

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

CAMILLA MIELLY GOMES DA SILVA

**EFEITO SINÉRGICO DA ASSOCIAÇÃO JUGLONA-PRAZIQUANTEL FRENTE A
DIFERENTES ESTÁGIOS EVOLUTIVOS DE *Schistosoma mansoni***

RECIFE

2023

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

CAMILLA MIELLY GOMES DA SILVA

**EFEITO SINÉRGICO DA ASSOCIAÇÃO JUGLONA-PRAZIQUANTEL FRENTE A
DIFERENTES ESTÁGIOS EVOLUTIVOS DE *Schistosoma mansoni***

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

Área de concentração: Fármacos e medicamentos

Orientadora: Prof^ª. Dra. Mônica Camelo Pessôa de Azevedo Albuquerque

Coorientador: Prof^ª. Dra. Eulália Camelo Pessoa de Azevedo Ximenes

RECIFE-PE

2023

CAMILLA MIELLY GOMES DA SILVA

**EFEITO SINÉRGICO DA ASSOCIAÇÃO JUGLONA-PRAZIQUANTEL FRENTE A
DIFERENTES ESTÁGIOS EVOLUTIVOS DE *Schistosoma mansoni***

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

Área de concentração: Fármacos e medicamentos

Recife, 06 de fevereiro de 2023

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof^a. Dra. Ivone Antônia de Souza (Presidente)
Universidade Federal de Pernambuco

Eulália Camelo Pessoa de Azevedo Ximenes (Titular Externa)
Universidade Federal de Pernambuco

Hallysson Douglas Andrade de Araújo (Titular Externo)
Universidade Federal de Pernambuco

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, sem Ele nada seria possível. Agradeço pela força e por toda perseverança concedida para enfrentar e entender os obstáculos na realização deste trabalho.

Agradeço aos meus pais e a minha irmã pelo suporte e por terem acreditado em mim quando nem eu mesma acreditava.

A minha orientadora Profa. Dra. Mônica Camelo Pessôa de Azevedo Albuquerque pela oportunidade, disponibilidade e confiança na realização deste projeto. A minha coorientadora Profa. Dra. Eulália Camelo P. de A. Ximenes e ao Prof. Dr. André de Lima Aires pelos ensinamentos e por toda ajuda na execução dos experimentos.

Aos meus amigos de laboratório, em especial a Renan, amigo sem você esse trabalho não teria sido concluído, agradeço imensamente pela ajuda, pelas conversas e pelo zelo com este projeto. Agradeço a Hugo pela paciência e por toda ajuda, e a Stéphanny por ter estado comigo em tantos momentos, sem vocês os dias no laboratório não teriam sido tão leves e divertidos.

Ao laboratório de Imunopatologia Keizo Asami e aos seus funcionários.

Ao CNPq pela bolsa de estudos e auxílio financeiro que possibilitou a dedicação e realização deste trabalho.

