) região posterior evidenciando as vesículas.



Fonte: (NACIF-PIMENTA et al., 2012).

Para atingirem a maturação e formar as primeiras cercárias são necessárias quatro semanas (REY, 2001). Os esporocistos filhos maduros exibem na extremidade anterior uma protuberância móvel e um poro para eliminar as cercárias. Estudos relatam que depois da produção por certo tempo, os esporocistos secundários podem voltar a formar uma terceira geração de esporocisto, os quais podem retomar a produção e liberação de cercárias (NEVES et al., 2005; YOSHINO et al., 2017).

Saindo do esporocisto, as cercárias migram para hemocele que está envolta do hepatopâncreas e o ovotestis, seguindo pela corrente circulatória afim de alcançar regiões vascularizadas. A partir disso, formam minúsculas vesículas na superfície externa do caramujo, que, ao romperem, as vesículas saem para o exterior do hospedeiro invertebrado (MEULEMAN et al., 1980; REY, 2001).

#### 2.2.1.4 Cercárias

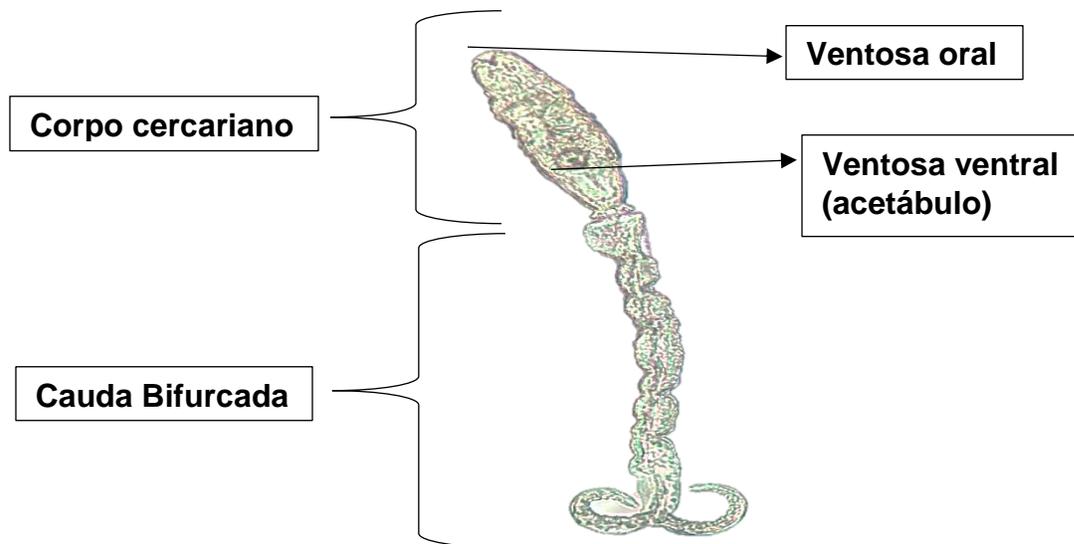
A cercária é um estágio evolutivo de vida livre, com vida útil de 24 a 48 horas cujo propósito é infectar um hospedeiro definitivo adequado. Esta forma infectante necessita de ambientes aquáticos para desempenhar sua função e sobreviver (MS, 2014) (Figura 8).

Morfologicamente, seu comprimento total é de 500  $\mu\text{m}$ , possui um corpo cercariano medindo 190 por 70  $\mu\text{m}$ , ligado a cauda bifurcada com 230 por 50  $\mu\text{m}$ . O corpo cercariano possui duas ventosas: oral, que apresentam terminações das glândulas de penetração e abertura para o intestino primitivo; e ventral, ou acetábulo, o qual fixa-se na pele do hospedeiro durante o processo de penetração (NEVES et al., 2011a).

O tegumento sincicial da cercária é semelhante aos vermes adultos, jovens e esquistossômulos. Além disso, exibem uma membrana heptalaminar, envolvida por duas camadas lipídicas sobreposta a uma região denominada membrano cálice (KRAUTZ-PETERSON et al., 2007). Na superfície são observados poros e fissuras utilizados para rotas de absorção de glicose, aminoácidos e outros nutrientes, bem como a excreção de metabólitos como por exemplo o ácido láctico (CAMACHO e AGNEW, 1995; DORSEY et al., 2002).

A cauda bifurcada apresenta uma camada muscular longitudinal e circular no tegumento do corpo, sendo possível observar também duas ou três miofibrilas na camada longitudinal (DORSEY et al., 2002; TEIXEIRA et al., 2008). Esta estrutura é responsável pela mobilidade em água e penetração na pele do hospedeiro definitivo, sendo perdida após entrada do corpo cercariano (NEVES et al., 2011a).

Figura 8 – Cercária de *Schistosoma mansoni*.



Fonte: Arquivo pessoal, 2020.

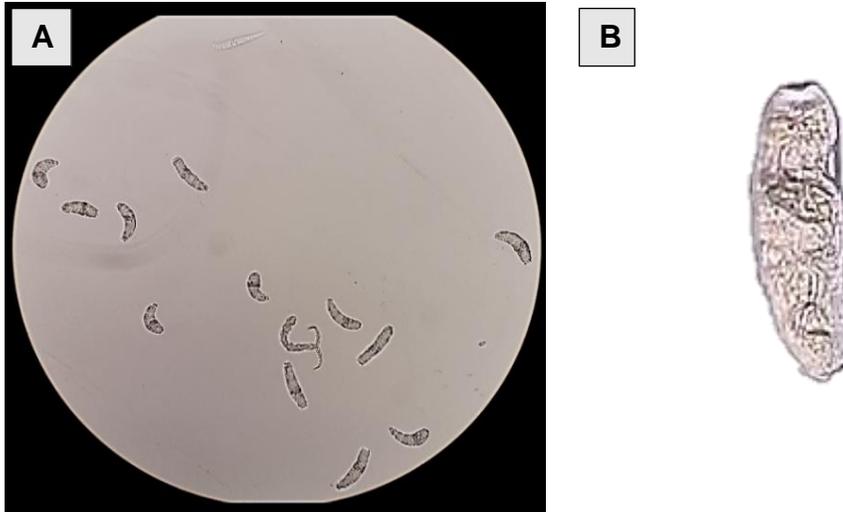
#### 2.2.1.5 Esquistossômulos

Após a penetração da cercária na pele do hospedeiro definitivo (homem), o corpo cercariano é submetido a novas condições ambientais fornecidas pelo corpo humano. Tais condições induzem alterações bioquímica, anatômica e fisiológicas, como: modificação do glicocálice, troca do tipo de respiração para anaeróbica, resistência ao sistema complemento do indivíduo, formação de microvilosidades no tegumento e troca a membrana trilaminar para heptalaminar (STIREWALT, 1974; WILSON, 2012). A partir disso, o corpo cercariano se transforma em um novo estágio evolutivo, chamado de esquistossômulos de pele (Figura 9 A e B).

Os esquistossômulos de pele ficam retidos na derme por 4 dias, podendo ser neutralizados pelo sistema imunológico do hospedeiro. Caso não sofra ações do sistema imunológico, eles ganham acesso a circulação sanguínea, e são levados ao coração e pulmão (esquistossômulos pulmonares). Após 10 dias de infecção, os esquistossômulos pulmonares se reorganizam fisiologicamente e adquirem um aspecto vermiforme. A partir

desse momento, acontece a migração para o sistema porta hepático, local em que alcança amadurecimento em vermes jovens (REY, 2001; TEIXEIRA et al., 2008).

Figura 9 – Esquistossômulo de *Schistosoma mansoni*: (a) esquistossômulos em aumento de 200X; (b) esquistossômulo em aumento de 400X. Ambos sob microscopia óptica invertida.

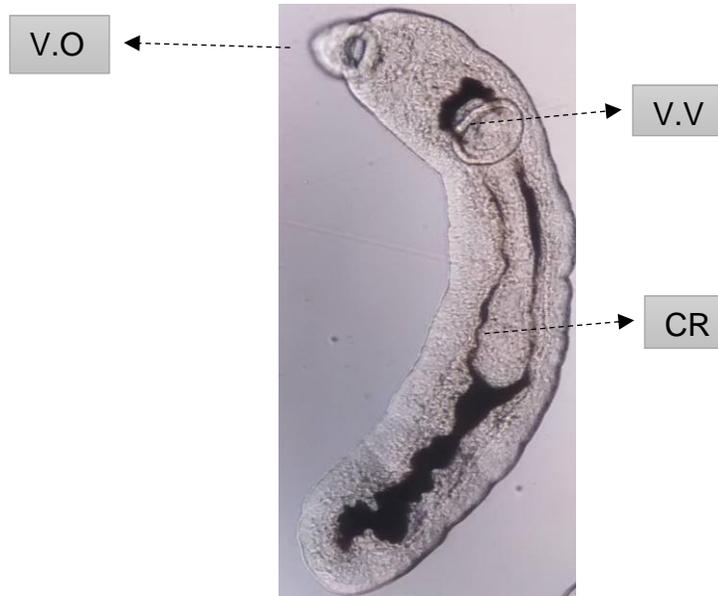


Fonte: Arquivo pessoal, 2020.

#### 2.2.1.6 Vermes Jovens

Cerca de 21 dias após a infecção, os esquistossômulos pulmonares se transformam em vermes jovens. Estes, apesar de habitarem os vasos do sistema porta intra-hepático e apresentarem aspecto vermiforme semelhante aos vermes adultos, ainda estão com seus sistemas biológicos imaturos (NEVES et al., 2011a). Morfologicamente, são vermes que possuem na região anterior duas ventosas: oral e ventral/acetábulo. Seu sistema digestivo inicia na boca, próximo a ventosa oral, seguido pelo esôfago e posteriormente existe um ceco ramificado. Os órgãos sexuais não estão totalmente desenvolvidos nem evidentes. Os machos apresentam dois lobos testiculares e uma curvatura dorsoventral no corpo, enquanto as fêmeas têm o útero rudimentar (Figura 10) (TEIXEIRA et al., 2008).

Figura 10 – Verme jovem (21 dias) de *Schistosoma mansoni*. Ventosa oral (V.O.); ventosa ventral (V.V); Ceco ramificado (C.R).

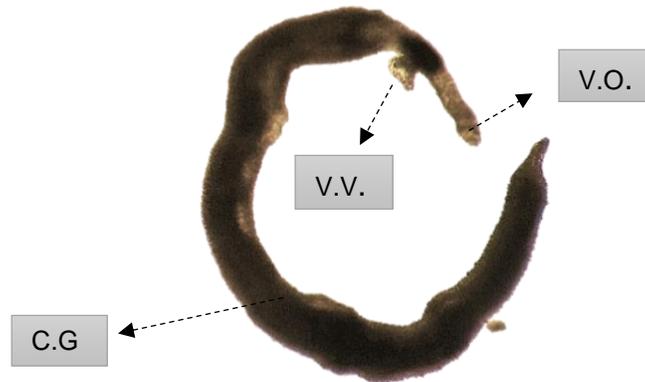


Fonte:(SANTOS, 2018)

#### 2.2.1.7 Vermes Adultos

Diferente da maioria dos trematódeos, o parasito *S. mansoni* apresenta dimorfismo sexual. O verme adulto macho mede cerca de 1 cm, apresenta cor esbranquiçada e são recobertos por minúsculas projeções denominadas de tubérculos (Figura 11). Na região anterior, que é cilíndrica, estão presentes duas ventosas, a oral e ventral, sendo a última também conhecida como acetábulo. Na região posterior, vista como plana, existe o canal ginecóforo; são dobras laterais no corpo com sentido longitudinal que tem função de albergar e fecundar a fêmea. Após as ventosas orais existe o esôfago e o ceco único que terminará na extremidade posterior. O órgão sexual masculino é localizado atrás do acetábulo e do canal ginecóforo, onde é liberado o conteúdo espermático que entra em contato com os vermes adultos fêmeas (HAN et al., 2009; NEVES et al., 2011a).

Figura 11 – Verme adulto macho de *Schistosoma mansoni*. Ventosa oral (V.O.), ventosa ventral (V.V.) e canal ginecóforo (C.G.).

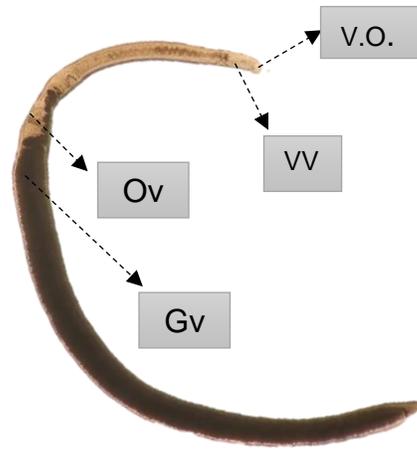


Fonte: Arquivo pessoal, 2020.

Os vermes adultos fêmeas são maiores que os machos, medindo cerca de 1,5 cm. Seu tegumento é liso e transparente, entretanto, visualmente, a coloração do verme é enegrecida, pois o tegumento permite visualizar as cores obtidas no processo de digestão do sangue no ceco (hemozoína) (Figura 12) (Neves et al., 2011; XIAO e SUN, 2017). Sua estrutura também é estudada em duas metades: anterior e posterior, na anterior são observadas ventosa oral e acetábulo, sendo seguidos a eles: vulva, útero e ovário. A metade posterior é preenchida pelas glândulas vitelinas e o sistema digestivo similar ao verme macho (TEIXEIRA et al., 2008; NEVES et al., 2011; PEREIRA et al., 2012).

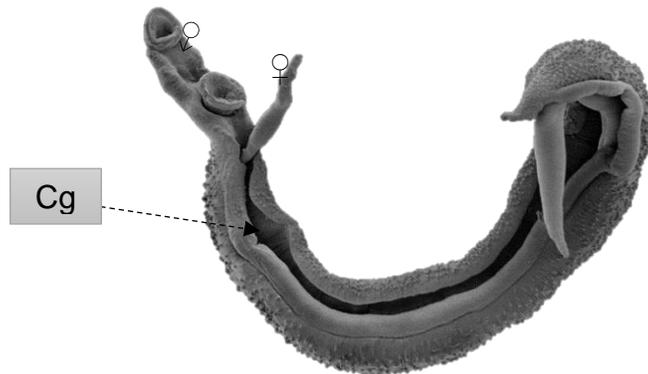
Os vermes adultos machos e fêmeas geralmente apresentam-se acasalados no sistema porta e veias mesentéricas inferiores (Figura 13) (NEVES et al., 2011a). As fêmeas necessitam do processo de acasalamento para completar sua maturação e assim, conseguir ovipor e seguir o ciclo de vida do parasito.

Figura 12 – Fêmea de *Schistosoma mansoni*. Ventosa oral (V.O.), ventosa ventral (V.V.), ovário (Ov). Glândulas vitelínicas (Gv).



Fonte: Arquivo pessoal, 2020.

Figura 13 – Casal de *Schistosoma mansoni*. (Cg) Canal ginecóforo.



Fonte: Adaptado de MCKEEVER, 2016.

### 2.2.2 Ciclo biológico

O *S. mansoni* apresenta um ciclo biológico do tipo heteroxênico, ou seja, necessita de passagens sucessivas entre hospedeiros intermediários (caramujos do gênero *Biomphalaria*) e hospedeiros definitivos (humanos ou alguns mamíferos). O meio aquático é um ambiente obrigatório no processo de evolução de *S. mansoni*, sendo o local onde as formas infectantes, cercárias e miracídios, alcançam os hospedeiros definitivos e intermediários, respectivamente (COLLEY et al., 2014).

Quando fezes contendo ovos maduros de *S. mansoni* entram em contato com coleções aquáticas, sob temperatura de aproximadamente 28°C, luminosidade intensa e boa oxigenação, ocorre a eclosão do miracídio. Este, é uma larva ciliada de vida livre capaz de nadar em direção ao hospedeiro intermediário a partir da sua sensibilidade ao conteúdo liberado pelo caramujo junto ao muco e se aderir por meio das zonas apicais adesivas. Tal interação medeia a liberação de conteúdo proteolítico contido nas glândulas de penetração do miracídio e, ao mesmo tempo, os cílios realizam movimentos rotatórios e contráteis para transpassar as partes moles do caramujo (Teixeira, 2008). Este processo ocorre por, em média, 15 minutos. Dentro do caramujo as glândulas de adesão e o epitélio ciliado são perdidos, ocorre degeneração do *terebratorium* e a musculatura subepitelial desaparece. Assim, os miracídios são transformados em um saco contendo massas germinativas, conhecido como esporocistos primários (NEVES et al., 2011; COLLEY et al., 2014).

Os esporocistos passam por um processo de multiplicação intensa com consequente aumento na complexidade estrutural e no tamanho, dando origem aos chamados esporocistos secundários. Estes, percorrem no corpo do molusco até as glândulas digestivas e, em seguida, formam as cercárias. Um único miracídio é capaz de produzir cerca de 300 mil cercárias, cada uma com o sexo pré-definido (REY, 2001; NEVES et al., 2011).

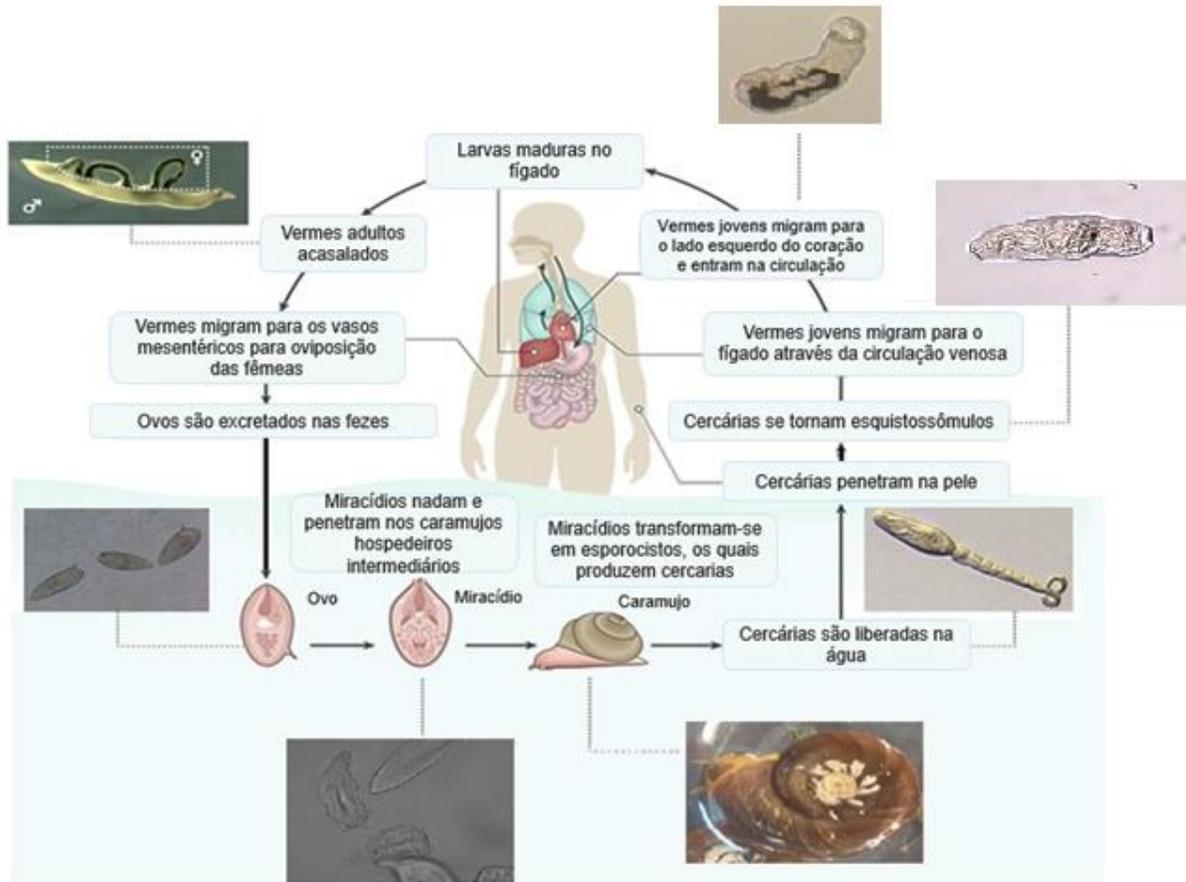
A liberação cercariana acontece após um mês da infecção do caramujo, preferencialmente em horários mais luminosos e quentes do dia (DORSEY et al., 2002). Com o auxílio da cauda, as cercárias ganham mobilidade no ambiente aquático e, quando entram em contato com um indivíduo, penetram em sua pele a partir de movimentos enérgicos da cauda e da liberação de enzimas proteolíticas localizadas em sua cabeça, com intuito de facilitar a abertura de espaços na região cutânea. Durante esse processo a cauda é perdida. É válido ressaltar que a penetração das cercárias ocorrem ao acaso, ou seja, as cercárias podem penetrar na pele de qualquer animal, mas não ser capaz de desenvolver o ciclo do parasito (DORSEY et al., 2002; MS, 2014).