RESUMO

A esquistossomose é uma doença tropical e negligenciada (DTN), causada por trematódeos do gênero *Schistosoma* sendo considerada como a segunda maior doença parasitária de importância socioeconômica. Estima-se que essa infecção afete mais de 240 milhões de pessoas no mundo e que 700 milhões de pessoas vivem em áreas de risco de contrai-la. O praziquantel (PZQ) é atualmente o único medicamento utilizado para o tratamento da esquistossomose, com ação contra todas as espécies de *Schistosoma* spp., no entanto, apresenta certas limitações pois não impede reinfecções e não é eficaz contra as fases jovens do parasito, o que aumenta o risco de surgimento de cepas resistentes e/ou tolerantes. Diante disto, torna-se necessária a busca por novos compostos com potencial esquistossomicida, por sua vez, este trabalho teve como objetivo avaliar a atividade esquistossomicida, *in vitro*, da juglona (JUG) isolada e em associação com o praziquantel (PZQ) frente a diferentes estágios evolutivos do *Schistosoma mansoni* (cepa BH). Para isso, camundongos fêmeas Swiss webster, previamente anestesiados, foram infectados via percutânea com uma suspensão de cercárias contendo em média cerca de 120 cercárias. As cercárias foram obtidas através de caramujos *Biomphalaria glabrata* infectados com miracídeos de *S. mansoni* (cepa BH), após o período de 30 dias e após exposição a luz artificial, em seguida foi realizado processo mecânico de transformação das cercárias em esquistossômulos de 3 horas. Durante o período de 21 e 50 dias, os camundongos foram eutanasiados e por meio de perfusão hepática foram obtidos os vermes jovens (21 dias) e vermes adultos, machos e fêmeas (50 dias). A susceptibilidade das fases evolutivas *in vitro* diante da JUG e do PZQ foi observada no período de 24 horas, utilizando-se como critério as alterações de motilidade, taxa de mortalidade e repercussões gerais, como danos tegumentares. As CL50 da JUG e do PZQ foram também estabelecidas, com resultados de 0,57 μM e 182,7 μM , respectivamente, para esquistossômulos de 3 horas; 8,76 μM e 111,3 μM para vermes jovens com 21 dias; 26,4 μM e 2,92 μM para vermes adultos macho e 22,6 μM e 87,8 μM para vermes adultos fêmea. Os resultados da associação JUG/PZQ mostraram atividade sinérgica em diferentes graus frente a todas as fases evolutivas analisadas, utilizando-se CL50 e concentrações subinibitórias. Os melhores resultados apresentaram índice de combinação (IC) indicativo de um sinergismo muito forte frente aos esquistossômulos

(IC=0,09) e aos vermes adultos machos (IC=0,07), e indicando sinergismo forte frente aos vermes jovens (IC=0,29) e aos vermes adultos fêmeas (IC=0,10). Além disso o efeito da associação JUG/PZQ permitiu diminuição das doses utilizadas de juglona e praziquantel contra o *Schistosoma mansoni*, também apresentando efeito sobre a oviposição, inibindo nos vermes acasalados expostos as doses subletais.

Palavras-chave: *Schistosoma mansoni*; praziquantel; juglone; *in vitro*; sinergismo.

ABSTRACT

Schistosomiasis is a neglected tropical disease (NTD) caused by trematodes of the genus *Schistosoma* and is considered the second major parasitic disease of socioeconomic importance. It is estimated to affect more than 240 million people worldwide, with 700 million people living in risk areas. Praziquantel (PZQ) is currently the only drug used for treatment of schistosomiasis, acting against all species of *Schistosoma* spp., however, it has certain limitations, not preventing reinfections and not being effective against the young developing stages, subjecting itself to the risk of emergence resistant and/or tolerant strains. Thus, it becomes necessary to search for new drug compounds that can be used as a potential new treatment against schistosomiasis, therefore, the present work aimed to evaluate *in vitro* schistosomicidal activity of juglone (JUG) used isolated and in association with praziquantel (PZQ) at different developmental stages of *Schistosoma mansoni* (BH strain). For this purpose, female Swiss webster mice previously anesthetized, were infected percutaneously with an average suspension of cercariae. The cercariae were obtained from *Biomphalaria glabrata* snails already infected with *S. mansoni* miracidia (BH strain), after a period of 30 days and after exposure to artificial light, moreover, a mechanical process of transformation of cercariae into three-hour-old schistosomula was carried out. After a period of 21 days and 50 days, the mice were euthanized and through liver perfusion young worms (21-days-old) and adult worms (50-days-old), male and female, were obtained. The susceptibility of the different developmental stages *in vitro* to JUG and PZQ was observed withing 24-hour period and motility, mortality and alterations in the tegument were employed as schistosomicidal parameters. The CL50 of JUG and PZQ were established, and the results found for the three-hour-old schistosomula was 0,57 μM and 182.7 μM , for JUG and PZQ respectively; 8.76 μm and 111.3 μm for 21-days-old young worms; 26.4 μm and 2.92 μm for male adult worm and 22.6 μm and 87.8 for female adult worm. The results of the JUG/PZQ association showed synergistic activity in different degrees against all developmental stages analyzed, using the CL50 and subinhibitory concentrations. The best results showed a combination index (CI) indicative of a very strong synergism against schistosomula (CI=0.09) and adult male worms (CI=0.07) and indicating a strong synergism against young worms (CI=0.29) and adult female worms (CI=0.10). In addition, the effect of the JUG/PZQ association

allowed the decrease of used doses of juglone and praziquantel against *Schistosoma mansoni*, also showing effect on oviposition, inhibiting mated worms exposed to sublethal doses.

Key words: *Schistosoma mansoni*; praziquantel; juglone; *in vitro*; synergism.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	Mapa da situação dos países com esquistossomose endêmica 2020	18
Figura 2 –	Mapa da distribuição da esquistossomose no Brasil, 2009-2020, segundo faixa de positividade por município	19
Figura 3 –	Distribuição espacial das espécies de moluscos do gênero <i>Biomphalaria</i> no Brasil. Em A, B e C observa-se a distribuição das espécies <i>B. glabrata</i> , <i>B. straminea</i> e <i>B. tenagophila</i> , respectivamente	20
Figura 4 –	Mapa com a distribuição geográfica dos municípios prioritários do Programa SANAR (2019 – 2022) para esquistossomose em Pernambuco	22
Figura 5 –	Ovo de <i>Schistosoma mansoni</i> . Espículo lateral (E) e miracídio interiorizado (M)	25
Figura 6 –	Miracídio de <i>Schistosoma mansoni</i> : Miracídios em microscopia de luz	26
Figura 7 –	Esporocisto primário (ES1) e secundário (ES2) de <i>Schistosoma mansoni</i> em corte histológico de <i>Biomphalaria sp</i>	27
Figura 8 –	Cercária de <i>Schistosoma mansoni</i> : (A) exemplo de cercária em microscopia de luz. (B) cercária com ênfase nas estruturas: (a) corpo; (b) cauda; (c) bifurcação na cauda; (d) ventosa oral; (e) ventosa ventral ou acetábulo; (f) distância entre as ventosas	28
Figura 9 –	Esquistossômulo de <i>Schistosoma mansoni</i>	29
Figura 10 –	Vermes jovens (16 dias) de <i>Schistosoma mansoni</i> , com cerca de 0,4 mm de comprimento	30
Figura 11 –	Microscopia eletrônica de varredura (MEV) de vermes jovens de <i>Schistosoma mansoni</i> . (A) Vermes jovens apresentando: Ventosa oral (V.O), ventosa ventral (V.V) e formação do sulco (S), marcando o início do canal ginecóforo. (B) Superfície dorsal de vermes jovens mostrando fileiras de pregas tegumentares (P.T). (C) Verme jovem (21 dias) e suas estruturas	31

Figura 12 – Verme jovem (21 dias). Ventosa oral (V.O.); ventosa ventral (V.V.); Ceco ramificado (C.R.)	31
Figura 13 – Desenvolvimento de características tegumentares de vermes de <i>Schistosoma mansoni</i> . (A) microscopia da superfície dorsal da fêmea de <i>Schistosoma mansoni</i> aos 20 dias de idade. (B) superfície dorsal de verme com 20 dias de idade	32
Figura 14 – Verme adulto macho se <i>Schistosoma mansoni</i> . Ventosa oral (V.O.), ventosa ventral (V.V.) e canal ginecóforo (C.G. .).....	34
Figura 15 – Verme adulto fêmea de <i>Schistosoma mansoni</i> . Ventosa ventral (V.V.), ventosa oral (V.O.), ovário (O.), glândulas vitelínicas (G.V.)	34
Figura 16 – Caramujos da espécie <i>Biomphalaria glabrata</i> in natura	35
Figura 17 – Ciclo biológico do <i>Schistosoma mansoni</i> . A figura apresenta as formas do parasita (ovo, miracídio, cercária, esquistossômulos, vermes adultos) e seus hospedeiros intermediário (<i>Biomphalaria glabrata</i>) e definitivo (vertebrado)	38
Figura 18 – Estrutura molecular do Praziquantel	42
Figura 19 – Estrutura molecular da Juglona	45
Figura 20 – Isoblograma revelando o efeito sinérgico da associação entre juglona e praziquantel frente a esquistossômulos de <i>S. mansoni</i> (cepa BH)	68
Figura 21 – Isoblograma revelando o efeito sinérgico da associação entre juglona e praziquantel frente vermes jovens de <i>S. mansoni</i> (cepa BH)	70
Figura 22 – Isoblograma revelando o efeito sinérgico da associação entre juglona e praziquantel frente a vermes adultos machos de <i>S. mansoni</i> (cepa BH)	71
Figura 23 – Isoblograma revelando o efeito sinérgico da associação entre juglona e praziquantel frente vermes adultos fêmeas de <i>S. mansoni</i> (cepa BH)	73