Nos tecidos, as cercárias passam a ser nomeadas de esquistossômulos devido as notáveis alterações bioquímicas e fisiológicas a fim de adaptar-se ao novo ambiente (SKELLY e WILSON, 2006; TEIXEIRA et al., 2008). Os esquistossômulos ganham as

correntes linfática e/ou sanguínea, sendo levados ao pulmão por volta do 9º dia de infecção. Logo após, seguem para o sistema porta por meio do fluxo sanguíneo, passando pelo coração esquerdo, artéria aorta e alcançam o fígado. Nos vasos intra-hepáticos, as formas mais jovens se alimentam de sangue e alcançam à maturação se transformando em vermes adultos machos e fêmeas (SKELLY; WILSON, 2006; BRACHS e HAAS, 2008; HAEBERLEIN e HAAS, 2008; MCMANUS et al., 2018).

Os vermes adultos acasalam e juntos migram contra a corrente sanguínea para as veias mesentéricas inferiores, próximo ao plexo hemorroidário. A postura de ovos é iniciada em torno do 35º dia após a infecção. A quantidade de ovos produzidos e expelidos está relacionada a idade do verme. A vida média dos vermes adultos fêmeas é de 5 anos, sendo até o segundo ano expelidos na submucosa intestinal cerca de 400 ovos diariamente (NEVES et al., 2011; MS, 2017b; MCMANUS et al., 2018). O espículo lateral do ovo se adere ao local da oviposição, uma reação inflamatória é gerada ao liberar o Antígeno Solúvel do Ovo (ASO) e há adelgaçamento da parede do vaso mediada pelos vermes. Estes fatores facilitam a migração dos ovos para a luz intestinal no período de 7 dias, um intervalo necessário para maturação dos ovos em seus diferentes estádios (VITORINO e GOMES, 2011). É válido ressaltar que nem todos os ovos conseguem migrar para luz intestinal, cerca de 50% deles ficam retidos nos tecidos causando respostas inflamatórias do tipo granulomatosa, responsável pelas sintomatologias da doença (SCHWARTZ e FALLON, 2018). A partir de 42 dias de infecção os ovos maduros contendo os miracídios são liberados nas fezes do homem (Figura 14) (MCMANUS et al., 2018).

Figura 14 – Ciclo biológico do *Schistosoma mansoni*.



Fonte: (MCMANUS et al., 2018; O Autor, 2020), adaptado.

### 2.2.3 Patogenia

A esquistossomose mansônica é uma doença com múltiplos mecanismos lesivos baseados na resposta imunológica do hospedeiro definitivo contra os ovos expelidos pelos vermes adultos fêmeas (MCMANUS et al., 2018). Entretanto, a cepa do parasito, a idade e o estado nutricional do indivíduo e a carga parasitária são fatores determinantes na forma de manifestação clínica e laboratorial (MS, 2017b).

A progressão da doença pode ser dividida em duas fases: aguda e crônica. A fase aguda ocorre em média até 120 dias após a infecção, muitas vezes assintomática, é caracterizada desde a penetração cercariana, quando a permanência dos

esquistossômulos na pele gera uma reação inflamatória visualizada como erupção prurídica maculopapular, também denominada dermatite cercariana (Figura 15) (NEVES et al., 2011a). A dermatite cercariana desencadeada por polimorfonucleares e mononucleares presentes no tecido, sendo considerada a primeira forma de defesa contra os vermes, tendo como objetivo de diminuir a carga parasitária no organismo (MCMANUS et al., 2018). Essas regiões lesivas eritematosas apresentam tamanho de 1-3 cm e podem ser notadas a partir de 1 hora após a exposição do indivíduo às cercárias (BULANTOVÁ et al., 2018).

Figura 15 – Dermatite cercariana no antebraço de indivíduo infectado por *Schistosoma*.



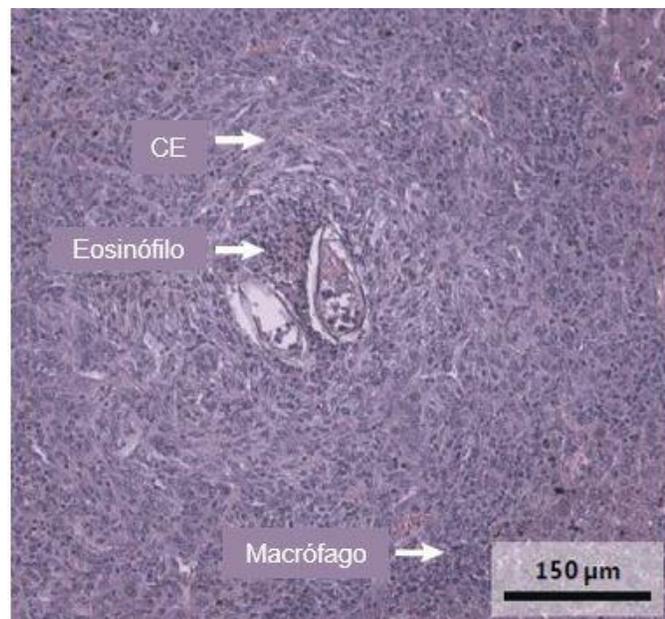
Fonte: (KOLÁŘOVÁ et al., 2013).

Os esquistossômulos remanescentes às citocinas e quimiocinas liberadas pelo sistema imunológico transmigração pela corrente sanguínea com intuito de se desenvolver, e neste processo pode ocorrer manifestações clínicas, como: febre, linfadenia generalizada, mal-estar, cefaleia, diarreia, dores musculares, desconforto abdominal, problemas pulmonares; podendo chegar a uma hepatite aguda (LANGENBERG et al., 2019; MCMANUS et al., 2018). A maioria dos pacientes conseguem se recuperar das manifestações clínicas após 2 a 10 semanas, enquanto outros podem permanecer doentes, até chegar à fase crônica (LANGENBERG et al.,

2019). Os sintomas observados nesta fase da esquistossomose são inespecíficos, não sendo possível o diagnóstico apenas com exames clínicos.

Passados 120 dias da infecção primária, a fase crônica da esquistossomose é estabelecida (VIASUS; PEDRO-; ALCA, 2017). Os miracídios contidos nos ovos depositados nos tecidos e órgãos dos indivíduos parasitados, secretam grandes quantidades de glicoproteínas antigênicas, com consequente modulação na resposta inflamatória e recrutamento exacerbado de macrófagos, eosinófilos, polimorfonucleares e mononucleares ao redor dos ovos, formando os granulomas (Figura 16) (HOFFMANN et. al., 2002; SCHWARTZ e FALLON, 2018).

Figura 16 – Granuloma de *Schistosoma mansoni*.



Fonte: (MCMANUS et al., 2018)

Apesar de muitos ovos alcançarem o ambiente externo para continuar o ciclo biológico do parasito, grande parte destes permanecem retidos no fígado, intestino e baço dos indivíduos parasitados (SILVA, 2008; VITORINO e GOMES, 2011). Os granulomas são capazes de matar os ovos e induzir um processo de reparo, fibrose e até calcificação a depender do tempo. Os tecidos com a presença dos granulomas e áreas fibróticas passam por desregulações e suas funções são alteradas (HAMS et al., 2013).

A perda gradual da arquitetura do fígado e prevalência de tecido fibrótico, compromete os componentes hemodinâmicos resultando em fibrose periportal e hipertensão porta (MCMANUS et al., 2018). Este aumento de pressão pode desencadear um quadro de esplenomegalia congestiva, hepatomegalia, varizes gástricas e esofagianas, hemorragias e ascite (Figura 17 A e B) (CHUAH et al., 2014). Essas manifestações clínicas configuram a nomeada barriga d'água, terminologia muito utilizada no Brasil, para infecções causadas por *S. mansoni* (MS, 2017b).

Também são visualizadas alterações intensas no intestino. Os granulomas podem ser isolados ou múltiplos, com ou sem fibrose, podendo apresentar até regiões de calcificação. Essas modificações causam quadros de enterocolite, desnutrição, diarreia mucossanguinolenta e constipação (VITORINO e GOMES, 2011).

Figura 17 – Hepatoesplenomegalia.(a) vista frontal; (b) vista lateral.



Fonte: (MCMANUS et al., 2018).

Assim, a morbidade gerada pela esquistossomose reduz significativamente a qualidade de vida dos indivíduos, calculado pelos anos de vida perdidos (DAYLS- Disability Adjusted Life Years), estimada em 4,4. Para reduzir esses quadros mórbidos são necessárias intervenções terapêuticas e cuidados paliativos para gerar melhor qualidade de vida aos indivíduos parasitados (WHO, 2018).

#### 2.2.4 Tratamento

Atualmente o tratamento da esquistossomose está bem estabelecido através do uso do Praziquantel (PZQ), porém não era essa a realidade há alguns anos. Até os anos 90, as estratégias de combate à esquistossomose eram voltadas a: (1) eliminação do caramujo transmissor por meio do composto niclosamida; e (2) utilização de medicamentos à base de antimônio, lucatone e tioxatenos, fármacos nocivos aos sistemas biológicos humanos. Dessa forma, o tratamento se tornava limitado e inviável, devido aos seus efeitos adversos (SILVA et al., 2017).

Dentre os medicamentos que caíram em desuso, a Oxaquiminiquine (Oxa), um derivado do 2-aminometil-1,2,3,4- tetrahydroquinolina, demonstrou uma atividade promissora contra *S. mansoni* (PFIZER, 2013). A sua utilização por via oral o tornou indicado para o tratamento da esquistossomose mansônica. Além disso, a Oxa tem boa eficácia e efeitos colaterais mais brandos que os fármacos antecessores. Entretanto, embora possua melhor atividade em doses mais baixas que o PZQ sobre *S. mansoni*, as demais espécies do gênero *Schistosoma* não demonstraram a mesma susceptibilidade (RUGEL et al., 2020). Assim, a fabricação de Oxa foi reduzida e paralelamente o PZQ passou a ser produzido em larga escala, se tornando o fármaco indicado pela Organização Mundial da Saúde para o controle e tratamento da esquistossomose humana (SILVA et al., 2017; WHO, 2018).

É válido ressaltar que o tratamento da esquistossomose está diretamente relacionado ao controle de morbidade, mortalidade, transmissão da doença e do ciclo evolutivo de *Schistosoma* (MCMANUS et al., 2018). Assim, apenas o uso de quimioterápicos não é suficiente para diminuir a prevalência da doença. Ações conjuntas aos órgãos governamentais são essenciais para erradicar fatores de risco a população (PERNAMBUCO, 2018).

#### 2.2.4.1 Praziquantel (PZQ)

O Praziquantel (PZQ) é um medicamento de uso oral que está desde 1972 no mercado farmacêutico, atuando de forma eficaz sob infecções de trematódeos e cestóides que acometem humanos e animais, inclusive em afecções causadas por trematódeos do gênero *Schistosoma* (BORREGO-SÁNCHEZ et al., 2017).

Quimicamente, é um derivado quinolona descrito estruturalmente como: 2-(ciclohexilcarbonil)-1,2,3,6,7,11 $\beta$ -hexahidro-4H-pirazino[1,2 $\alpha$ ] isoquinolina-4-ona. É um pó cristalino, sem cheiro, de sabor amargo e com boa estabilidade a variação de temperatura, quando armazenado em condições adequadas (VALE et al., 2017). Apresenta fotossensibilidade e baixa solubilidade em água. Apesar disso, tem boa habilidade em permeabilizar tecidos, sendo categorizado como classe II no Sistema de Classificação Biofarmacêutica, sistema que avalia a distribuição e biodisponibilidade de fármacos a partir da solubilidade e permeabilidade (CRUZ, 2016).

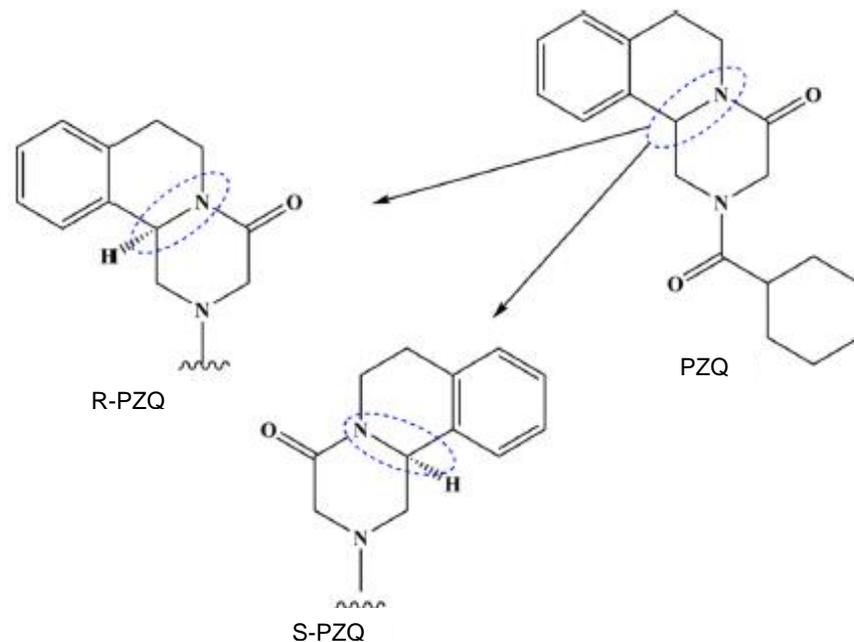
Atualmente, o PZQ é comercializado como uma mistura racêmica de enantiômeros com proporções iguais de levógiro e dextrógiros, considerados biologicamente ativo e inativo, respectivamente (Figura 18) (OLLIARO et al., 2014). Isso requer comprimidos com formulação de 600 mg, para obter uma dose final de 40 mg/kg. Tal mistura se faz necessária devido ao sabor desagradável do levógiro-PZQ puro (MEYER et al., 2009). Dessa forma, apesar do dextrógiro-PZQ não possuir relatos de atividade farmacológicas frente as infecções helmínticas, ele confere melhor sabor ao medicamento e facilita sua administração oral (KOVAC et al., 2017; VALE et al., 2017).

Após administração, o PZQ é rapidamente absorvido e entra na corrente sanguínea, onde se liga às proteínas plasmáticas e sofre metabolismo de primeira passagem. O pico de ação ocorre entre 2 e 3 horas, e sua meia vida varia entre 2 e 9 horas. Em relação a eliminação, cerca de 80% do PZQ administrado é eliminado nas primeiras 24 horas, através dos rins e intestino (DOMLING e KHOURY, 2010).

Além disso, o PZQ é considerado um fármaco de baixo custo e seguro, pois não demonstrou potencial genotóxico em testes de mutagenicidade e a avaliação de toxicidade aguda não demonstrou danos em doses de até 1000 mg/kg durante 4 semanas

(CHAIRMAN et al., 1991; DOMLING; KHOURY, 2010; HONG, 2018). Acerca dos seus efeitos colaterais, são considerados brandos e transitórios, ou geralmente ausentes. Em casos mais graves, são notados quadros de melena, dor abdominal e cefaléia, estando estes casos relacionados à carga parasitária do indivíduo (VALE et al., 2017).

Figura 18 – Estrutura do Praziquantel e de seus enantiômeros levógiro e dextrógiro



Fonte: (VALE et al., 2017).

Resumidamente, a principal via de atuação do PZQ está relacionada ao influxo de íons  $\text{Ca}^{2+}$  no *Schistosoma*, desregulação na bomba  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$ , indução da contração muscular do verme, liberação de neurotransmissores e lesões tegumentares como bolhas e rupturas (CRUZ, 2016; VALE et al., 2017).

O influxo de cálcio citosólico é a ação mais conhecida e estudada, entretanto ainda não existem comprovações acerca de como, de fato, o PZQ altera a homeostasia do helminto. A principal hipótese é que o PZQ atua em canais de cálcios dependentes de voltagens, favorecendo seu influxo e todas as demais alterações citadas (SALVADOR-RECATALÀ et al., 2008; PARK et al., 2019).

Embora o mecanismo de ação do PZQ ainda não esteja elucidado, seu amplo espectro sob todas as espécies de *Schistosoma* o tornou a alternativa quimioterápica recomendada pela Organização Mundial de Saúde (OMS) para o tratamento e controle da esquistossomose. Entretanto, o PZQ não é um fármaco ideal, pois não apresenta potencial esquistossomicida frente a vermes jovens de *Schistosoma* (JO et al., 2019). E, vermes adultos fêmeas têm apresentado maior tolerância quando expostas ao fármaco *in vitro* (MENDONÇA et al., 2016). Assim, uma única administração não garante a cura do indivíduo parasitado, visto que estágios evolutivos imaturos do parasito continuam maturando no hospedeiro, mesmo após a administração padrão do PZQ (LAGO et al., 2017).

A OMS baseia-se no PZQ para desenvolver e aplicar estratégias de combate a esquistossomose. Tais ações ocorrem por meio de tratamentos em massa, sem diagnóstico prévio da população alvo (WHO, 2019). Estudos mostram que essas medidas podem diminuir novas infecções e a necessidade de mais tratamentos futuros (MONTRESOR et al., 2017; SCHULZ et al., 2018).

Em 2010, 52 países necessitaram da utilização de tratamento preventivo em massa para esquistossomose, sendo 35 milhões de pessoas beneficiadas com o PZQ. Destas, 83 % eram oriundas da África Subsaariana (WHO, 2018). Em 2015, mais de 66,5 milhões de indivíduos foram submetidos ao mesmo tipo de tratamento preventivo (WHO, 2017). Recentemente, em 2018, cerca de 256 milhões de pessoas receberam tratamento adequado, sendo distribuídos mais de 650 milhões de comprimidos de PZQ. Com essa estratégia, a OMS conseguiu obter >75% de cobertura, principalmente na África e Américas, consideradas as regiões mais endêmicas do mundo (WHO, 2019) .

Apesar do PZQ apresentar taxa de cura parasitológica entre 80% e 90%, as taxas de reinfecções em regiões endêmica são muito altas, visto que não existem vacinas contra o parasito e o medicamento não induz respostas imunológicas de memória (BERGQUIST et al., 2017).

Assim, cepas de *Schistosoma* provenientes destas regiões, estão sob constantes pressão, possibilitando o surgimento iminente de cepas de *Schistosoma* resistentes e/ou tolerantes (CIOLI et al., 2004). Tal resistência tem sido descrita em cepas cultivadas em laboratório, em que foi observado, *in vitro*, a existência de cepas isoladas com doses

efetivas 50 (DE50) três vezes maior que o valor de DE50 de cepas susceptíveis (COUTO et al., 2011).

Outro relato foi descrito no Delta do Nilo, onde Ismail e colaboradores analisaram a susceptibilidade de cepas de *S. mansoni* que afetava aldeões. Nesse estudo, os indivíduos infectados receberam até três tratamentos consecutivos de PZQ, a 40 mg/kg, sendo a última dose de 60 mg/kg. Após isso, 1,6% dos indivíduos tratados apresentaram ovos viáveis nas fezes. Recuperando o ciclo evolutivo dessa cepa em laboratório, foi observado que 80% dos animais infectados foram capazes de eliminar ovos viáveis. Os vermes recuperados foram susceptíveis ao PZQ, mas com uma EC50 duas a cinco vezes maior que a obtida com vermes controles susceptíveis. Passados nove anos nova investigação foi realizada, mas não foi encontrado evidências de cepas resistentes, mesmo havendo uso do PZQ no intervalo de tempo entre os estudos (Ismail et al., 1996; BOTROS et al., 2005).