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Relação da distribuição das três principais espécies do caramujo hospedeiro intermediário nos estados do Nordeste	20
Tabela 2 –	Municípios prioritários por Região de Saúde no quadriênio 2019 – 2022	21
Tabela 3 –	Distribuição das frequências dos municípios com registros de caso em que houve contato com coleções hídricas nos anos de 2010 a 2012	22
Tabela 4 –	Descrição do grau de sinergismo com base nos valores do índice de Combinação (IC)	57
Tabela 5 –	Avaliação <i>in vitro</i> da motilidade de esquistossômulos de <i>Schistosoma mansoni</i> expostos durante 24 horas a diferentes concentrações de juglona	59
Tabela 6 –	Avaliação <i>in vitro</i> da motilidade de esquistossômulos de <i>Schistosoma mansoni</i> expostos durante 24 horas a diferentes concentrações de praziquantel	60
Tabela 7 –	Avaliação <i>in vitro</i> da motilidade de vermes jovens de <i>Schistosoma mansoni</i> expostos durante 24 horas a diferentes concentrações de juglona	61
Tabela 8 –	Avaliação <i>in vitro</i> da motilidade de vermes jovens de <i>Schistosoma mansoni</i> com 21 dias, expostos durante 24 horas a diferentes concentrações de praziquantel	62
Tabela 9 –	Avaliação <i>in vitro</i> da motilidade de vermes adultos machos de <i>Schistosoma mansoni</i> com 50 dias, expostos durante 24 horas a diferentes concentrações de juglona	63
Tabela 10 –	Avaliação <i>in vitro</i> da motilidade de vermes adultos machos de <i>Schistosoma mansoni</i> com 50 dias expostos durante 24 horas a diferentes concentrações de praziquantel	64
Tabela 11 –	Avaliação <i>in vitro</i> da motilidade de vermes adultos fêmeas de <i>Schistosoma mansoni</i> com 50 dias, expostos durante 24 horas a diferentes concentrações de juglona	65

Tabela 12 –	Avaliação <i>in vitro</i> da motilidade de vermes adultos fêmeas de <i>Schistosoma mansoni</i> com 50 dias, expostos durante 24 horas a diferentes concentrações de praziquantel	66
Tabela 13 –	Valores da concentração letal 50% CL ₅₀ [µM] da juglona e do praziquantel sobre as formas evolutivas de <i>Schistosoma mansoni</i> após 24h	67
Tabela 14 –	Atividade da associação JUG+PZQ frente a esquistossômulos de <i>Schistosoma mansoni</i> (cepa BH) após 24 horas	68
Tabela 15 –	Atividade da associação JUG+PZQ frente a vermes jovens de <i>Schistosoma mansoni</i> (cepa BH) após 24 horas	69
Tabela 16 –	Atividade da associação JUG+PZQ frente a vermes adultos machos de <i>Schistosoma mansoni</i> (cepa BH) após 24 horas	71
Tabela 17 –	Atividade da associação JUG+PZQ frente a vermes adultos fêmeas de <i>Schistosoma mansoni</i> (cepa BH) após 24 horas	72
Tabela 18 –	Atividade da associação juglona + praziquantel sobre a oviposição de vermes fêmeas acasaladas de <i>S. mansoni</i> (cepa BH) utilizando doses subletais de acordo com a CL ₅₀ de vermes adultos machos	74
Tabela 19 –	Atividade da associação juglona + praziquantel sobre a oviposição de vermes fêmeas acasaladas de <i>S. mansoni</i> (cepa BH) utilizando doses subletais de acordo com a CL ₅₀ de vermes adultos fêmeas	74