No norte do Senegal o acompanhamento parasitológico após um surto de esquistossomose mansônica, registrou taxas de cura entre 18 e 37% após utilização de PZQ em doses de 40mg/kg. Novamente, a população local foi submetida a uma nova exposição ao tratamento, e como resultado, não foi visualizada uma melhora significativa nos dados descritos anteriormente (BOTROS et al., 2007).

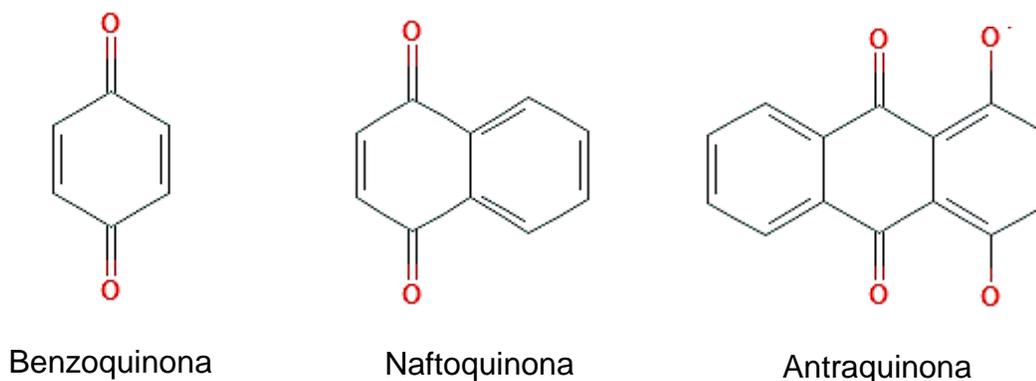
Dessa forma fica evidente que existe uma tendência de cepas de *Schistosoma* não responder ao tratamento com PZQ. Nesse sentido, torna-se imperativo a busca por novos fármacos esquistossomicida.

### 2.3 JUGLONA

Quinonas são compostos orgânicos geralmente semivoláteis amplamente encontradas na natureza. Em descrição estrutural, tais moléculas apresentam dois grupamentos carbonilas em um anel insaturado de seis átomos de carbono, dispostos na posição 1,2 (*orto*-quinona) ou 1,4 (*para*-quinona). Através do tipo de estrutura aromática que contém o anel quinonóide, as quinonas podem ser categorizadas como: benzoquinonas quando possuem benzeno na sua estrutura; naftoquinonas as que possuem um anel naftalênico; e antraquinona as que têm um anel antracênico (Figura

19) (SOUSA et al., 2016). A diferença estrutural entre essas categorias confere aos compostos propriedades físicas e químicas distintas, refletindo em sua atividade biológica (BOLTON e DUNLAP, 2017).

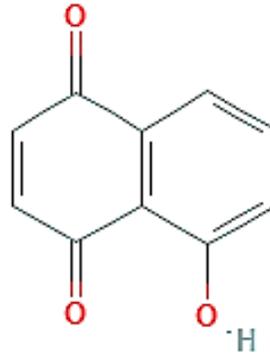
Figura 19 – Estrutura dos tipos de Quinonas.



Fonte: Pubchem, 2020.

A juglona é uma naftoquinona de ocorrência natural que tem sido amplamente estudada devido sua importância nas pesquisas biológicas e medicinais (MARYON et al., 2012). Juglona é um composto de cor âmbar, sólida, com baixa solubilidade em água e com boa resistência a variação de temperatura. Sua estrutura é descrita como 5-hidroxy-1,4-naftoquinona (Figura 20), abundantemente extraída de caules, folhas e sementes de diferentes estágios evolutivos de plantas das espécies *Juglans nigra L.*, *Juglans regia L.*, *Juglans cinerea L.*, *Juglans sieboldiana L.*, pertencentes a família Juglandaceae (STRUGSTAD et al., 2012). Dentre estas espécies de plantas, *Juglans nigra*, é a mais utilizada na extração da juglona, pois apresenta maior quantidade do composto em suas partes anatômicas (MARYON et al., 2012).

Figura 20 - Estrutura da Juglona.



Fonte: Pubchem, 2020.

Na medicina tradicional, a juglona desempenha papel curativo e/ou paliativo em algumas enfermidades, por apresentar propriedades antibacteriana (KONG et al., 2008), anti-inflamatória (LANDA et al., 2012), anti-hipertensiva (AHMAD et al., 2019), sedativa (STRUGSTAD et al., 2012) e dentre outras. Todavia, seu mecanismo de ação ainda não foi bem elucidado. Entretanto, é conhecida a capacidade antioxidante e oxidante desta naftoquinona, fazendo dela uma molécula controversa, capaz de gerar proteção ao sistema biológico e ao mesmo tempo, a depender da dose, causar lesões (AHMAD e SUZUKI, 2019).

A estrutura fenólica da juglona confere um potencial antioxidante por meio de inibição de enzimas responsáveis pela geração de espécies reativas de oxigênio, quelação de metais de transição (Fe e Cu) e doação de hidrogênio (AHMAD e SUZUKI, 2019). Esta ação se demonstra útil em doenças causadas pelo estresse oxidativo, como é o caso do Alzheimer (GALAS et al., 2006). A juglona evita a desfosforilação da proteína Tau diminuindo a neurodegeneração, por meio de inibição da enzima peptidil-prolil *cis/trans* isomerases (PPIase) (KESAVAPANY et al., 2007). A PPIase é um grupo de enzimas responsáveis pela regulação da fosforilação de proteínas e da regulação de sinalização celular envolvidas no sistema imune, câncer, artrite reumatoide, fibrose cardíaca e entre outros (JORDENS et al., 2006).

O efeito protetivo da juglona também está relacionado a capacidade da juglona protonada quelar o Ferro e Cobre, formando complexos que impedem a participação

desses metais na formação de EROS (DIDIER et al., 2016). Associado a isto, estudos afirmam que a juglona é capaz de aumentar a atividade da enzima super óxido dismutase (SOD), diminuir os níveis de alanina amino-transferase, aspartato amino-transferase, ácido hialurônico, laminina, procolágeno tipo III e colágeno tipo IV e os níveis de expressão de  $\alpha$  actina do músculo liso e colágeno III no fígado (ZHOU et al., 2015). Também diminuindo a fibrose renal inibindo a fosforilação de Smad2 (REESE et al., 2010).

Além disso, a juglona e outras naftoquinonas conseguem modular o ciclo redox, utilizado também nas terapias contra cânceres e infecções humanas (STRUGSTAD e DESPOTOVSKI, 2012). A juglona pode ser catalisada pelas enzimas NADPH citocromo P-450 redutase, NADPH citocromo b5 ou NADPH ubiquinona oxirredutase, responsáveis pela redução de um elétron com subsequente formação do radical semiquinona ou hidroquinona (LANDA et al., 2012). A espécie reduzida, semiquinona, sofre fácil oxidação por meio de transferência de um elétron para uma molécula aceptora, levando a formação de espécies bioativas reativas ao oxigênio ( $O_2^- \bullet$ ,  $HO^- \bullet$ ,  $1O_2$  e  $H_2O_2$ ) (AHMAD; SUZUKI, 2019). O ânion superóxido também é capaz de reagir com outras estruturas da célula, como por exemplo o metal de transição  $Fe^{2+}$ , que por catálise ou através de reação com peróxido de hidrogênio geram radicais hidroxilas dentro da célula. Assim, os níveis aumentados dos radicais citados, inativam enzimas, causam danos na membrana celular, peroxidação lipídica, desnaturação de proteínas e quebras de fita de DNA, podendo levar à morte celular (VERMA, 2006; KIRAN AITHAL et al., 2009; SAJADIMAJD et al., 2015).

A toxicidade da juglona também se baseia no esgotamento de glutathiona (GSH), um potente agente antioxidante endógeno (KIRAN AITHAL et al., 2009). A juglona pode reagir com nucleófilos por meio da reação de adição de Michael. Tal reação, reduz o grupo tiol da glutathiona que favorece a reação de arilação, responsável por aumentar a toxicidade celular e diminuir a quantidade de glutathiona reduzida, e assim há processo de estresse oxidativo (WANG et al., 2006).

Diferentes estudos demonstram a atividade citotóxica do composto juglona para diferentes linhagens de células cancerígenas, de modo que foi considerada promissora como agente antitumoral (VERMA, 2006).

*In vitro*, o efeito da juglona foi estudado em linhagem celular de leucemia humana, sensível e resistente a doxorrubicina (BAYRAM et al., 2018), carcinoma da bexiga humana (TCC-SUB e RT-4), glioma (WU et al., 2017), hepatoma (HepG2) (WANG et al., 2018) e linhagem de fibroblastos L929 de camundongos BALB (ERISEN et al., 2020). As células tratadas com a juglona apresentaram efeito anti-proliferativo, anti-invasivo e apoptótico, visto que induziu o aumento da fosforilação p53, inibiu a expressão das proteínas inibidoras de apoptose, que manteve os níveis de caspases 3 e BAX elevados, e estimulou a via pró apoptótica 1 (JI et al., 2016; BAYRAM et al., 2018). Além disso, é conhecido a capacidade da juglona modular sinalização celular, inibindo MAPK (WU et al., 2017).

Diante do efeito citotóxico, surgiu o interesse de se investigar a susceptibilidade de microorganismos frente a juglona. A sua atividade fungicida foi comparada a compostos vendidos no mercado farmacêutico, como undecilenato de zinco e sulfeto de selênio (CLARK et al., 1990; WIANOWSKA et al., 2016). Em estudos realizados por Zhaoxia e colaboradores (2009) e Zmantar e colaboradores (2016), a juglona demonstrou ação sobre *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Penicillium sp.*, *Aspergillus sp.*, e *Hansenula sp.*, com atividade também em cepas de *Staphylococcus aureus* susceptíveis e resistentes a antibióticos (ZHAOXIA et al., 2009; ZMANTAR et al., 2016). Por meio da bioinformática foi sugerido que ação da juglona está além de alteração no ciclo redox, sendo capaz de inibir a síntese de DNA, RNA e proteínas bacterianas (WANG et al., 2016).

A juglona foi também analisada como anti-parasitária humana e animal. Em protozoários, a espécie *Toxoplasma gondii* apresentou susceptibilidade com concentração inibitória média de 148 nM (AKERMAN e MULLER, 2005). Extratos de *Juglans spp.*, rico em juglona, foram também ativos contra *Trypanosoma cruzi*, *T. brucei rhodesiense* e *Leishmania donovani* (ELLENDORF et al., 2015). Além disso, a juglona também mostrou atividade antihelmíntica sobre *Hymenolepis nana* em camundongos (DAMA e JADHAV, 1997), sobre o desenvolvimento de *Meloidogyne spp.*, nematóide frequente em cultivos de *Arachis hypogaea L.* (amendoim) (DAMA et al., 1999) e vermes adultos de *S. mansoni* (cepa LE) (MAGALHÃES et al., 2014). Também foram evidenciadas a ampla ação da juglona, em ensaios envolvendo moluscos adultos de

*Biomphalaria* (Say, 1818), o hospedeiro intermediário de *S. mansoni* no Brasil (RIBEIRO et al., 2009).

A ação das naftoquinonas em hospedeiro intermediário e formas infectantes de *Schistosoma* foi demonstrada por Pinto e colaboradores (1977), quando avaliou a capacidade de 19 naftoquinonas, em formulação tópicas, atuarem sobre cercárias impedindo a penetração na pele de camundongos (PINTO et al., 1977). Também é conhecida a ação em vermes jovens e adultos como é o caso da menadiona (vitamina K), vitamina que atua nos fatores de coagulação e ao mesmo tempo consegue agir *in vitro* e *in vivo* contra *S. mansoni* (cepa LE) (KAPADIA et al., 2017).

Diante das atividades antiparasitárias das naftoquinonas, objetivamos avaliar as propriedades esquistossomicidas ainda não estudados da juglona sobre diferentes estágios evolutivos do *S. mansoni* (cepa BH), empregando modelo experimental *in vitro*.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVOS GERAIS

Avaliar a atividade esquistossomicida *in vitro* do composto juglona sobre *Schistosoma mansoni* (cepa BH).

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar a susceptibilidade *in vitro* de vermes adultos, vermes jovens e esquistossômulos de *Schistosoma mansoni*, cepa BH, frente a juglona

Determinar a concentração letal média (CL<sub>50</sub>) do composto juglona em todos os estágios evolutivos que parasitam os hospedeiros definitivos;

Analisar o tegumento dos vermes adultos, vermes jovens e esquistossômulos de *Schistosoma mansoni*, cepa BH.

Avaliar o potencial citotóxico da juglona em esplenócitos de camundongos Balb/c durante de exposição.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS E ANIMAIS EXPERIMENTAIS

A pesquisa foi iniciada após a aprovação do Comitê de Ética em Experimentação Animal do Centro de Biociências da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), recebendo número do processo 0024/2019. Foram utilizados camundongos fêmeas Swiss Webster (*Mus musculus*) fornecidos e mantidos no Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA). Os animais foram divididos em gaiolas de proporção 49x34x16, sobre cama de maravalha previamente autoclavada, mantidos a 25 °C com fotoperíodos de 12 horas de claro e 12 horas de escuro com acesso livre à ração (Labina® / Purina, São Paulo- SP) e água potável *ad libitum*.

Utilizou-se a cepa de *Schistosoma mansoni* Belo Horizonte- Minas Gerais (BH), sensível ao praziquantel, a qual foi mantida através de passagens sucessivas em caramujos da espécie *Biomphalaria glabrata* do moluscário da disciplina de parasitologia do Departamento de Medicina Tropical da UFPE, e camundongos fêmeas Swiss Webster, com 30 dias de idade, do Laboratório de Esquistossomose Experimental do LIKA.

### 4.2 COMPOSTOS

O composto juglona (5-hidroxi-1,4-naftalenodiona), Lote: STBH9858, o Praziquantel(2-(ciclohexilcarbonil)-1,2,3,6,7-11 $\beta$ -hexahidro-4H pirazino (2,1a) isoquinolin-4-ona), (Lote: 122K1443) e os demais reagentes foram adquiridos pela Sigma Aldrich Corporation.

### 4.3 MANUTENÇÃO DA CEPA BH DE *Schistosoma mansoni*: INFECÇÃO DE CARAMUJOS, OBTENÇÃO DE CERCÁRIAS E INFECÇÃO DE CAMUNDONGOS

Fezes de camundongos infectados com *S. mansoni* foram tratadas de acordo com a técnica de sedimentação espontânea (HOFFMAN, 1934). O sedimento foi transferido para placas de Petri e exposto à iluminação afim de obter eclosão dos miracídios. Os caramujos foram expostos individualmente aos miracídios, permanecendo sob as

mesmas condições de temperatura e luminosidade, durante 2 horas (STANDEN, 1952). Em seguida, foram mantidos livres de exposição à luminosidade, em aquários contendo água decolorada e alimentados com folhas de alface.

Após 4 semanas de infecção os caramujos, foram transferidos para recipientes de vidro contendo água filtrada e decolorada, submetidos a temperatura de 28°C e luminosidade artificial durante, aproximadamente, 60 min, para liberação de cercárias (STIREWALT, 1954). Após obtenção das cercárias, camundongos Swiss Webster fêmeas foram anestesiados por via intramuscular com 90-100 mg/Kg de Dopalen® (Ketamina) e 5-16 mg/Kg de Anasedan® (Xilazina), numa proporção de 2:1. Em seguida, os animais foram infectados por via percutânea com suspensão cercariana (60 µL), que continha, em média, 120 cercárias (OLIVIER, STIREWALT, 1952). Todos os camundongos após 60 minutos de exposição às cercárias foram acomodados em suas gaiolas no biotério do LIKA, recebendo água e alimento.

#### 4.4 OBTENÇÃO DE ESQUISTOSSÔMULOS DE *Schistosoma mansoni* E AVALIAÇÃO *in vitro* DA SUA SUSCETIBILIDADE À JUGLONA

Cercárias de *S. mansoni* foram mecanicamente transformadas em esquistossômulos através do método de Ramalho-Pinto e colaboradores (1974). Obtido os esquistossômulos, estes foram mantidos, por um período de três horas, em meio RPMI-1640 acrescido de HEPES 20mM, penicilina (100UI/mL), estreptomicina (100µg/mL) e suplementado com soro bovino fetal a 10%, sob 37°C, em atmosfera úmida contendo 5% de CO<sub>2</sub>.

Após 3 horas de incubação, cerca de 50 esquistossômulos foram distribuídos em cada poço de uma placa de cultura com 24 poços, que continham meio RPMI-1640 na presença de concentrações do composto juglona variando entre 0,0781 a 1,25 µM. Os esquistossômulos foram observados sobre microscópio invertido por cinco dias, para avaliação de mudanças na atividade motora, alteração do tegumento e morte. Todos os experimentos foram realizados em triplicata e repetidos duas vezes. Meio de cultura com e sem 1,5% de DMSO foram utilizados como controles negativos, e praziquantel a 250 µM, controle positivo.

#### 4.5 AVALIAÇÃO *in vitro* DA SUSCEPTIBILIDADE À JUGLONA DE VERMES JOVENS (21 DIAS) DE *Schistosoma mansoni* (CEPA BH)

Camundongos infectados há 21 dias foram submetidos à eutanásia por deslocamento cervical e subsequente perfusão do sistema porta-hepático, com solução salina estéril (0,9 %) (DUVALL e DEWITT, 1967). Todos os vermes jovens recuperados durante os experimentos foram transferidos, lavados e mantidos no meio RPMI 1640 suplementado com HEPES 20 mM, estreptomicina (100 µg/ mL), penicilina (100 µg/ mL) e Soro Bovino Fetal a 10%.

Os vermes foram distribuídos em uma placa de cultura 24 poços contendo o meio RPMI 1640 suplementado. Em cada poço foram transferidos 20 vermes jovens, sendo incubados em estufa para adaptação ao meio por 2 horas, sob atmosfera úmida e temperatura de 35 °C a 5% de CO<sub>2</sub>. Após este período, foram acrescentados na placa de cultura, o composto juglona entre 3,125 µM e 50 µM. A placa foi mantida em cultura e analisada com auxílio do microscópio invertido a cada 24 horas, durante 5 dias, para análise de avaliação motora, alteração do tegumento e taxa de mortalidade. Utilizou-se meio de cultura com DMSO a 1,5% como controle negativo e praziquantel a 250 µM, como controle positivo. Todos os experimentos foram realizados em triplicata e repetidos duas vezes.

#### 4.6 AVALIAÇÃO *in vitro* DA SUSCEPTIBILIDADE À JUGLONA DE VERMES ADULTOS (50 DIAS) DE *Schistosoma mansoni* (CEPA BH)

No 50° dia da infecção, camundongos foram submetidos à eutanásia por deslocamento cervical e subsequente perfusão do sistema porta-hepático e veias mesentéricas visando recuperação os vermes (DUVALL, DEWITT, 1967). Em seguida, os vermes obtidos durante os experimentos foram transferidos para uma placa de Petri, lavados e mantidos no meio RPMI 1640 suplementado com HEPES 20 mM, estreptomicina (100 µg/ mL), penicilina (100 µg/ mL) e Soro Bovino Fetal a 10%.

Os vermes adultos, casais, machos e fêmeas, foram distribuídos em uma placa de cultura 24 poços contendo o meio RPMI-1640 suplementado com HEPES 20 mM,

estreptomicina (100 µg/ mL), penicilina (100 µg/ mL) e Soro Bovino Fetal a 10%. Em cada poço foram transferidos 4 pares de vermes adultos (machos, fêmeas ou casais), sendo incubados em estufa para adaptação ao meio durante 2 horas, sob atmosfera úmida e temperatura de 35 °C a 5% de CO<sub>2</sub>. Após este período, acrescentou-se a juglona em concentrações que variam entre 6,25 e 100 µM para machos e fêmeas e 3,125 a 100 µM para casais. A placa foi mantida em cultura e analisada com auxílio do microscópio invertido a cada 24 horas, durante 5 dias, para avaliação motora, alteração do tegumento e morte. Foram utilizados meio de cultura com DMSO a 1,5% e Praziquantel (10 µM) como controles negativo e positivo, respectivamente. Todos os experimentos ocorreram em triplicata e repetidos duas vezes.

#### 4.7 CRITÉRIOS PARA DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ESQUISTOSSOMICIDA DA JUGLONA FRENTE A DIFERENTES ESTÁGIOS EVOLUTIVOS DE *Schistosoma mansoni* (CEPA BH)

##### 4.7.1 Escores de motilidade e taxa de sobrevivência

Para avaliar as condições gerais dos parasitos utilizou-se microscópio invertido. Os vermes incubados com meio de cultura e juglona, nos diferentes estágios evolutivos e concentrações, foram monitorados nos tempos 3 h, 6 h, 12 h, 24 h e a cada 48 horas durante 5 dias. Foram considerados mortos os vermes que não apresentaram nenhum movimento durante 2 minutos de observação.

Na análise em vermes jovens e adultos foram estudadas alterações de motilidade, do tegumento e a taxa de sobrevivência. A motilidade foi classificada por meio de escala que varia entre 0 e 3, sendo: 3- vermes com movimentos ondulatórios típicos; 2- movimentos reduzidos do corpo; 1- movimentos presentes apenas nas extremidades; 0- mortos (SANTOS, 2018).

Para esquistossômulos a escala foi de 3, 1,5 e 0, sendo: 3- vermes com movimentos ondulatórios típicos; 1,5, movimentos reduzidos em todo o corpo ou somente nas extremidades; escore 0, mortos (ARAÚJO et al., 2020).

#### 4.7.2 Capacidade de oviposição durante exposição à Juglona

Os vermes adultos acasalados foram transferidos para placa de cultura 24 poços contendo meio de cultura RPMI-1640 e cultivados durante 5 dias em estufa a 37 °C em 5% de CO<sub>2</sub>. Os casais de *S. mansoni* (cepa BH) foram submetidos a concentrações do composto juglona que variam entre 3,125 e 100 µM para analisar a capacidade de oviposição durante 120 horas. Os ovos em cada poço foram contados e comparados com os controles negativos, contendo Meio de cultura acrescido ou não de DMSO a 1,5%, e controle positivo, PZQ a 10 µM. Para essa análise, foram excluídos da contagem os poços com vermes desacasalados.

#### 4.7.3 Avaliação de citotoxicidade da juglona em células esplênicas

Este procedimento foi realizado de acordo com Melo e colaboradores (2011). Camundongos albinos Balb/c foram submetidos à eutanásia por deslocamento cervical seguida de esplenectomia, sob condições assépticas. Em um fluxo laminar, os baços obtidos foram macerados em 2 mL de meio de cultura RPMI-1640 suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF), contendo uma solução penicilina (100 U/mL) e estreptomicina (100 µg/mL). As suspensões celulares obtidas foram transferidas para um tubo falcon (15 mL) contendo solução Ficoll-Paque™ Plus e centrifugado a 1500 rpm por 30 minutos. Em seguida, o conteúdo celular foi transferido para um novo tubo falcon (15 mL) e lavado duas vezes com meio de cultura RPMI-1640 e centrifugado a 1500 rpm por 5 minutos. A partir disso, uma amostra do precipitado foi diluída em azul de trypan (1%) e quantificada em câmara de Neubauer, para verificar a viabilidade celular.

Da suspensão celular, foram distribuídas por poço 1 x 10<sup>6</sup> células, em placas de 96 poços, seguido de incubação a 37°C, 5% CO<sub>2</sub> por 72 horas com a solução de juglona nas concentrações variando de 1,5625 µM a 100 µM. Após incubação a viabilidade dos esplenócitos após tratamento foi determinada pelo ensaio de citotoxicidade baseado no 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio (MTT) (Mosmann, 1983). Resumidamente, as células após exposição passaram por remoção do meio, foram lavadas com PBS e sub subsequentemente adicionado 100 µL de meio RPMI-1640 (sem vermelho de fenol) e 10 µL de MTT (5 mg/mL), retornando para incubação por 3 horas. Em seguida, foi

removido o meio contendo MTT e adicionado 100  $\mu$ L de DMSO para solubilizar o formazan. As placas foram incubadas por 7 minutos em agitação e posteriormente medição da densidade óptica pelo espectrofotômetro ( $\lambda = 560$  nm). A viabilidade celular foi calculada em relação ao controle celular cultivado com meio de cultura RPMI-1640. Os tratamentos foram realizados em triplicatas e repetidos duas vezes.

#### 4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados numéricos foram expressos como médias  $\pm$  desvio padrão (DP). As análises estatísticas e a determinação das Concentrações Letais média ( $CL_{50}$ ) dos vermes em diferentes estágios evolutivos foram realizadas através do programa Statistica versão 8.0 e CompuSyn versão 1.0 (Chou e Martin, 2005), respectivamente. Os dados da citotoxicidade foram submetidos ANOVA, seguido do pós-teste Bonferroni. Enquanto os resultados da avaliação de oviposição foram gerados através do teste não paramétrico Mann-Whitney. O gráfico da oviposição e do potencial citotóxico de esplenócitos murinos foram construídos com o auxílio do software Origin versão 8.5. O valor de  $p < 0.05$  foi considerado estatisticamente significativo.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 A JUGLONA CAUSA MORTE E REDUÇÃO DE MOTILIDADE EM DIFERENTES ESTÁGIOS EVOLUTIVOS DE *Schistosoma mansoni* (CEPA BH)

A juglona causou mortalidade e interferiu progressivamente na motilidade de esquistossômulos, vermes jovens e adultos (machos, fêmeas e casais). Os efeitos esquistossomicidas observados nas diferentes fases de vida foram concentração e tempo dependentes.

Utilizou-se como controles negativos esquistossômulos, vermes jovens e adultos, cultivados em meio de cultura e/ou com DMSO a 1,6%. Estes, permaneceram com movimentos típicos, exibindo peristaltismo dos órgãos internos, ventosas em movimento, aderindo ao fundo e/ou a lateral da placa de cultura e tegumento íntegro durante todo experimento, 120 horas. Enquanto que o controle positivo, praziquantel, foi utilizado em concentrações que apresentaram atividade esquistossomicida evidente. As diferentes fases evolutivas expostas ao praziquantel, demonstraram efeito imediato e progressivo no decorrer do tempo. Foram observadas redução de motilidade, contração muscular longitudinal, alteração no tegumento dos vermes que resultaram na morte dos vermes.

#### 5.1.1 Atividade da juglona frente a Esquistossômulos

A susceptibilidade *in vitro* de esquistossômulos, ao longo de 120 horas de incubação com a juglona está descrita em score de motilidade na tabela 2 e Figura 21 (A-I). Após 3h de incubação, a concentração de 1,25  $\mu\text{M}$  causou letalidade total. Na concentração de 0,625  $\mu\text{M}$  houve alteração na motilidade e mortalidade de 20% dos vermes após 3 horas de incubação e após 72 horas e 120h alcançou 96% e 100% de mortalidade, respectivamente. Ao final de 120h, as concentrações 0,3125, 0,1561 e 0,0781  $\mu\text{M}$  causaram alterações na motilidade e mortalidade de 54%, 30% e 12%, respectivamente. A concentração letal média ( $CL_{50}$ ) foi de 0,1923  $\mu\text{M}$ . Por outro lado, PZQ na concentração de 250  $\mu\text{M}$  causou mortalidade de 96% ao final de 120 horas.

Alterações tegumentares nos esquistossômulos foram registradas no intervalo de 3 horas de exposição a 1,25  $\mu$ M de juglona, caracterizadas por bolhas na superfície do tegumento e aparência granulosa no interior do verme. As lesões tornaram-se mais intensas com o aumento da concentração e do tempo de exposição sendo observado aumento no número e tamanho de bolhas, ruptura do tegumento, edema e modificações topográficas do verme.

Figura 21- Microfotografia de esquistossômulos *S. mansoni* (A-H). (A) Vermes cultivados por 120 horas em meio RPMI 1640 e (B) meio com DMSO 1,6% evidenciando ventosa oral (seta amarela) ventosa ventral (seta branca) e tegumento íntegro (seta cinza). (C) PZQ, 250  $\mu\text{M}$ , em 120 horas, exibindo bolhas (círculos), aspecto granuloso (seta preta) e contração muscular longitudinal (colchete). Juglona (D) na concentração de 1,25  $\mu\text{M}$  em 3 horas e (E) na concentração de 0,625  $\mu\text{M}$  exibiu bolhas e aspecto granuloso em 12 h, (F) além de bordas irregulares/ rupturas em 72h. (G) em 0,3125  $\mu\text{M}$  houve bolhas evidentes em 72 h. Juglona (H) a 0,635 e (I) 0,0781  $\mu\text{M}$  exibiram bolhas, aspecto granuloso e irregularidade/edema no tegumento no tempo de 120 horas. Imagens capturadas em 400X.

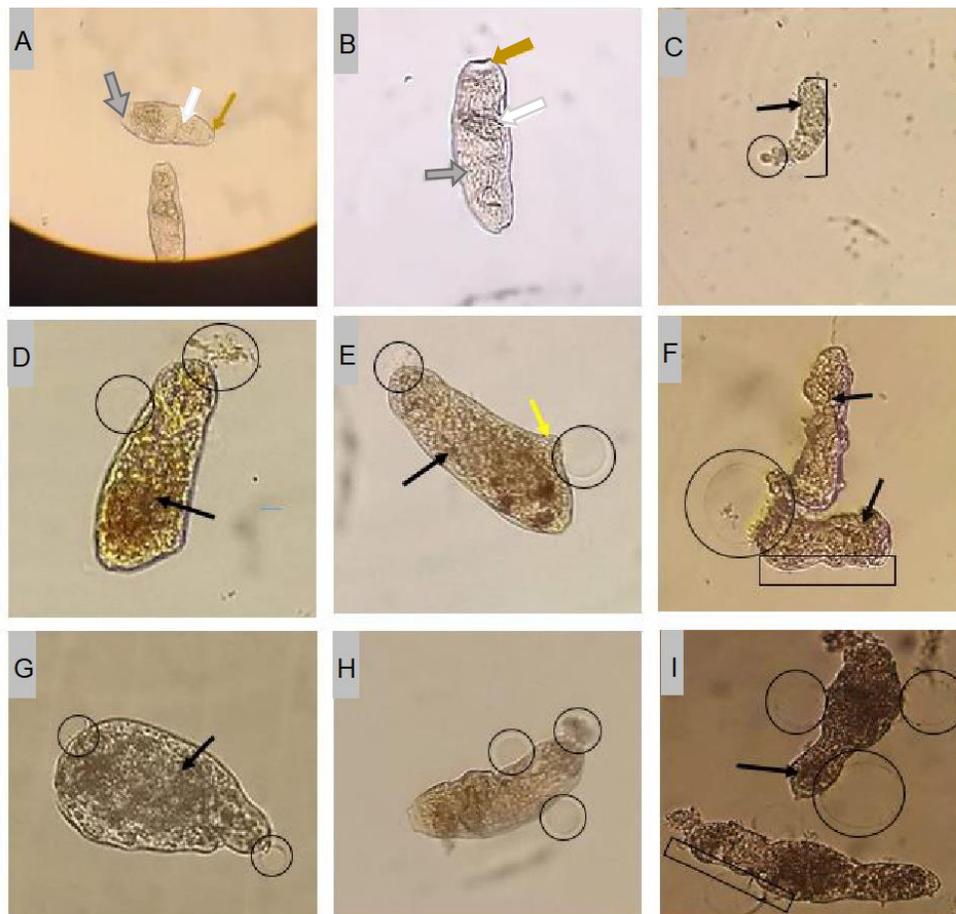


Tabela 2 – Avaliação *in vitro* da susceptibilidade de esquistossômulos (3 horas) de *Schistosoma mansoni* (cepa BH) controles e tratados com diferentes concentrações de juglona, durante 120 horas.

Grupos n=50	Média de esquistossômulos de <i>Schistosoma mansoni</i> ± Desvio Padrão e Score de motilidade durante 120h (%)																			
	3h			6h			12h			24h			72h			120h				
	3	1.5	0	3	1.5	0	3	1.5	0	3	1.5	0	3	1.5	0	3	1.5	0		
Cntrl DMSO (1.6%)	50±0,0 (100%)			50±0,0 (100%)			50±0,0 (100%)			50±0,0 (100%)			50±0,0 (100%)			50±0,0 (100%)				
Cntrl Meio	50±0,0 (100%)			50±0,0 (100%)			50±0,0 (100%)			50±0,0 (100%)			50±0,0 (100%)			50±0,0 (100%)				
Cntrl PZQ 250µM	50±0,0 (100%)			50±0,0 (100%)			50±0,0 (100%)			13±0,5 (26%)		37±0,5 (74%)	4±0,5 (8%)		46±1,1 (92%)	2±0,5 (4%)		48±1,1 (96%)		
<b>Juglona</b>																				
1,25µM	50±0,0 (100%)			50±0,0 (100%)			50±0,0 (100%)			50±0,0 (100%)			50±0,0 (100%)			50±0,0 (100%)				
0,625µM	4±0,5 (8%)		36±0,5 (72%)	10±0,5 (20%)		4±0,5 (8%)	36±0,5 (72%)		10±0,5 (20%)	3±0,0 (6%)	37±0,5 (74%)		10±0,5 (20%)	36±0,5 (72%)		14±0,5 (28%)	2±0,5 (4%)		48±1,1 (96%)	50±0,0 (100%)
0,3125µM	50±0,0 (100%)			46±1,1 (92%)		4±0,5 (8%)	40±1,5 (80%)		10±1,1 (20%)	40±0,0 (80%)		10±0,5 (20%)	23±1,7 (46%)		17±1,1 (34%)	10±0,5 (20%)		12±0,5 (24%)	11±0,5 (22%)	27±0,5 (54%)
0,1561µM	50±0,0 (100%)			50±0,0 (100%)			50±0,0 (100%)			43±0,0 (86%)		7±0,0 (14%)	28±0,0 (56%)		16±1,5 (32%)	6±0,5 (12%)		14±0,5 (28%)	21±0,0 (42%)	15±1,5 (30%)
0,0781µM	50±0,0 (100%)			50±0,0 (100%)			50±0,0 (100%)			50±0,0 (100%)			43±0,0 (86%)		7±0,0 (14%)	25±0,5 (50%)		19±1,1 (38%)	6±1,0 (12%)	
<b>CL<sub>50</sub>=0,1923µM</b>																				

\* (3) Movimento ondulatório típico; (1,5) Movimento reduzido em todo o corpo ou somente nas extremidades; (0) Morto.

### 5.1.2 Atividade da juglona frente a Vermes Jovens

Na tabela 3, são apresentadas a susceptibilidade dos vermes jovens de *Schistosoma mansoni* (cepa BH), controles e tratados com diferentes concentrações de juglona ao longo de 120 horas. Após 3 h, as concentrações de 25  $\mu\text{M}$  e 50  $\mu\text{M}$  causou efeito esquistossomicida máximo. No mesmo tempo, a concentração de 12,5  $\mu\text{M}$  reduziu a motilidade dos vermes e induziu mortalidade de 20%, alcançando 90% e 100% dos vermes em 24 h e 72 h, respectivamente. Ao final da análise de 120 horas, foram evidenciadas redução de motilidade nas concentrações de 6,25  $\mu\text{M}$  e 3,125  $\mu\text{M}$ , sendo observado também mortalidade em 70% e 35% dos vermes jovens, respectivamente. O valor da  $\text{CL}_{50}$  foi determinado em 3,172  $\mu\text{M}$ . Por outro lado, o PZQ na concentração de 250  $\mu\text{M}$  causou mortalidade de 96% ao final de 24 horas.

A juglona apresentou efeitos sucessivos ao tegumento dos vermes jovens, sendo verificado bolhas em todo corpo, coloração alterada, aspecto granuloso no interior do verme, nas primeiras três horas de incubação. Os danos observados se tornaram críticos de acordo com a concentração e o tempo decorrido, sendo percebido o aumento no número e tamanho de bolhas, rupturas do tegumento, edema e modificações da estrutura topográfica (Figura 22 A-I).

Figura 22 – Microfotografia de vermes jovens de *S. mansoni* (A-I). (A) Vermes cultivados por 120 horas em meio RPMI 1640 e (B) meio com DMSO 1,6% evidenciando ventosa oral (seta laranja) e ventral (seta branca) e ceco (seta cinza). (C) PZQ, 250  $\mu$ M, em 120 horas, aspecto granuloso (seta preta) e contração muscular longitudinal (colchete). Juglona (D) na concentração de 50  $\mu$ M e (E) 25  $\mu$ M exibiram aspecto granuloso, bolhas no tegumento e ventosas (círculos) e retração dorso ventral (colchete). (F) Na concentração de 12,5  $\mu$ M em 24 horas exibiu as aspecto granuloso e contração muscular. (G) a concentração de 6,25  $\mu$ M exibiu aspecto granuloso e contração muscular em 72h, (H) com bolhas e extravasamento de material intracelular (quadrado) às 120 h. Ao final do experimento, (I) 3,125  $\mu$ M evidenciou aspecto granuloso, bolha e contração muscular. Imagens capturas em 200X, exceto para figura B a qual foi obtida em 100X.

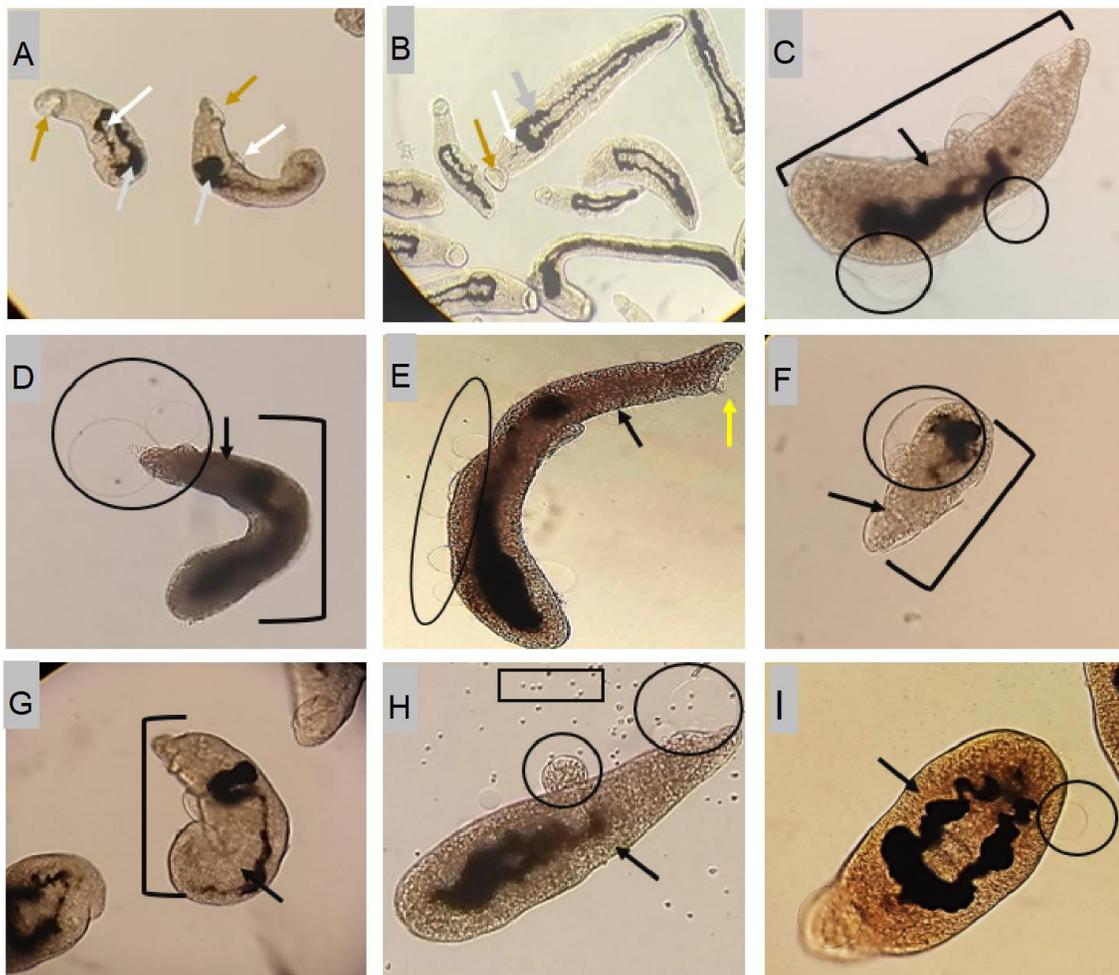


Tabela 3 – Avaliação *in vitro* da susceptibilidade de vermes jovens (21 dias) de *Schistosoma mansoni* (cepa BH) controles e tratados com diferentes concentrações de juglona, durante 120 horas.