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	17
2.1	EPIDEMIOLOGIA DA ESQUISTOSSOMOSE MANSONI NO BRASIL	17
2.2	<i>Schistosoma mansoni</i>	24
2.2.1	Aspectos morfológicos de <i>Schistosoma mansoni</i> nos diferentes estágios evolutivos	24
2.2.2	Ciclo biológico do <i>Schistosoma mansoni</i>.....	35
2.2.3	Patogenia	39
2.2.4	Tratamento.....	41
2.2.4.1	Praziquantel (PZQ).....	41
2.2.5	Juglona.....	44
2.2.6	Associação de fármacos	48
3	OBJETIVOS	51
3.1	OBJETIVO GERAL.....	51
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	51
4	MATERIAIS E MÉTODOS	52
4.1	CONSIDERAÇÕES ÉTICAS E ANIMAIS EXPERIMENTAIS	52
4.2	COMPOSTOS	52
4.3	MANUTENÇÃO DA CEPA BH DE <i>Schistosoma mansoni</i> : INFECÇÃO DE CARAMUJOS, OBTENÇÃO DE CERCÁRIAS E INFECÇÃO DE CAMUNDONGOS	52
4.4	AVALIAÇÃO <i>IN VITRO</i> DA SUSCEPTIBILIDADE DOS ESQUISTOSSÔMULOS COM 3 HORAS DE <i>Schistosoma mansoni</i> À JUGLONA E PRAZICUANTE ...	53
4.5	AVALIAÇÃO <i>IN VITRO</i> DA SUSCEPTIBILIDADE DE VERMES JOVENS COM 21 DIAS DE <i>Schistosoma mansoni</i> À JUGLONA E PRAZICUANTEL	54
4.6	AVALIAÇÃO <i>IN VITRO</i> DA SUSCEPTIBILIDADE DE VERMES ADULTOS COM 50 DIAS DE <i>Schistosoma mansoni</i> À JUGLONA E PRAZICUANTEL.....	54

4.7	DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ESQUISTOSSOMICIDA DA ASSOCIAÇÃO JUG/PZQ FRENTE A DIFERENTES FASES EVOLUTIVAS DE <i>Schistosoma mansoni</i> (CEPA BH).....	55
4.8	AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DA ASSOCIAÇÃO JUG/PZQ FRENTE A ATIVIDADE OVIPOSITORA DE CASAIS DE <i>Schistosoma mansoni</i> (CEPA BH)	55
4.9	CRITÉRIO DE AVALIAÇÃO	56
5	RESULTADOS.....	58
5.1	ATIVIDADE DA JUGLONA E PRAZIQUANTEL FRENTE A ESQUISTOSSÔMULOS DE 3 HORAS DE <i>Schistosoma mansoni</i>	58
5.2	ATIVIDADE DA JUGLONA E PRAZIQUANTEL FRENTE A VERMES JOVENS DE <i>Schistosoma mansoni</i> COM 21 DIAS	60
5.3	ATIVIDADE DA JUGLONA E PRAZIQUANTEL FRENTE A VERMES ADULTOS DE <i>Schistosoma mansoni</i> COM 50 DIAS	62
5.3.1	Susceptibilidade dos vermes machos de <i>S. mansoni</i> frente a juglona e praziquantel.....	62
5.3.2	Susceptibilidade de vermes fêmeas de <i>S. mansoni</i> frente a juglona e praziquantel.....	64
5.5	DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO LETAL 50% DA JUGLONA E PRAZIQUANTEL FRENTE AS FORMAS EVOLUTIVAS DE <i>Schistosoma mansoni</i>	66
5.6	ATIVIDADE DA ASSOCIAÇÃO JUG+PZQ SOBRE ESQUISTOSSÔMULOS, VERMES JOVENS E VERMES ADULTOS MACHOS E FÊMEAS DE <i>Schistosoma mansoni</i> (CEPA BH).....	67
5.7	ATIVIDADE DA ASSOCIAÇÃO JUG/PZQ SOBRE A OVIPOSIÇÃO DE VERMES FÊMEAS DE <i>Schistosoma mansoni</i> (CEPA BH).....	73
6	DISCUSSÃO	75
7	CONCLUSÃO	82
8	PESPECTIVAS	83
	REFERÊNCIAS.....	84
	ANEXO A- APROVAÇÃO DO CEUA/UFPE.....	101

1 INTRODUÇÃO

A esquistossomose, também conhecida como Xistose, Barriga d'Água, Bilharziose e outras denominações menos usuais, é uma doença tropical e subtropical parasitária, causada por vermes do gênero *Schistosoma*. É considerada a segunda parasitose de maior importância epidemiológica, tendo transmissão relatada em 78 países, com 51 destes apresentando transmissão moderada a alta, demandando tratamento preventivo para milhões de indivíduos (BRASIL, 2014; WHO, 2022a)

É causada por vermes parasitas com ampla distribuição geográfica, ocorrendo principalmente nos continentes Africano (*Schistosoma haematobium*, *Schistosoma mansoni*), Asiático (*Schistosoma japonicum*) e na América Latina (*Schistosoma mansoni*). Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), cerca de 240 milhões de pessoas estão infectadas no mundo, com mais de 700 milhões vivendo em áreas endêmicas (BRASIL, 2014; WHO, 2022b).

É caracterizada como uma doença tropical negligenciada com prevalência em regiões carentes, contribuindo de forma direta na manutenção da desigualdade social (BRASIL, 2014). O Brasil se destaca dentre os países da América Latina, com 19 estados federativos endêmicos para esquistossomose, onde cerca de 25 milhões de pessoas se encontram em áreas de constante risco (BRASIL, 2017; MS, 2021). Em Pernambuco a esquistossomose tem prevalência nas áreas rurais, no entanto, estudos já demonstram altos índices de transmissão no litoral do estado (BARBOSA et al. 2017).

Sua sintomatologia no ser humano pode se manifestar com evolução de uma forma assintomática até formas clínicas graves, podendo levar a internações e óbitos. Os efeitos patológicos mais importantes são visualizados na fase crônica, caracterizada pela forma grave da doença, a hepatoesplênica. Sua sintomatologia sofre influência de vários fatores como a localização do parasita, a sua quantidade nos órgãos afetados, a resposta ao tratamento e a reação e sensibilidade do organismo (BRASIL, 2014; GRYSEELS et al. 2006).

O praziquantel (PZQ) é atualmente o único medicamento de escolha para o tratamento da esquistossomose, atuando contra todas as espécies de *Schistosoma* que infectam seres humanos. Apresenta baixa toxicidade, boa tolerância, eficácia e baixo custo, no entanto o PZQ apresenta limitações, e dentre elas destaca-se sua baixa atividade contra estágios imaturos dos vermes, a possibilidade de resistência

ou tolerância devido ao seu uso repetido em regiões altamente endêmicas, além de não impedir reinfecções e causar efeitos adversos (CIOLI, 2014; SILVA, 2017; HOTEZ et al., 2019).

Diante deste cenário há uma necessidade premente de investigar drogas alternativas ou sinérgicas. Dentre o grupo de moléculas mais promissoras, destaca-se o potencial das naftoquinonas. A juglona (JUG) é uma naftoquinona natural que tem sido alvo de estudo devido as suas propriedades consideradas benéficas no campo da medicina. Variadas atividades farmacológicas já foram comprovadas incluindo antifúngica (ARASOGLU et al. 2016), antimicrobiana (CLARK, et al., 1990), anti-helmíntica (DAMA E JADHAV, 1997), anti-inflamatória (LANDA et al., 2012) além de apresentar efeitos anticancerígenos (MARYON et al., 2012). A juglona também mostrou atividade contra *Toxoplasma gondii* (AKERMAN e MULLER, 2005), *Trypanosoma cruzi*, *T. brucei rhodesiense*, *Leishmania donovani* (SALOMÃO et al. 2013) e frente ao *Schistosoma mansoni* (PINTO et al., 1977; LIMA et al., 2002; RIBEIRO et al., 2009; MAGALHÃES et al., 2014).