Grupos n=20	Média de vermes jovens de <i>Schistosoma mansoni</i> ± Desvio Padrão e Score de motilidade durante 120h (%)																							
	3h				6h				12h				24h				72h				120h			
	3	2	1	0	3	2	1	0	3	2	1	0	3	2	1	0	3	2	1	0	3	2	1	0
Cntrl DMSO	20±0,0 (100%)				20±0,0 (100%)				20±0,0 (100%)				20±0,0 (100%)				20±0,0 (100%)				20±0,0 (100%)			
Cntrl Meio	20±0,0 (100%)				20±0,0 (100%)				20±0,0 (100%)				20±0,0 (100%)				20±0,0 (100%)				20±0,0 (100%)			
Cntrl PZQ 250µM	20±0,0 (100%)				20±0,0 (100%)				20±0,0 (100%)				4±0,0 16±0,0 (20%) (80%)				---				---			
<b>Juglona</b>																								
50µM	20±0,0 (100%)				20±0,0 (100%)				20±0,0 (100%)				20±0,0 (100%)				20±0,0 (100%)				20±0,0 (100%)			
25µM	20±0,0 (100%)				20±0,0 (100%)				20±0,0 (100%)				20±0,0 (100%)				20±0,0 (100%)				20±0,0 (100%)			
12,5µM	7±1,5 (35%)	3±0,0 (15%)	6±0,5 (30%)	4±0,0 (20%)	3±0,0 (15%)	3±0,0 (15%)	7±0,0 (35%)	7±0,0 (35%)	2±0,5 (10%)	4±0,5 (20%)	7±0,5 (35%)	7±0,5 (35%)	1±0,5 (5%)	1±0,0 (5%)	18±0,5 (90%)	20±0,0 (100%)				20±0,0 (100%)				
6,25µM	17±0,5 (85%)	2±0,0 (10%)	1±0,0 (5%)	14±0,5 (70%)	3±0,0 (15%)	3±0,0 (15%)	3±0,0 (15%)	4±0,5 (20%)	7±1,0 (35%)	6±0,5 (30%)	2±0,5 (10%)	3±0,0 (15%)	7±1,0 (35%)	9±0,5 (45%)	1±0,0 (5%)	3±0,0 (15%)	3±0,0 (15%)	13±0,0 (65%)	3±0,5 (15%)	3±0,5 (15%)	14±0,5 (70%)			
3,125µM	20±0,0 (100%)				20±0,0 (100%)				15±0,5 (75%)	3±0,5 (15%)	1±0,5 (5%)	11±0,5 (55%)	4±0,5 (20%)	3±0,0 (15%)	6±0,5 (30%)	5±0,5 (25%)	4±1,0 (20%)	5±0,5 (25%)	2±0,5 (10%)	3±0,5 (15%)	8±0,5 (40%)	7±1,0 (35%)		
CL50=3,175µM																								

\*(3) Movimento ondulatório típico; (2) Movimento do corpo reduzido; (1) Imóvel, mas vivo; (0) Morto.

### 5.1.3 Atividade da Juglona frente a Vermes Adultos de *S. mansoni* (machos, fêmeas e casais)

#### 5.1.3.1 Efeitos da juglona sobre Vermes Machos

A tabela 4, observa-se a susceptibilidade dos vermes adultos machos controles e expostos a composto juglona. Após 3 horas de incubação, a juglona induziu redução na motilidade em 37,5% e 12,5% dos vermes nas concentrações 50  $\mu\text{M}$  e 25  $\mu\text{M}$ , enquanto que o efeito esquistossomicida máximo foi observado na concentração de 100  $\mu\text{M}$ . Na concentração de 50  $\mu\text{M}$  esse mesmo efeito máximo foi obtido em 12 horas, em contrapartida, as concentrações 25  $\mu\text{M}$  e 12,5  $\mu\text{M}$  permaneceram com vermes vivos, porém com progressiva diminuição no score ao longo de 72 horas. Em 120 horas, as concentrações 25  $\mu\text{M}$  e 12,5  $\mu\text{M}$  apresentaram ação esquistossomicida em 62,7% e 37,5%, enquanto que redução de motilidade intensa foi observado em 6,25  $\mu\text{M}$ . O valor de  $\text{CL}_{50}$  foi determinado em 19,01  $\mu\text{M}$ . Por outro lado, PZQ na concentração de 10  $\mu\text{M}$  causou mortalidade de 100% ao final de 72 horas.

Vermes machos em PZQ seguiu com evidentes lesões contração muscular intensa, bolhas no tegumento e aspecto granuloso. Da mesma forma, a juglona atuou no tegumento dos vermes machos. Nas 3 primeiras horas, foram notadas bolhas no tegumento e alteração de estrutura com retração muscular evidente em vermes submetidos a 100  $\mu\text{M}$  de juglona. Os efeitos foram graduais e intensificados com o decorrer do tempo e concentração do composto, resultando em aumento de bolhas tegumentares, intensidade de contração muscular com perda de aderência e microerosões do tegumento (Figura 23. A-H).

Figura 23 - Microfotografia vermes adultos machos de *S. mansoni* (A-H). (A) Vermes cultivados por 120 horas em meio RPMI 1640 e (B) meio com DMSO 1,6%, evidenciando canal ginecóforo (seta amarela), ventosas orais e ventrais (setas brancas) e tegumento íntegro (seta cinza). (C) PZQ, 10  $\mu$ M, evidenciando bolhas e aspecto granuloso (círculo), ausência de adesão (seta) e contração muscular (colchete), em 24 h. Juglona (D) na concentração de 100  $\mu$ M demonstra as bolhas (círculo) e microbolhas (quadrado) no tegumento, ausência de adesão (seta preta) e contração dorso ventral (colchete) em 3 horas de incubação. (E) em 50  $\mu$ M gerou bolhas, contração muscular em forma espiral e sem adesão, em 12 horas. (F) em 25  $\mu$ M foi observado ventosa não aderida (seta), bolhas e microbolhas em todo tegumento, após 24 horas. Em 120 h (G) na concentração de 12,5  $\mu$ M houve contração muscular dorso ventral (colchete), bolhas no tegumento e ventosas (círculos) e (H) em 6,25  $\mu$ M, bolhas (círculo). As imagens foram capturadas em 40X, exceto as figuras F e H as quais estão em 200X e 100X, respectivamente.

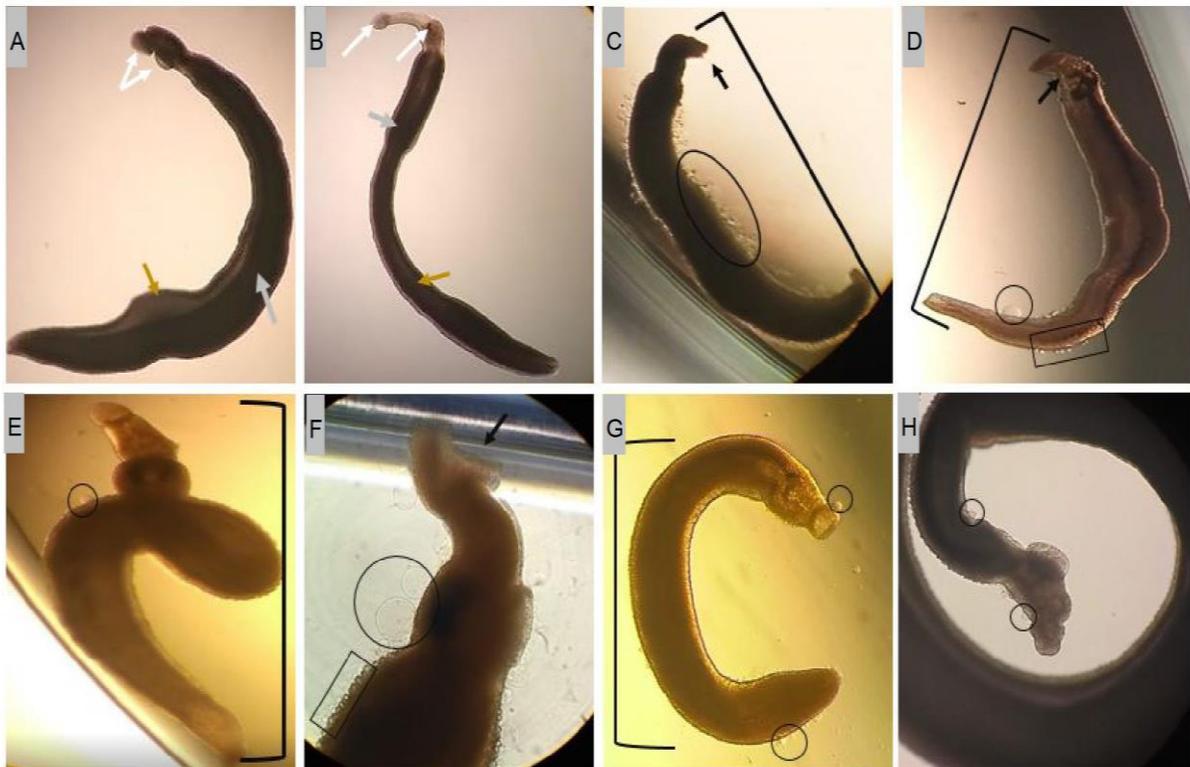


Tabela 4 – Avaliação *in vitro* da susceptibilidade de vermes adultos machos de *Schistosoma mansoni* (cepa BH), controles e tratados com diferentes concentrações de juglona durante 120 horas.

Grupos n=8	Média de vermes adultos machos de <i>Schistosoma mansoni</i> ± Desvio Padrão e Score de motilidade durante 120 horas (%)																									
	3h				6h				12h				24h				72h				120h					
	3	2	1	0	3	2	1	0	3	2	1	0	3	2	1	0	3	2	1	0	3	2	1	0		
Cntrl DMSO	8±0,0 (100%)				8±0,0 (100%)				8±0,0 (100%)				8±0,0 (100%)				8±0,0 (100%)				8±0,0 (100%)					
Cntrl Meio	8±0,0 (100%)				8±0,0 (100%)				8±0,0 (100%)				8±0,0 (100%)				8±0,0 (100%)				8±0,0 (100%)					
Cntrl PZQ 10µM			8±0,0 (100%)				8±0,0 (100%)		2±0,0 (25%)	6±0,0 (75%)			1±0,0 (12,5%)	7±0,5 (87,5%)			8±0,0 (100%)				8±0,0 (100%)					
<b>Juglona</b>				8±0,0 (100%)			8±0,0 (100%)		8±0,0 (100%)				8±0,0 (100%)				8±0,0 (100%)				8±0,0 (100%)					
100µM				8±0,0 (100%)			8±0,0 (100%)		8±0,0 (100%)				8±0,0 (100%)				8±0,0 (100%)				8±0,0 (100%)					
50µM	5±0,0 (62,5%)	3±0,0 (37,5%)			4±0,0 (50%)	3±0,5 (37,5%)	1±0,5 (12,5%)		8±0,0 (100%)				8±0,0 (100%)				8±0,0 (100%)				8±0,0 (100%)					
25µM	7±0,5 (87,5%)	1±0,5 (12,5%)			6±0,0 (75%)	1±0,0 (12,5%)	1±0,0 (12,5%)		4±0,0 (50%)	2±0,0 (25%)	2±0,0 (25%)		2±0,0 (25%)	3±0,5 (37,5%)	1±0,5 (12,5%)	2±0,0 (25%)	2±0,0 (25%)	2±0,0 (25%)	2±0,0 (25%)	2±0,0 (25%)	2±0,0 (25%)	2±0,0 (25%)	2±0,0 (25%)	2±0,0 (25%)	3±0,5 (37,5%)	5±0,5 (62,7%)
12,5µM	8±0,0 (100%)				7±0,5 (87,5%)	1±0,5 (12,5%)			5±0,5 (62,7%)	3±0,5 (37,5%)			3±0,5 (37,5%)	5±0,5 (62,7%)			2±0,5 (25%)	4±0,8 (50%)	2±0,5 (25%)		2±0,5 (25%)	3±0,5 (37,5%)	2±0,5 (25%)	3±0,5 (37,5%)		
6,25µM	8±0,0 (100%)				8±0,0 (100%)				6±0,0 (75%)	2±0,0 (25%)			5±0,5 (62,7%)	3±0,5 (37,5%)			4±0,0 (50%)	4±0,0 (50%)			6±0,0 (75%)	2±0,0 (25%)				

CL<sub>50</sub>=19,01µM

\*(3) Movimento ondulatório típico; (2) Movimento do corpo reduzido; (1) Imóvel, mas vivo; (0) Morto.

### 5.1.3.2 Efeitos da juglona sobre Vermes Fêmeas

Avaliação da susceptibilidade *in vitro* de vermes adultos fêmeas diante do composto juglona está descrita na tabela 5 e Figura 24 (A-I). Em 3 horas de exposição à juglona, as concentrações 25  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$  e 100  $\mu\text{M}$  causaram mortalidade de 50%, 75% e 100%. No mesmo tempo observou intensa redução na motilidade entre 12,5-50  $\mu\text{M}$ , em que 25% e 12,5% dos vermes apresentaram movimentos apenas nas extremidades, com ausência de peristaltismo dos órgãos internos e sem aderência nas concentrações de 50  $\mu\text{M}$  e 25  $\mu\text{M}$ , respectivamente. O efeito esquistossomicida máximo de 50  $\mu\text{M}$  e 25  $\mu\text{M}$  ocorreram nos tempos de 6 e 24 horas de incubação. Ao final de 120 horas, as concentrações de 12,5  $\mu\text{M}$  e 6,25  $\mu\text{M}$  induziram redução de motilidade em todos os vermes e mortalidade em 37,5% e 12,5%, respectivamente. A  $\text{CL}_{50}$  foi igual a 11,32  $\mu\text{M}$ . PZQ na concentração de 10  $\mu\text{M}$  causou mortalidade de 100% ao final de 120 horas.

Os efeitos do PZQ nos vermes fêmeas seguiu com bolhas, coloração enegrecida, aspecto granuloso e contração muscular intensa. O mesmo foi visualizado aos vermes condicionados as diferentes concentrações de juglona. Em 3 horas, foram notadas coloração enegrecida e alteração estrutural, com evidente contratura muscular intensa. Ao passo que o tempo foi transcorrido as lesões se tornaram mais graves, sendo evidenciado bolhas tegumentares, alteração estrutural, com maior intensidade de contração muscular e perda de aderência (Figura 24 A-H).

Figura 24 - Microfotografia de vermes adultos fêmeas de *S. mansoni* (A-H). (A) Vermes cultivados por 120 horas em meio RPMI 1640 e (B) meio com DMSO 1,6% evidenciando ventosas oral e ventral (setas brancas), ovário (seta amarela) e glândulas vitelínicas (seta cinza). (C) PZQ a 10  $\mu$ M, evidenciando bolhas (círculo), e intensa contração muscular (colchete), no tempo de 72 horas. Juglona (D) na concentração de 100  $\mu$ M exibiu contração muscular intensa e sem adesão a placa, em 3 horas de incubação. (E) concentração de 50  $\mu$ M, em 6 horas, evidencia bolhas, contração muscular em forma espiral e aspecto granuloso (seta). (F) a 25  $\mu$ M exibiu contração intensa em forma de espiral e incapacidade de aderência em 24 h. (G) em 12,5  $\mu$ M visualiza-se bolhas, aspecto granuloso, contração muscular, em 72 horas. (H) 6,25  $\mu$ M exibe bolhas no intervalo de 120 horas. Imagens capturadas em 40X.

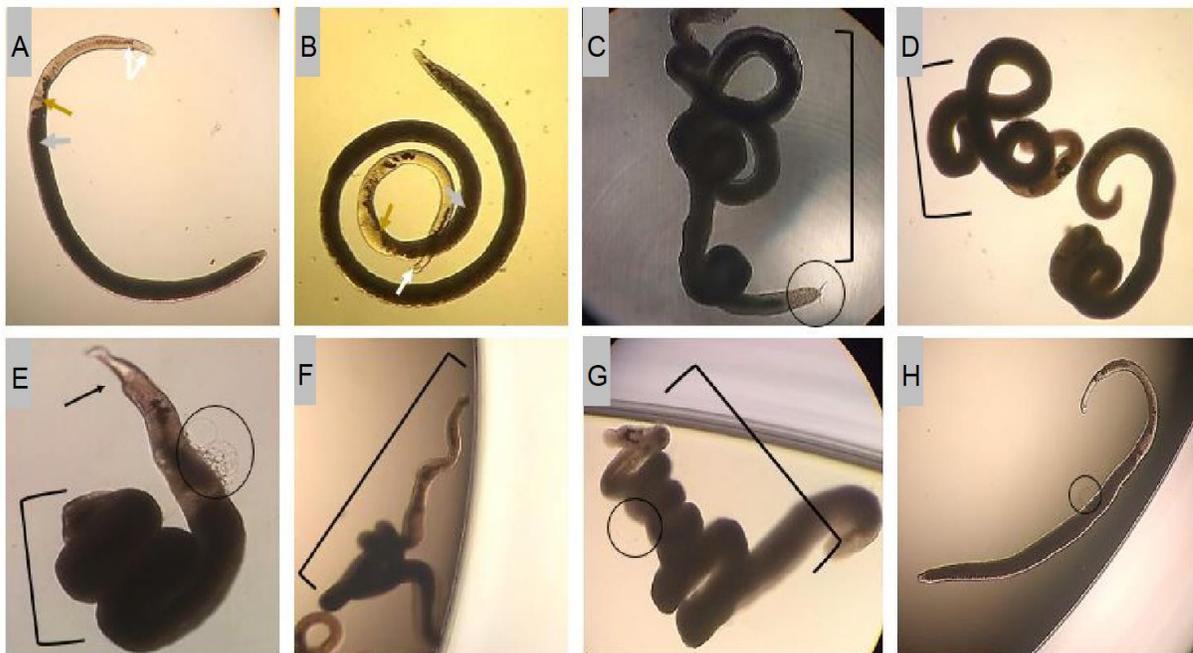


Tabela 5 - Avaliação *in vitro* da susceptibilidade de vermes adultos fêmeas de *Schistosoma mansoni* (cepa BH), controles e tratados com juglona durante 120 horas.

Média de vermes adultos fêmeas de <i>Schistosoma mansoni</i> ± Desvio Padrão e Score de motilidade durante 120 horas (%)																								
Grupos n=8	3h				6h				12h				24h				72h				120h			
	3	2	1	0	3	2	1	0	3	2	1	0	3	2	1	0	3	2	1	0	3	2	1	0
Cntrl DMSO	8±0,0 (100%)				8±0,0 (100%)				8±0,0 (100%)				8±0,0 (100%)				8±0,0 (100%)				8±0,0 (100%)			
Cntrl Meio	8±0,0 (100%)				8±0,0 (100%)				8±0,0 (100%)				8±0,0 (100%)				8±0,0 (100%)				8±0,0 (100%)			
Cntrl PZQ 10µM	8±0,0 (100%)				8±0,0 (100%)				8±0,0 (100%)				5±0,5 (62,7%)	3±0,5 (37,5%)							8±0,0 (100%)			
<b>Juglona</b>																								
100µM				8±0,0 (100%)				8±0,0 (100%)				8±0,0 (100%)				8±0,0 (100%)				8±0,0 (100%)				8±0,0 (100%)
50µM			2±0,5 (25%)	6±0,5 (75%)				8±0,0 (100%)				8±0,0 (100%)				8±0,0 (100%)				8±0,0 (100%)				8±0,0 (100%)
25µM		3±0,5 (37,5%)	1±0,5 (12,5%)	4±1 (50%)	1±0,5 (12,5%)	1±0,5 (12,5%)	6±0,5 (75%)		1±0,5 (12,5%)	1±0,5 (12,5%)	6±0,5 (75%)		1±0,5 (12,5%)	7±0,5 (87,5%)						8±0,0 (100%)				8±0,0 (100%)
12,5µM	5±0,5 (62,7%)	3±0,5 (37,5%)						8±0,0 (100%)	7±0,5 (87,5%)	1±0,5 (12,5%)			5±1,1 (62,7%)	3±1,1 (37,5%)			5±1,1 (62,7%)	2±0,5 (25%)	1±0,5 (12,5%)		2±0,5 (25%)	3±0,5 (37,5%)	3±0,5 (37,5%)	
6,25µM	8±0,0 (100%)				4±0,0 (50%)	4±0,0 (50%)			2±0,0 (25%)	6±0,0 (75%)			1±0,0 (12,5%)	7±0,5 (87,5%)			2±0,0 (25%)	6±0,0 (75%)			2±0,5 (25%)	5±0,0 (62,7%)	1±0,5 (12,5%)	

CL<sub>50</sub>=11,32µM

\*(3) Movimento ondulatório típico; (2) Movimento do corpo reduzido; (1) Imóvel, mas vivo; (0) Morto.

### 5.1.3.3 Efeitos da juglona sobre Casais

A tabela 6 e figura 25 (A-H) descrevem a avaliação *in vitro* da susceptibilidade de casais de *Schistosoma mansoni* (cepa BH), controles e expostos a juglona durante 120 horas. Em 3h de incubação, a concentração 100  $\mu\text{M}$  causou efeito esquistossomicida máximo. No mesmo intervalo de tempo, em 50  $\mu\text{M}$ , foram observadas redução de motilidade em 100% dos vermes, alcançando efeito máximo em 12 h. Na concentração de 25  $\mu\text{M}$  fez-se evidente a redução de motilidade em 72 h, causando mortalidade em 75% ao final do experimento. Em 120 h, em 12,5  $\mu\text{M}$  exibiu 12,5% de morte e 100% de redução de motilidade em 6,25 $\mu\text{M}$ . A  $\text{CL}_{50}$  foi determinada em 19,15  $\mu\text{M}$ . PZQ na concentração de 10  $\mu\text{M}$  causou mortalidade de 96% ao final de 72 horas.

Juglona causou alterações tegumentares contínuas aos casais de *S. mansoni* (cepa BH). Durante 3 horas, foi visualizada contração muscular e irregularidade no tegumento dos vermes expostos a 100  $\mu\text{M}$ . Em seguida, houve aumento do número e tamanho de bolhas no tegumento, indução de aspecto espinhoso e alteração estrutural, com contração muscular evidente, incapacidade de adesão e consequente separação dos vermes. Tais resultados foram comparados com a ação do PZQ que apresentou coloração enegrecida, contração muscular intensa e bolhas tegumentares (Figura 25. A-H)

Figura 25 - Microfotografia de Casais de *S. mansoni* (cepa BH) (A-H). (A) Vermes cultivados por 120 horas em meio RPMI 1640 e (B) meio com DMSO 1,6% evidenciando tegumento íntegro, ventosas orais e ventrais (setas brancas), ovário (seta cinza) e canal ginecóforo. (C) PZQ, 10  $\mu$ M, exibiu bolhas no tegumento (círculo), aspecto granuloso (seta) e contração muscular intensa (colchete), em 72 horas de incubação. Juglona (D) na concentração de 100 $\mu$ M evidenciando contração muscular e irregularidade no tegumento (quadrado), após 3 horas. (E) a 50 $\mu$ M, no tempo de 12 h, exibindo bolhas no tegumento e ventosas (círculo) e sem aderência (seta preta). (F) em 25  $\mu$ M ausência de adesão e bolhas na ventosa, após 24 horas. (G) concentração de 12,5  $\mu$ M com ausência de adesão e incapacidade de pareamento (asterisco), em 72 horas. (H) em 6,25  $\mu$ M exibindo incapacidade de adesão e contração muscular evidenciada pela borda irregular (círculo), em 120 horas. Imagens capturadas em 40X.



Tabela 6 - Avaliação *in vitro* da susceptibilidade de casais de *Schistosoma mansoni* (cepa BH), controles e tratados com juglona durante 120 horas.

Grupos n=4	Média de casais de <i>Schistosoma mansoni</i> ± Desvio Padrão e Score de motilidade durante análise de 120h (%)																							
	3h				6h				12h				24h				72h				120h			
	3	2	1	0	3	2	1	0	3	2	1	0	3	2	1	0	3	2	1	0	3	2	1	0
Cntrl DMSO	4±0,0 (100%)				4±0,0 (100%)				4±0,0 (100%)				4±0,0 (100%)				4±0,0 (100%)				4±0,0 (100%)			
Cntrl Meio	4±0,0 (100%)				4±0,0 (100%)				4±0,0 (100%)				4±0,0 (100%)				4±0,0 (100%)				4±0,0 (100%)			
Cntrl PZQ 10µM			4±0,0 (100%)				4±0,0 (100%)			1±0,0 (25%)	3±0,0 (75%)			1±0,0 (25%)	3±0,0 (75%)					4±0,0 (100%)			4±0,0 (100%)	
<b>Juglona</b>																								
100µM			4±0,0 (100%)				4±0,0 (100%)				4±0,0 (100%)				4±0,0 (100%)					4±0,0 (100%)			4±0,0 (100%)	
50µM		4±0,0 (100%)				2±0,0 (50%)	2±0,0 (50%)				4±0,0 (100%)				4±0,0 (100%)					4±0,0 (100%)			4±0,0 (100%)	
25µM	4±0,0 (100%)				4±0,0 (100%)					1±0,0 (25%)	3±0,5 (75%)			1±0,5 (25%)	3±0,5 (75%)					4±0,0 (100%)			1±0,0 (25%)	3±0,5 (75%)
12,5µM	4±0,0 (100%)				4±0,0 (100%)				4±0,0 (100%)				4±0,0 (100%)				4±0,0 (100%)				1±0,5 (25%)	2±0,5 (50%)	1±0,5 (25%)	
6,25µM	4±0,0 (100%)				4±0,0 (100%)				4±0,0 (100%)				4±0,0 (100%)				4±0,0 (100%)				4±0,0 (100%)			

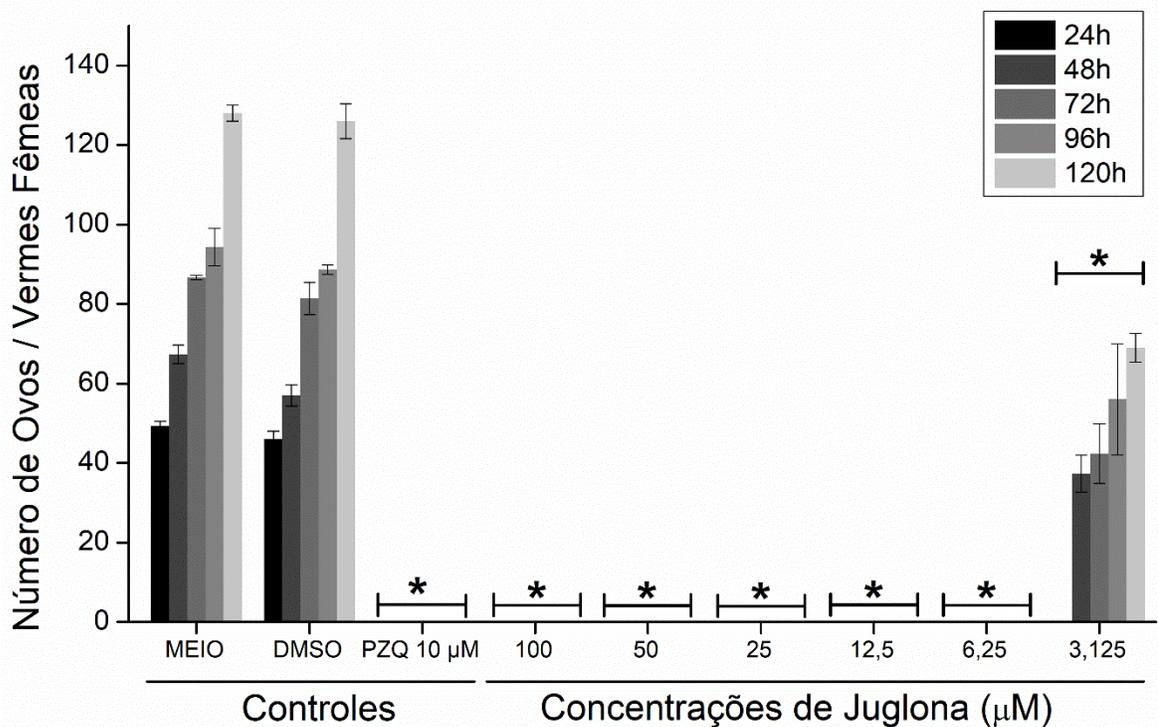
CL<sub>50</sub>=19,15µM

\*(3) Movimento ondulatório típico; (2) Movimento do corpo reduzido; (1) Imóvel, mas vivo; (0) Morto.

## 5.2 Atividade da juglona na oviposição de *S. mansoni*

Os ovos postos por fêmeas acasaladas de *S. mansoni* foram quantificados nos diferentes tempos (24, 48, 96 e 120h) e em diferentes concentrações de juglona (3,125  $\mu$ M, 6,25  $\mu$ M, 12,5  $\mu$ M, 25  $\mu$ M, 50  $\mu$ M e 100  $\mu$ M). Os casais expostos as concentrações entre 6,25-100 $\mu$ M de juglona não apresentaram ovos durante análise, semelhante aos vermes submetidos ao PZQ na concentração de 10  $\mu$ M. Apenas na concentração de 3,125  $\mu$ M de juglona as fêmeas acasaladas foram capazes de ovipor, mas em quantidade significativamente menor ( $p=0,049$ ), quando comparado aos grupos controles (Figura 26).

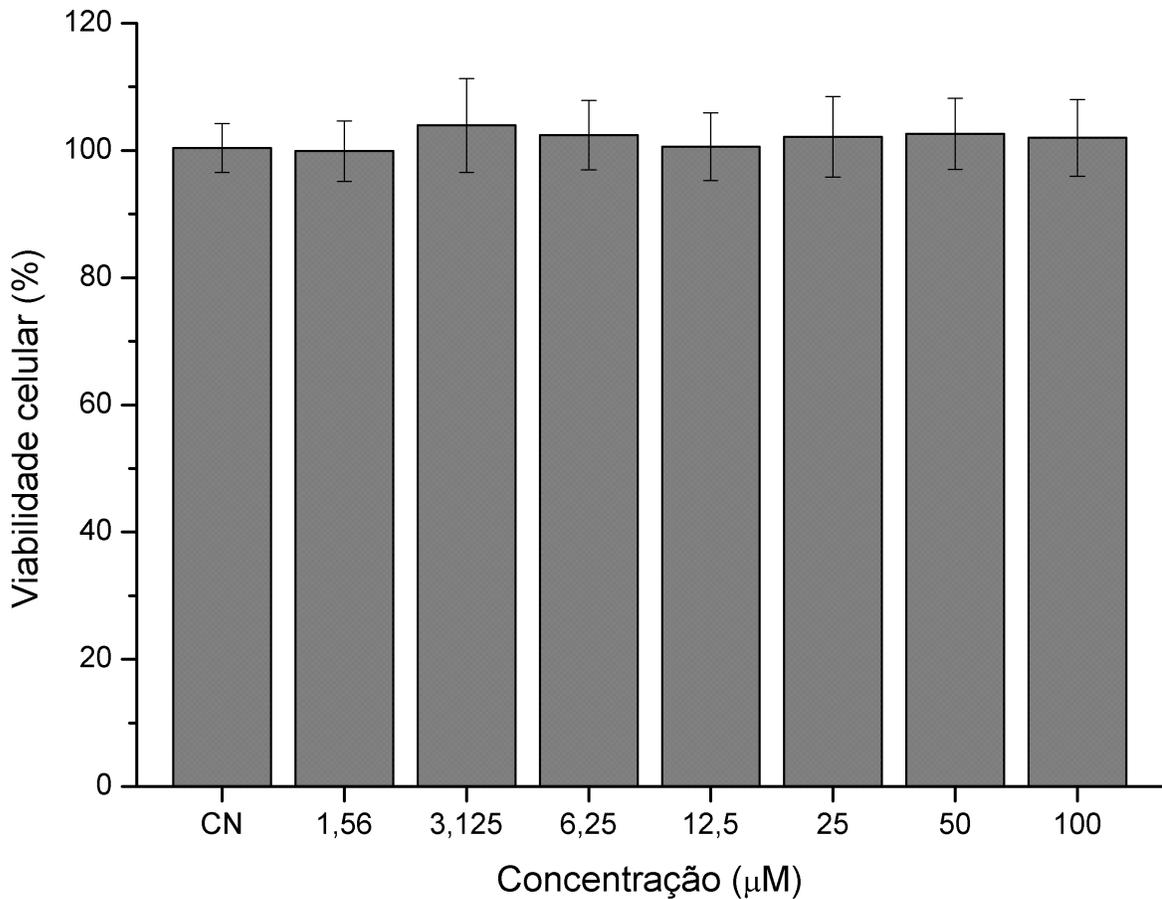
Figura 26 - Influência *in vitro* da juglona sobre oviposição de fêmeas acasaladas de *Schistosoma mansoni* (Cepa BH) durante 120 horas. Valores expressos em média  $\pm$  desvio padrão (DP).



### 5.3.5 Avaliação de citotoxicidade da juglona

A juglona nas concentrações 1,56 a 100  $\mu\text{M}$  não apresentou citotoxicidade sobre esplenócitos murinos quando em contato por 72 horas (figura 27). No teste de viabilidade a concentração inibitória média ( $\text{CI}_{50}$ ) > 100  $\mu\text{M}$ .

Figura 27: Efeito citotóxico da Juglona sobre a cultura primária de Esplenócitos murino após 72h de tratamento, avaliado pelo ensaio do MTT. Valores em média  $\pm$  desvio padrão, analisados por ANOVA, seguido do pós-teste de Bonferroni CN: Controle Negativo (meio de cultura RPMI-1640).



## 6 DISCUSSÃO

A esquistossomose é uma doença endêmica longe da erradicação, visto que o tratamento depende apenas de um fármaco. O praziquantel apresenta baixo custo, fácil administração e eficácia sobre todas as espécies de *Schistosoma* (PARK et al., 2019). Entretanto, a utilização indiscriminada nos tratamentos em massa pode levar a falha terapêutica a qualquer momento, como observado em ensaios de laboratório que o constante contato com doses sub terapêuticas de PZQ são capazes de induzir resistência e/ou tolerância em *Schistosoma* (WANG; WANG; LIANG, 2012).

Além disso, o PZQ não mostra efeito esquistossomicida satisfatório sob formas de vida jovens de *Schistosoma*. Isso acarreta na necessidade de utilização de maior exposição ao PZQ para tratar indivíduos parasitados, visto que é necessário à espera do desenvolvimento completo dos vermes para seguir com tratamento (KAMEL; BAYAUMY, 2017). Assim, o risco de ineficácia do PZQ tem mobilizado a pesquisa de novos compostos esquistossomicidas. Para a triagem da atividade esquistossomicidas são utilizadas moléculas sintéticas, semi sintéticas e de origem natural como as naftoquinonas (AIRES et al., 2014; LAGO et al., 2017; SILVA et al., 2019; ARAÚJO et al., 2020). Tais moléculas são utilizadas em sua forma natural ou a partir de síntese, apresentando atividade promissora contra *Schistosoma* (LORSUWANNARAT et al., 2013; KAPADIA et al., 2017; PAI et al., 2019).

Este é o primeiro estudo que evidencia o potencial esquistossomicida da juglona em todas as formas evolutivas que parasitam o homem. Em nossos resultados esquistossômulos, vermes jovens e adultos (acasalados ou não) de *S. mansoni* (cepa BH) sofreram interferência progressiva de morte, motilidade e modificações (aderência e contração muscular) em diferentes concentrações de juglona, interferindo assim no ciclo biológico do parasito. De acordo com Noel (2008) a função motora e a aderência dos vermes estão relacionadas a liberação de neurotransmissores ou neuromoduladores como serotonina, dopamina e acetilcolina. Estas funções são importantes para *S. mansoni*, pois permitem sua permanência e a transmutação nos órgãos e tecidos humanos, estando relacionados a virulência do parasito no corpo (NOEL, 2008).

Em esquistossômulos de 3 horas e vermes jovens de 21 dias, o efeito esquistossomicida máximo da juglona ocorreu em concentrações expressivamente

menores que o controle praziquantel. É encorajador a capacidade da juglona em reduzir a motilidade e causar mortalidade nas formas mais jovens de *S. mansoni*, visto que o atual tratamento, baseado no uso do praziquantel, não é eficaz sob tais estágios evolutivos (KAMEL e BAYAUMY, 2017).

Acredita-se que essa menor eficácia do PZQ em vermes jovens confere remissão da esquistossomose em áreas endêmicas, em virtude do tratamento limitado que não afeta os vermes jovens. Assim, os vermes alcançam sua maturação sexual com consequente oviposição, responsável pelos principais quadros de morbidade e mortalidade dos indivíduos parasitados (YEPES et al., 2015; KAMEL e BAYAUMY, 2017).

A juglona também induziu morte em vermes adultos acasalados ou não. Estes resultados foram diferenciados de Magalhães e colaboradores (2014), que realizou um estudo sobre potencial esquistossomicida de 19 naftoquinonas apenas contra casais de vermes adultos de *S. mansoni* (cepa LE). Dentre estes compostos, a juglona causou 100% na mortalidade na concentração de 100µM, nas primeiras 24 horas. E, em análise de 72 horas, sua CL<sub>50</sub> frente a vermes acasalados foi de 25 µM. Ainda estudo citado, não foram evidenciados atividade da juglona em vermes jovens e desacasalado, e seu valor de CL<sub>50</sub> foi um pouco maior, provavelmente devido a diferença de cepa utilizada e tempo de análise (MAGALHÃES et al., 2014).

No presente estudo, foram observadas de acordo com a concentração e o tempo, a redução e inibição total da oviposição em fêmeas acasaladas. Tal fato é importante, visto que casais de *S. mansoni* pode sobreviver por anos ovipondo nos órgãos e tecidos humanos (Macmannus et al., 2018). O processo patológico da esquistossomose está na resposta imunogênica ao ovo. A partir dele, é iniciada a resposta inflamatória granulomatosa e subseqüentes quadros de hepatomegalia, esplenomegalia e disfunção de vários tecidos por meio do processo de cicatrização (SCHWARTZ e FALLON, 2018).

Ao longo dos anos, moléculas com capacidade gerar danos no tegumento foram consideradas fortes candidatas a fármacos como é o caso do PZQ e artemeter, um derivado da artemisina (MANNECK et al., 2012; EL-LAKKANY e SEIF, 2013). A análise de tegumento por microscopia óptica evidenciou os efeitos da juglona contra a superfície tegumentar de esquistossômulos, vermes jovens e adultos. Nas Figuras foram evidenciadas rupturas, erosões, bolhas e irregularidades tegumentares, edemas, aspecto

granuloso, contração muscular, incapacidade de adesão e desacasalamento, mesmo em concentrações com baixa taxa de mortalidade.

O tegumento de *Schistosoma* é um dos alvos terapêuticos mais importantes, pois desempenha múltiplas funções afim de garantir sua sobrevivência no hospedeiro definitivo (BRITO et al., 2017). A superfície tegumentar é uma camada de células sinciciais que confere proteção e adaptação dos vermes às variações de meio ambiente, durante o parasitismo (WENDT e COLLINS, 2020). Além disso, auxilia na evasão do sistema imune, permite o mimetismo antigênico, regula íons  $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $H^+$  e  $Ca^{2+}$  e possibilita a passagem de nutrientes essenciais para o interior do verme (ácidos graxos, carboidratos e proteínas) (SKELLY e WILSON, 2006; SILVA et al., 2019).

Além disso, o tegumento dos vermes é rico em mitocôndrias, as quais podem ser alvos terapêuticos (AIRES et al., 2014). Estudos *in vitro*, descreveram a ação da juglona em mitocôndrias isoladas. A juglona por meio do estresse oxidativo é capaz de induzir alteração na permeabilidade da membrana mitocondrial levando ao processo conhecido como desacoplamento mitocondrial (JI et al., 2016). Por meio disso, ocorre diminuição na produção de ATP, acarretando em um desequilíbrio osmótico das membranas celulares com desregulação de bombas e canais dependentes de energia. Os íons  $Na^+$  e  $K^+$ , se desregulam ocasionando acúmulo de líquido (edema), podendo gerar rupturas (SESHADRI et al., 2011; BONORA; PINTON, 2014; JI et al., 2016). Ainda, ocorre aumento acentuado de fatores pró apoptóticos com subsequente liberação de Citocromo C citosólico, ativação do sistema Caspase 3 e morte celular (CHENG et al., 2011; SESHADRI et al., 2011).

Alterações tegumentares similares foram visualizados em *S. mansoni* expostos a plumbagina, uma naftoquinona análoga da juglona (LORSUWANNARAT et al., 2013). A plumbagina demonstrou atividade esquistossomicida *in vitro* sobre vermes adultos machos e fêmeas desacasalados a partir da concentração 1  $\mu\text{g/mL}$ . Foram relatadas alterações como edema, bolhas, rachaduras, superfície rugosa e aparência fibrosa no tegumento de *S. mansoni* em função do tempo e concentração, assim como no presente estudo (LORSUWANNARAT et al., 2013).

Nesse mesmo sentido, Aires e colaboradores (2014) demonstraram também o impacto de uma naftoquinona contra *S. mansoni* (cepa BH). Em 24 horas, o composto  $\beta$ -

lapachona induziu morte em 100% dos vermes adultos machos expostos a concentração de 100 $\mu$ M. Além disso, a  $\beta$ -lapachona foi capaz de alterar o tegumento com redução de espinhos, descamação e erosão, formação de bolhas e ruptura, com aparecimento de lesões originando aparência fibrosa, mas os vermes não foram encurtados como aqueles expostos ao PZQ (AIRES et al., 2012, 2014).

O mecanismo de ação da juglona frente a *Schistosoma* ainda não foi devidamente elucidada. Entretanto sua característica estrutural dá suporte para pressupor as principais vias esquistossomicidas. A juglona é um composto natural fenólico comumente extraído de caules, folhas, frutos das plantas da família Juglandaceae, que possui em sua estrutura o anel naftoquinônico. Sua estrutura fornece boa permeabilidade em membranas celulares e aptidão em interferir no ciclo redox de células tumorais e de células dos microorganismos (CATANZARO et al., 2018). A grande habilidade desse composto é de sofrer facilmente redução enzimática, responsável pela geração de espécies que reagem ao oxigênio (EROS) ( $O_2^- \bullet$ ,  $HO\bullet$ ,  $1O_2$  e  $H_2O_2$ ) (SESHADRI et al., 2011). Por meio disso, a juglona pode promover a hipóxia intracelular, com subsequente produção de super ânions, aumentando a peroxidação lipídica e a desorganização de macromoléculas (proteínas, ácidos nucleicos e enzimas) (AHMAD e SUZUKI, 2019). Trata-se de um dos mecanismos relatado como responsável pela atividade citotóxica, antimicrobiana e antiparasitária.

A ação da juglona aparenta estar relacionada com sua capacidade de gerar espécies reativas de oxigênio (SESHADRI et al., 2011). Estudos proteômicos demonstraram que *S. mansoni* apresenta apenas uma enzima responsável pelo controle do estresse oxidativo, denominada Glutathiona Tiorredoxina redutase de *Schistosoma mansoni* (SmTGR) (LYU et al., 2020). Acredita-se que a SmTGR é multifuncional e desempenha o papel de glutathiona redutase e Tireodozina redutase, que estão presentes em eucariotos (ALGER e WILLIAMS, 2002). Estudos *in vitro*, induziram a supressão de RNA da SmTGR matando 92% dos vermes adultos de *S. mansoni* (KUNTZ et al., 2007). Além disso, o uso de compostos capazes de inibir TRG, como é o caso de auranofina, tártarato de potássio, antimolínico e oltipraz, resultou em morte em 100% de *S. mansoni* ( SAYED et al., 2008; PRAST-NIELSEN; HUANG; WILLIAMS, 2011; WILLIAMS et al.,

2012). Tais achados demonstram que a SmTGR é crucial na sobrevivência do parasito, mostrando-se como um alvo terapêutico em potencial.

Os compostos 1,4-naftoquinônicos são considerados potenciais inibidores de SmTGR em vermes adultos de *S. mansoni*. Johann e colaboradores (2015) identificaram os diferentes compostos 1,4-naftoquinônicos que agiram como antagonistas competitivos ou bloqueadores de SmTGR. Nesse mesmo estudo, o composto juglona obteve destaque por apresentar um mecanismo de ação diferente dos demais, visto que foi a molécula que menos sofreu alterações na presença do selênio, que compete pelo sítio ativo da enzima. Esses resultados podem nortear o meio que a juglona mata os diferentes estágios evolutivos de *S. mansoni* (LANFRANCHI et al., 2012; JOHANN et al., 2015).

Em relação a citotoxicidade em esplenócitos, as concentrações de juglona avaliadas nas diferentes fases evolutivas de *S. mansoni* (cepa BH), não foram capazes de alterar a viabilidade celular de esplenócitos durante 72 horas. Este resultado corrobora com ensaios realizados utilizando as naftoquinonas biflorina, extraída de *Capraria biflora* L, e um derivado da  $\beta$ -lapachona, R72. Estas moléculas também não apresentaram efeitos citotóxicos em esplenócitos nas concentrações até 100 e 200  $\mu$ M, respectivamente (SILVA et al., 2019b). Em contrapartida, Neves e colaboradores (2011) demonstraram que o PZQ causou redução na viabilidade de esplenócitos murinos tratados com 1  $\mu$ M de PZQ durante 72 horas. Foi evidenciado que o praziquantel apesar de possuir boa ação esquistossomicida, desencadeou apoptose e necrose dos esplenócitos tratados (NEVES et al., 2011b).

Os efeitos da juglona em linhagens celulares saudáveis são controversos, visto que apresentam concentrações inibitórias médias variando entre 8,1-28,7  $\mu$ M para fibroblastos L929, queratinócitos, macrófagos e células mononucleares de sangue periférico, respectivamente, e apresenta hemólise em concentrações altas (>200  $\mu$ g/mL) (ERISEN et al., 2020; INBARAJ; CHIGNELL, 2004; MARTINS et al., 2015; MONTENEGRO et al., 2010). Esta diferença na citotoxicidade pode ser atribuída aos diferentes mecanismos de ação mencionados.

No entanto, ressalta-se que os compostos com potencial farmacológico podem ser otimizados a partir de modificação química (derivados) (ANAISSI-AFONSO et al., 2018), associados a excipientes farmacológicos (OLIVEIRA; SANTOS; COELHO, 2009), ou,

ainda, em associação com outros compostos (ALMEIDA et al., 2015), a fim de diminuir os efeitos nocivos que possam atuar nos sistemas biológicos humanos.

## 7 PERSPECTIVAS

Avaliar sob microscópio eletrônico de varredura as alterações tegumentares em maior detalhe, visto que concentrações testadas demonstraram resultados promissores nos tegumentos dos diferentes estágios evolutivos de *S. mansoni* (cepa BH);

Investigar *in vivo* composto juglona com intuito de excluir as limitações dos ensaios *in vitro*;

Analisar *in vitro* a associação da juglona com outros compostos esquistossomicidas, inclusive o PZQ, frente a *S. mansoni* (cepa BH).

## 8 CONCLUSÃO

Diante do exposto, pode-se concluir que a juglona (5-hidroxi-1,4-naftoquinona) apresentou atividade esquistossomicida *in vitro* frente ao parasito *Schistosoma mansoni* (cepa BH).

Juglona foi capaz de gerar mortalidade em todas as fases de vida de *S. mansoni* que acometem os hospedeiros definitivos (esquistossômulos, vermes jovens e adultos, acasalados ou não), além de causar redução de motilidade, danos tegumentares, inibição na oviposição e desacasalamento em adultos de *S. mansoni*.

Em adição, nenhum efeito citotóxico da juglona foi visualizado sob cultura primária de células esplênicas de murinos.

## REFERÊNCIAS

- AHMAD, T.; KHAN, T.; SHAH, A. J. Juglone as antihypertensive agent acts through multiple vascular mechanisms. **Clinical and Experimental Hypertension**, v. 42, n. 4, p. 1–10, 2019.
- AHMAD, T.; SUZUKI, Y. J. Juglone in Oxidative Stress and Cell Signaling. **Antioxidants**, v. 8, p. 91, 2019.
- AIRES, A. D. L. et al. Immunohistopathological changes in murine Schistosomiasis mansoni under the influence of N-acetyl-L-cysteine. **Parasitology Research**, v. 111, n. 4, p. 1569–1578, 2012.
- AIRES, A. D. L. et al.  $\beta$ -Lapachone: A naphthoquinone with promising antischistosomal properties in mice. **Phytomedicine**, v. 21, n. 3, p. 261–267, 2014.
- ALGER, H. M.; WILLIAMS, L. The disulfide redox system of *Schistosoma mansoni* and the importance of a multifunctional enzyme, thioredoxin glutathione. **Molecular & Biochemical Parasitology**, v. 121, p. 129–139, 2002.
- ALMEIDA, G. T. et al. Synergy of Omeprazole and Praziquantel in vitro Treatment against *Schistosoma mansoni* Adult Worms. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 9, p. 1–23, 2015.
- ANAISSE-AFONSO, L. et al. Lawsone, Juglone, and  $\beta$ -Lapachone Derivatives with Enhanced Mitochondrial-Based Toxicity. **ACS Chemical Biology**, v. 13, p. 1950–1957, 2018.
- ARAÚJO, H. D. A. et al. In vitro activity of usnic acid potassium salt against different developmental stages of *Schistosoma mansoni*: An ultrastructural study. **Acta Tropica**, v. 201, p. 105159, 2020.
- BARBOSA, C. S. et al. Inquérito Malacológico em Localidades Endêmicas para Esquistossomose em Pernambuco, Brasil. **Revista Eletrônica Acervo Saúde**, v. 11, n. 14, p. e1235–e1235, 2018.
- BAYRAM, D. et al. Determination of Apoptotic Effect of Juglone on Human Bladder Cancer TCC-SUP and RT-4 Cells: An in vitro Study. **J. Environ Pathol Toxicol Oncol.**, v. 37, n. 2, p. 173–181, 2018.
- BERGQUIST, R.; UTZINGER, J.; KEISER, J. Controlling schistosomiasis with praziquantel: How much longer without a viable alternative? **Infectious Diseases of Poverty**, v. 6, n. 1, p. 1–10, 2017.
- BERTÃO, H. G.; ALEXANDRE, R.; PADILHA, R. J. R. Ultrastructural analysis of miltefosine-induced surface membrane damage in adult *Schistosoma mansoni* BH strain

worms. **Parasitology Research**, v. 110, n. 6, p. 2465–2473, 2012.

BOLTON, J. L.; DUNLAP, T. Formation and Biological Targets of Quinones: Cytotoxic versus Cytoprotective Effects. **Chemical Research in Toxicology**, v. 30, n. 1, p. 13–37, 2017.

BONORA, M.; PINTON, P. The mitochondrial permeability transition pore and cancer : molecular mechanisms involved in cell death. **Frontiers in oncology**, v. 4, p. 302, 2014.

BORREGO-SÁNCHEZ, A. et al. Biopharmaceutical improvement of praziquantel by interaction with montmorillonite and sepiolite. **Applied Clay Science**, v. 60, p. 173–179, 2017.

BOTROS, S. et al. Current status of sensitivity to praziquantel in a focus of potential drug resistance in Egypt. **International Journal for Parasitology**, v. 35, p. 787–791, 2005.

BOTROS, S. S. et al. Praziquantel resistance. **Expert Opinion on Drug Discovery**, v. 2, n. sup.1, p. 35–40, 2007.

BRACHS, S.; HAAS, W. Swimming behaviour of *Schistosoma mansoni* cercariae : responses to irradiance changes and skin attractants. **Parasitology Research**, v. 102, p. 685–690, 2008.

BRITO, M. R. M. DE et al. Cyclohexene-fused 1,3-oxazines with selective antibacterial and antiparasitic action and low cytotoxic effects. **Toxicology in Vitro**, v. 44, p. 273–279, 2017.

BRUUN, B.; AAGAARD-HANSEN, J. **The sociocultural context of schistosomiasis control: current knowledge and future research needs**. (O. M. de Saúde, Ed.) Report of the Scientific Working Group meeting on Schistosomiasis. **Anais...2007**

BULANTOVÁ, J.; HORÁK, P.; MIKE, L. Cercarial dermatitis : a systematic follow-up study of human cases with implications for diagnostics. **Parasitology Research**, 2018.

CAMACHO, M.; AGNEW, A. *Schistosoma*: Rate of glucose import is altered by acetylcholine interaction with tegumental acetylcholine receptors and acetylcholinesterase. **Experimental Parasitology**, v. 81, p. 584–591, 1995.

CAROD-ARTAL, F. J. et al. Neurological Syndromes or Diseases Caused by Parasites in Tropical Areas. In: **Neuroepidemiology in Tropical Health**. Academic Press, 2018. p. 231–244.

CARVALHO, O. DOS S. C. et al. **Moluscos Brasileiros de Importância Médica**. 2<sup>a</sup> ed. Belo Horizonte: FIOCRUZ, 2008.

CATANZARO, E. et al. Natural Products to Fight Cancer : A Focus on *Juglans regia*. **toxins**, v. 10, p. 469, 2018.

- CHAIRMAN, P. G. N. K. et al. Review of the genotoxicity and carcinogenicity of antischistosomal drugs; is there a case for a study of mutation epidemiology? **Mutation Research**, v. 257, p. 49–89, 1991.
- CHENG, Y.; GULBINS, E.; SIEMEN, D. Cellular Physiology and Biochemistry Activation of the Permeability Transition Pore by Bax via Inhibition of the Mitochondrial BK Channel. **Cell Physiol Biochem**, v. 49, n. 0, p. 191–200, 2011.
- CHUAH, C. et al. Cellular and chemokine-mediated regulation in schistosome-induced hepatic pathology. **Trends in Parasitology**, p. 1–10, 2014.
- CIOLI, D. et al. Determination of ED50 values for praziquantel in praziquantel-resistant and -susceptible *Schistosoma mansoni* isolates. **International Journal for Parasitology**, v. 34, n. 8, p. 979–987, 2004.
- CLARK, A. M.; JURGENS, T. M.; HUFFORD, C. D. Antimicrobial Activity of Juglone. **Phytotherapy Research**, v. 4, n. 1, p. 11–14, 1990.
- COLLEY, D. et al. Human schistosomiasis. **Lancet.**, v. 383, n. 9936, p. 2253–2264, 2014.
- COSTA, C. DE S. et al. Programa de Controle da Esquistossomose: avaliação da implantação em três municípios da Zona da Mata de Pernambuco, Brasil. **Saúde em Debate**, v. 41, p. 229–241, 2017.
- COUTO, F. F. B. et al. *Schistosoma mansoni*: A method for inducing resistance to praziquantel using infected *Biomphalaria glabrata* snails. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 106, n. 2, p. 153–157, 2011.
- CRUZ, F. O. Farmanguinhos praziquantel. p. 1–8, 2016.
- DAMA L.B. AND JADHAV B.V. Anthelmintic effect of Juglone on mature and Immature *Hymenolepis nana* in mice. **Rivista di Parassitologia**, n. 2, p. 301–302, 1997.
- DIDIER, A. et al. Structural and Antioxidant Properties of Compounds Obtained from Fe<sup>2+</sup> + Chelation by Juglone and Two of Its Derivatives : DFT , QAIM , and NBO Studies. **Bioinorganic Chemistry and Applications**, v. 2016, p. 1–13, 2016.
- DOMLING, A.; KHOURY, K. Praziquantel and Schistosomiasis. **ChemMedChem**, n. 5, p. 1420–1434, 2010.
- DORSEY, C. H. et al. Ultrastructure of the *Schistosoma mansoni* cercaria. **Micron**, v. 33, p. 279–323, 2002.
- EL-LAKKANY, N. M.; SEIF, S. H. Haemin enhances the in vivo efficacy of artemether against juvenile and adult *Schistosoma mansoni* in mice. **Parasitology International**, v. 112, p. 2005–2015, 2013.

ELLENDORFF, T. et al. PLS-Prediction and Confirmation of Hydrojuglone Glucoside as the Antitrypanosomal Constituent of Juglans Spp. **Molecules**, p. 10082–10094, 2015.

ERISEN, S. et al. Cytotoxic and mutagenic potential of juglone : a comparison of free and nano-encapsulated form. **Arh Hig Rada Toksikol**, v. 71, p. 69–77, 2020.

GALAS, M. et al. The Peptidylprolyl cis / trans -Isomerase Pin1 Modulates Stress-induced Dephosphorylation of Tau in Neurons Implication in a Pathological Mechanism Related to Alzheimer Disease. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 28, p. 19296–19304, 2006.

GRIMES, J. E. T. et al. The roles of water , sanitation and hygiene in reducing schistosomiasis : a review. **Parasites & Vectors**, v. 8, n. 1, p. 1–16, 2015.

HAEBERLEIN, S.; HAAS, W. Chemical attractants of human skin for swimming Schistosoma mansoni cercariae. **Parasitology Research**, v. 102, n. 4, p. 657–662, 2008.

HAMS, E.; AVIELLO, G.; FALLON, P. G. The Schistosoma granuloma : friend or foe ? **Frontiers in Immunology**, v. 4, n. 89, p. 1–9, 2013.

HAN, Z. et al. Schistosoma Genomics : New Perspectives on Schistosome Biology and Host-Parasite Interaction. **The Annual Review of Genomics and Human Genetics**, v. 10, p. 211–40, 2009.

HONG, S. Albendazole and Praziquantel : Review and Safety Monitoring in Korea. **Infection & Chemotherapy**, v. 50, n. 1, p. 1–10, 2018.

HOTEZ, P. J. et al. Advancing the Development of a Human Schistosomiasis Vaccine. **Trends in Parasitology**, v. 35, n. 2, p. 12–16, 2019.

INBARAJ, J. J.; CHIGNELL, C. F. Cytotoxic Action of Juglone and Plumbagin : A Mechanistic Study Using HaCaT Keratinocytes. **Chemical Research in Toxicology**, v. 17, n. 1, p. 55–62, 2004.

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

ISMAIL, M. et al. Laboratory induced resistance to praziquantel in experimental schistosomiasis. **Journal of the Egyptian Society of Parasitology**, v. 24, p. 685–695, 1994.

JI, Y. B. et al. Mechanism of juglone-induced apoptosis of MCF-7 cells by the mitochondrial pathway. **Genetics and Molecular Research**, v. 15, n. 3, 2016.

JO, M. et al. Combination Anthelmintic / Antioxidant Activity Against Schistosoma

Mansoni. **Biomolecules**, v. 9, p. 1–19, 2019.

JOHANN, L. et al. Synthesis and evaluation of 1,4-naphthoquinone ether derivatives as Sm TGR inhibitors and new anti-schistosomal drugs. **The FEBS Journal**, v. 282, p. 3199–3217, 2015.

JORDENS, J. et al. The Protein Phosphatase 2A Phosphatase Activator Is a Novel Peptidyl-Prolyl cis/trans- Isomerase. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 10, p. 6349–6357, 2006.

KAMEL, R. O. A.; BAYAUMY, F. E. Z. A. Ultrastructural alterations in *Schistosoma mansoni* juvenile and adult male worms after in vitro incubation with primaquine. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 112, n. 4, p. 247–254, 2017.

KAPADIA, G. J. et al. Acta Tropica Antiparasitic activity of menadione ( vitamin K 3 ) against *Schistosoma mansoni* in BABL / c mice. **Acta Tropica**, v. 167, p. 163–173, 2017.

KATZ, N. **Inquérito Nacional de Prevalência da Esquistossomose mansoni e Geohelmintoses**. Belo Horizonte, 2018.

KESAVAPANY, S. et al. Inhibition of Pin1 Reduces Glutamate-induced Perikaryal Accumulation of Phosphorylated Neurofilament-H in Neurons. **Molecular Biology of the Cell**, v. 18, n. September, p. 3645–3655, 2007.

KIRAN AITHAL, B. et al. Juglone, a naphthoquinone from walnut, exerts cytotoxic and genotoxic effects against cultured melanoma tumor cells. **Cell Biology International**, v. 33, n. 10, p. 1039–1049, 2009.

KOLÁŘOVÁ, L. et al. Cercarial Dermatitis, a Neglected Allergic Disease. **Clinical Reviews in Allergy & Immunology**, v. 45, p. 63–74, 2013.

KONG, Y. et al. Natural product juglone targets three key enzymes from *Helicobacter pylori* : inhibition assay with crystal structure characterization. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 29, n. 7, p. 870–876, 2008.

KOVAC, J.; VARGAS, M.; KEISER, J. In vitro and in vivo activity of R- and S-praziquantel enantiomers and the main human metabolite trans-4-hydroxy-praziquantel against *Schistosoma haematobium*. **Parasites & Vectors**, n. 10, p. 3–7, 2017.

KRAUTZ-PETERSON, G. et al. Amino Acid Transport in Schistosomes: Characterization of the Permesaseheavy chain SPRM1hc. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 282, p. 21767–21775, 2007.

KUNTZ, A. N. et al. Thioredoxin Glutathione Reductase from *Schistosoma mansoni* : An Essential Parasite Enzyme and a Key Drug Target. **PLoS Med**, v. 4, n. 6, 2007.

- L.B., D. et al. "Effect of Herbal "Juglone" on Development of the plant parasitic nematode (*Meloidogyne* Spp.) on *Arachis hypogaea*. **Ecotoxicol. Environ. Monit**, n. 9, p. 73–75, 1999.
- LAGO, E. M. et al. Antischistosomal agents : state of art and perspectives. **Future Medicinal Chemistry**, v. 10, n. 1, p. 89–120, 2017.
- LANDA, P. et al. Redox and Non-Redox Mechanism of In Vitro Cyclooxygenase Inhibition by Natural Quinones. **Planta Medica**, v. 78, n. 04, p. 326–333, 2012.
- LANFRANCHI, D. A. et al. Synthesis and Biological Evaluation of 1,4-Naphthoquinones and Quinoline-5,8-diones as Antimalarial and Schistosomicidal Agents. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 10, n. 31, p. 6375–6487, 2012.
- LANGENBERG, M. C. C. et al. **Katayama Syndrome Without Schistosoma mansoni Eggs**, 2019.
- LEAL NETO, O. B. et al. Biological and environmental factors associated with risk of schistosomiasis mansoni transmission in Porto de Galinhas, Pernambuco State, Brazil. **Cad Saude Publica**, v. 29, n. 2, p. 357–367, 2013.
- LEVY, B. **Novo método rápido e barato para o diagnóstico da esquistossomose**. Disponível em: <<http://www.fiocruz.br/ioc/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?infoid=511&sid=32&tpl=printerview>>. Acesso em: 2 jun. 2018.
- LORSUWANNARAT, N. et al. The anthelmintic effect of plumbagin on *Schistosoma mansoni*. **Experimental Parasitology**, v. 133, n. 1, p. 18–27, 2013.
- LYU, H. et al. Characterization of lead compounds targeting the selenoprotein thioredoxin glutathione reductase for treatment of schistosomiasis. **Infectious Diseases**, v. 6, n. 3, p. 393–405, 2020.
- MAGALHÃES, L. G. et al. Journal of Tropical Diseases Chemoprevention of Schistosomiasis : In vitro Antiparasitic Activity of Nineteen Plant-derived and Synthetic Simple Naphthoquinones and Naphthols against *Schistosoma Mansoni* Adult Worms. **Journal of Tropical Diseases**, v. 2, n. 4, 2014.
- MANNECK, T.; HAGGENMÜLLER, Y.; KEISER, J. Morphological effects and tegumental alterations induced by mefloquine on schistosomula and adult flukes of *Schistosoma mansoni* Morphological effects and tegumental alterations induced by mefloquine on schistosomula and adult flukes of *Schistosoma mansoni*. **Parasitology**, v. 137, n. 01, p. 85–98, 2012.
- MARTINS, S. et al. Schistosomiasis in Southern Brazil 17 years after the confirmation of the first autochthonous case. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 48, n. 3, p. 354–357, 2015.

MARYON P. STRUGSTAD & SAŠKO DESPOTOVSKI. and Potential Uses of Juglone : A Literature Review. **Journal of Ecosystems and Management**, v. 13, n. 3, p. 1–16, 2012.

MCMANUS, D. P. et al. Schistosomiasis. **Nature reviews**, v. 4, n. 13, p. 1–19, 2018.

MELMAN, S. D. et al. Reduced Susceptibility to Praziquantel among Naturally Occurring Kenyan Isolates of *Schistosoma mansoni*. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 3, n. 8, p. 504, 2009.

MENDONÇA, A. M. B. et al. The susceptibility of recent isolates of *Schistosoma mansoni* to Praziquantel. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, v. 58, p. 3–8, 2016.

METWALY, E. E. A. et al. Evaluation of Plubagin as a potencial therapeutic agent. **Journal of the Egyptian Society of Parasitology**, v. 50, n. 1, p. 1–9, 2020.

MEULEMAN, E. A.; HOLZMANN, P. J.; PEET, R. C. **The Development of Daughter Sporocysts Inside the Mother Sporocyst of *Schistosoma mansoni* with Special Reference to the Ultrastructure of Body wall.** Parasitology Research. **Anais...**1980  
MEYER, T. et al. Taste , A New Incentive to Switch to ( R ) -Praziquantel in Schistosomiasis Treatment. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 3, n. 1, p. 3–7, 2009.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **PORTARIA Nº 104, DE 25 DE JANEIRO DE 2011.**

Disponível em:

<[http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2011/prt0104\\_25\\_01\\_2011.html](http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2011/prt0104_25_01_2011.html)>.

Acesso em: 13 out. 2020.

MONTENEGRO, R. C. et al. Cytotoxic activity of naphthoquinones with special emphasis on juglone and its 5- O -methyl derivative. **Chemico-Biological Interactions**, v. 184, p. 439–448, 2010.

MONTRESOR, A. et al. Preventive chemotherapy to control soil-transmitted helminthiasis averted more than 500 000 DALYs in 2015. **Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 111, p. 457–463, 2017.

MS/SVS/GT PCE. **DATASUS**. Disponível em:

<<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/defthtm.exe?sinan/pce/cnv/pcedf.def>>.

MS, M. DA S. **Esquistossomose: situação epidemiológica.** Disponível em:

<<http://www.saude.gov.br/saude-de-a-z/esquistossomose/situacao-epidemiologica#:~:text=No mundo - A esquistossomose mansoni,do Caribe%2C Venezuela e Brasil.>>. Acesso em: 20 jun. 2020a.

MS, M. DA S. Número de casos de esquistossomose na área não endêmica. Brasil, 2003 a 2015. p. 6311, 2017b.

MS, M. DA S. DO B. **Vigilância da Esquistossomose Mansoni - Diretrizes técnicas.**

4ª ed. Brasília: Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica, 2014.

MS, M. DA S. DO B. **Guia de vigilância em saúde**. 1ª ed. Brasília: Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Coordenação-Geral de Desenvolvimento da Epidemiologia em Serviços., 2017c. v. 3

NACIF-PIMENTA, R. et al. Schistosoma mansoni in susceptible and resistant snail strains Biomphalaria tenagophila. **PLoS**, v. 7, n. 9, p. e45637, 2012.

NEVES, D. P. **Parasitologia Humana**. 11ª ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 2004.

NEVES, D. P. et al. **Parasitologia Humana**. 12. ed. Atheneu, 2010.

NEVES, J. K. A. L. et al. Antischistosomal action of thioxo-imidazolidine compounds : An ultrastructural and cytotoxicity study. **Experimental Parasitology**, v. 128, n. 1, p. 82–90, 2011b.

NOEL, F. Sistema neuromuscular e controle da motilidade do verme adulto. In: **Schistosoma mansoni & Esquistossomose: Uma visão Interdisciplinar**. 1. ed. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 2008. p. 207–244.

OLIVEIRA, R.; SANTOS, D.; COELHO, P. Ciclodextrinas: formação de complexos e sua aplicação farmacêutica. **Revista da Faculdade de Ciências da Saude**, v. 6, p. 70–83, 2009.

OLLIARO, P.; DELGADO-ROMERO, P.; KEISER, J. The little we know about the pharmacokinetics and pharmacodynamics of praziquantel ( racemate and R -enantiomer ). **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, n. 69, p. 863–870, 2014.

PAI, S. A. et al. Biomedicine & Pharmacotherapy Plumbagin reduces obesity and nonalcoholic fatty liver disease induced by fructose in rats through regulation of lipid metabolism , inflammation and oxidative stress. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 111, n. December 2018, p. 686–694, 2019.

PAREDES, H. et al. Spatial pattern, water use and risk levels associated with the transmission of schistosomiasis on the north coast of Pernambuco, Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 26, n. 5, p. 1013–1023, 2010.

PARK, S. et al. The anthelmintic drug praziquantel activates a schistosome. **Journal of Biological Chemistry**, v. 294, n. 49, p. 18873–18880, 2019.

PEREIRA, A. S. A. et al. Morphological and morphometric study of cercariae and adult worms of Schistosoma mansoni ( SLM strain ) isolated from infected mice. **Parasitology Research**, 2012.

PERNAMBUCO, S. E. DA S. DE. **Plano Integrado de Ações para o Enfretamento às**

**Doenças Negligenciadas no Estado de Pernambuco/ SANAR**. 2. ed. Recife: Secretaria Estadual de Saúde. Secretaria Executiva de Vigilância em Saúde., 2018. v. 5  
PFIZER, L. **Oxamniquina** Guarulhos, 2013.

PINTO, A. V. et al. Schistosomiasis mansoni: blocking of cercarial penetration by chemical agents: I. Naphthoquinones and derivatives. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 7, n. 2, p. 133–135, 1977.

PRAST-NIELSEN, S.; HUANG, H.; WILLIAMS, D. L. Biochimica et Biophysica Acta Thioredoxin glutathione reductase : Its role in redox biology and potential as a target for drugs against neglected diseases. **BBA - General Subjects**, v. 1810, n. 12, p. 1262–1271, 2011.

REESE, S. et al. The Pin 1 inhibitor juglone attenuates kidney fibrogenesis via Pin 1-independent mechanisms in the unilateral ureteral occlusion model. **Fibrogenesis & Tissue Repair**, v. 1, p. 1–8, 2010.

REY, L. **Bases da Parasitologia Médica** (E. G. Koogan, Ed.), 2001.

RIBEIRO, K. A. L. et al. 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**, v. 111, p. 44–50, 2009.

RUGEL, A. R. et al. Why does oxamniquine kill *Schistosoma mansoni* and not *S. haematobium* and *S. japonicum* ? **IJP: Drugs and Drug Resistance**, v. 13, p. 8–15, 2020.

SAJADIMAJD, S.; YAZDANPARAST, R.; ROSHANZAMIR, F. Augmentation of oxidative stress-induced apoptosis in MCF7 cells by ascorbate – tamoxifen and / or ascorbate – juglone treatments. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal**, v. 52, n. 2, p. 193–203, 2015.

SALVADOR-RECATALÀ, V.; SCHNEIDER, T.; GREENBERG, R. M. Atypical properties of a conventional calcium channel  $\beta$  subunit from the platyhelminth *Schistosoma mansoni*. **BMC Physiology**, v. 11, p. 1–11, 2008.

SANTOS, V. H. B. DOS. **Avaliação da Atividade Esquistossomicida da Associação  $\beta$ -Lapachona/Praziquantel**. UFPE, 2018. Dissertação de Mestrado.

SAYED, A. A. et al. Identification of oxadiazoles as new drug leads for the control of schistosomiasis. **Nature Medicine**, v. 14, n. 4, p. 407–412, 2008.

SCHULZ, J. D. et al. Preventive Chemotherapy in the Fight against Soil-Transmitted Helminthiasis : Achievements and Limitations. **Trends in Parasitology**, v. 34, n. 7, p. 1–13, 2018.

SCHWARTZ, C.; FALLON, P. G. *Schistosoma* “ Eggs-lting ” the Host : Granuloma

Formation and Egg Excretion. **Frontiers in Immunology**, v. 9, n. October, p. 1–16, 2018.

SESHADRI, P.; RAJARAM, A.; RAJARAM, R. Free Radical Biology & Medicine Plumbagin and juglone induce caspase-3-dependent apoptosis involving the mitochondria through ROS generation in human peripheral blood lymphocytes. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 51, n. 11, p. 2090–2107, 2011.

SILVA, V. B. R. DA et al. Medicinal chemistry of antischistosomal drugs: Praziquantel and oxamniquine. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 25, n. 13, p. 3259–3277, 2017.

SILVA, F. L. **Resposta imune celular e patologia hepática de camundongos desnutridos , infectados com Schistosoma mansoni**. 2008. Tese de doutorado.

SILVA, H. A. M. F. et al. Barbatic acid from *Cladia aggregata* (lichen): Cytotoxicity and in vitro schistosomicidal evaluation and ultrastructural analysis against adult worms of *Schistosoma mansoni*. **Toxicology in Vitro**, v. 65, p. 104771, 2019a.

SILVA, M. S. D. L. et al. Evaluation of the immunomodulatory effect against splenocytes of Balb / c mice of biflorin obtained from *Capraria biflora* by a new isolation method. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 29, n. 4, p. 464–469, 2019b.

SKELLY, P. J.; WILSON, R. A. Making Sense of the Schistosome Surface. **Advances in Parasitology**, v. 63, n. 06, p. 186–264, 2006.

SOUSA, E. T.; LOPES, W. A. Fontes, formação, reatividade e determinação de quinonas na atmosfera. **Quimica Nova**, v. 39, n. 4, p. 486–495, 2016.

TEIXEIRA, A. et al. SciELO Books / SciELO Livros / SciELO Libros Parte III - Esquistossomose 22 -A resposta imune na forma crônica da Esquistossomose mansoni. 2008.

VALE, N. et al. Praziquantel for Schistosomiasis: Single- Drug Metabolism Revisited, Mode of Action, and Resistance. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 61, n. 5, p. 1–16, 2017.

VERMA, R. P. Anti-Cancer Activities of 1 , 4-Naphthoquinones : A QSAR Study. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**, v. 6, p. 489–499, 2006.

VIASUS, D.; PEDRO-, M. L.; ALCA, A. Epidemiological , clinical , diagnostic and economic features of an immigrant population of chronic schistosomiasis sufferers with long-term residence in a non- endemic country ( North Metropolitan area of Barcelona , 2002-2016 ). **PLoS**, p. 1–12, 2017.

VITORINO, R. R.; GOMES, A. Esquistossomose mansônica: aspectos gerais , imunologia , patogênese e história natural. **Revista Brasileira de Clínica Médica**, v. 9,

n. 4, p. 300–307, 2011.

WANG, J. et al. Antibacterial Activity of Juglone against *Staphylococcus aureus* : From Apparent to Proteomic. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 6, p. 965, 2016.

WANG, P. et al. Juglone induces apoptosis and autophagy via modulation of mitogen-activated protein kinase pathways in human hepatocellular carcinoma cells. **Food and Chemical Toxicology**, v. 116, p. 40–50, 2018.

WANG, T. et al. A *Biomphalaria glabrata* peptide that stimulates significant behaviour modifications in aquatic free-living *Schistosoma mansoni* miracidia. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 13, n. 1, p. e0006948, 2019.

WANG, W.; WANG, L.; LIANG, Y. Susceptibility or resistance of praziquantel in human schistosomiasis : a review. **Parasitology Research**, v. 111, p. 1871–1877, 2012.

WANG, X. et al. Mechanism of arylating quinone toxicity involving Michael adduct formation and induction of endoplasmic reticulum stress. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 10, p. 3604–3609, 2006.

WENDT, G.; COLLINS, J. J. Labeling of the *Schistosoma mansoni* Tegument. In: TIMSON, D. J. (Ed.). . **Schistosoma mansoni**. New York, NY: Humana Press, 2020. p. 65–74.

WHO, W. H. O. **What is schistosomiasis?** Disponível em: <<http://www.who.int/schistosomiasis/en/>>. Acesso em: 27 fev. 2018.

WHO, W. H. O. **Schistosomiasis**. Disponível em: <<http://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/schistosomiasis>>. Acesso em: 16 set. 2020.

WHO, W. H. O.; STATES. **Schistosomiasis and soil- transmitted helminthiases : numbers of people treated in 2018 Schistosomiase et géohelminthiases : nombre de personnes traitées en 2018**. WEEKLY EPIDEMIOLOGICAL RECORD. **Anais...2019**

WIANOWSKA, D. et al. Microbial Pathogenesis Comparison of antifungal activity of extracts from different *Juglans regia* cultivars and juglone. **Microbial Pathogenesis**, v. 100, p. 263–267, 2016.

WILLIAMS, D. L. et al. Thioredoxin Glutathione Reductase-Dependent Redox Networks in Platyhelminth Parasites. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 19, n. 7, p. 735–745, 2012.

WILSON, R. A. Proteomics at the schistosome-mammalian host interface : any prospects for diagnostics or vaccines ? **Parasitology**, v. 139, p. 1178–1194, 2012.  
WU, J. et al. Juglone induces apoptosis of tumor stem-like cells through ROS-p38

pathway in glioblastoma. **BMC Neurology**, p. 1–7, 2017.

XIAO, S.; SUN, J. Schistosoma hemozoin and its possible roles. **International Journal for Parasitology**, p. 1919–1920, 2017.

YEPES, E. et al. Inhibition of Granulomatous Inflammation and Prophylactic Treatment of Schistosomiasis with a Combination of Edelfosine and Praziquantel. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 7, p. 1–22, 2015.

YOSHINO, T. et al. Esporocistos de Schistosoma. In: JAMIESON, B. G. M. (Ed.). . **Schistosoma: Biology, Pathology and Control**. Taylor Francis / CRC Press., 2017. p. 118–148.

ZHAOXIA, W.; GUANGQI, C.; YUAN, W. Efeito inibidor do juglong em vários microrganismos de deterioração de alimentos. **China Brew**, v. 8, p. 76– 78., 2009.

ZHOU, D. et al. Hepatoprotective effect of juglone on dimethylnitrosamine - induced liver fibrosis and its effect on hepatic antioxidant defence and the expression levels of  $\alpha$  - SMA and collagen III. **Molecular Medicine Reports**, v. 12, p. 4095–4102, 2015.

ZMANTAR, T. et al. Microbial Pathogenesis Use of juglone as antibacterial and potential efflux pump inhibitors in Staphylococcus aureus isolated from the oral cavity. **Microbial Pathogenesis**, v. 101, p. 44–49, 2016.

ZONI, A. C.; CATALÁ, L.; AULT, S. K. Schistosomiasis Prevalence and Intensity of Infection in Latin America and the Caribbean Countries , 1942-2014 : A Systematic Review in the Context of a Regional Elimination Goal. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 3, p. 1–22, 2016.

## ANEXO A – APROVAÇÃO DO CEUA/UFPE



Universidade Federal de Pernambuco  
 Centro de Biociências  
 Av. Prof. Nelson Chaves, s/n  
 50670-420 / Recife - PE - Brasil  
 Fones: 2126 8842  
 ceua@ufpe.br

Recife, 28 de maio de 2019

Ofício nº 24/19

Da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE  
 Para: **Prof. Mônica Camelo Pessoa Azevedo**  
 Departamento de Medicina Tropical  
 Centro de Ciencia da Saúde  
 Universidade Federal de Pernambuco  
 Processo nº 0024/2019

Certificamos que a proposta intitulada "**Avaliação da atividade esquistossomícida da juglona frente ao *schistosoma mansonl.***" registrado com o nº 0024/2019 sob a responsabilidade de **Prof. Mônica Camelo Pessoa Azevedo** o que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO (UFPE), em reunião de 28/05/2019.

Finalidade	<input type="checkbox"/> Ensino <input checked="" type="checkbox"/> Pesquisa Científica
Vigência da autorização	28/05/2019 a 07/07/2020
Espécie/linhagem/raça	Camundongo heretogenico
Nº de animais	63
Peso/Idade	30-35g/ 30 dias
Sexo	Femea ( 63)
Origem: Biotério de Criação	Bioterio do Laboratorio de Imunopatologia Keizo Asami - UFPE
Destino: Biotério de Experimentação	Bioterio do Laboratorio de Imunopatologia Keizo Asami - UFPE

Atenciosamente,

Prof. Sebastião R. F. Silva  
 Vice-Presidente CEUA/UFPE  
 STAPE 2345691