Por se tratar de uma doença negligenciada, que afeta as camadas mais pobres da população, a esquistossomose não possui a devida atenção do governo, dos sistemas de monitoramento sanitário, ambiental e de indústrias farmacêuticas. Por consequência recebe quase nenhum investimento em inovação, pois o retorno financeiro não é atrativo, comprometendo dessa forma a pesquisa nesta área (TAIWO et al, 2018). A quimioterapia combinada é uma opção a ser considerada, pois traz benefícios relacionados a uma maior eficácia, redução de resistência e de efeitos adversos. É uma alternativa amplamente utilizada por exemplo em infecções bacterianas, na malária, bem como em casos não infecciosos como no câncer (TALLARIDA et al. 2001).

Diante do exposto, a busca por medidas alternativas e acessíveis para o tratamento da esquistossomose é uma necessidade urgente. O potencial antiparasitário apresentado pelas naftoquinonas chama atenção para seu uso como potencial agente esquistossomicida, e seu uso em associação ao PZQ poderá potencializar seu efeito contra o *S. mansoni*, além de reduzir as doses utilizadas e dessa maneira minimizar os riscos de surgimento de cepas resistentes.

2 REVISÃO DE LITERATURA

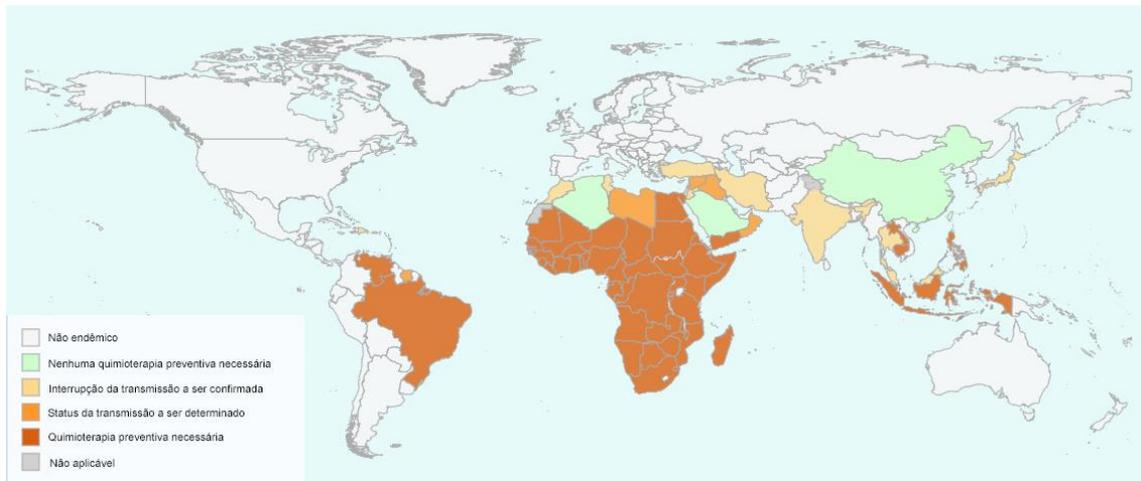
2.1 EPIDEMIOLOGIA DA ESQUISTOSSOMOSE MANSONI NO BRASIL

A esquistossomose é considerada uma das parasitoses mais disseminadas no mundo, sendo uma das doenças veiculadas pela água de maior prevalência (BRASIL, 2014). Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), estima-se que afete mais de 240 milhões de pessoas no mundo, tendo transmissão relatada em 78 países, com 51 destes apresentando transmissão de moderada a alta intensidade (Figura 1) (WHO, 2022a). Destaca-se sua presença nos continentes Africano, Asiático e na América Latina, sendo considerada pela OMS como a segunda infecção parasitária mais disseminada no mundo, depois da malária (BRASIL, 2014; ROCHA et al. 2016).

A OMS pontua que mais de 700 milhões de pessoas vivem em áreas de risco para infecções por *Schistosoma spp.*, principalmente em locais com saneamento básico precário e escassez de água potável, com prevalência em áreas tropicais e subtropicais (STEINMANN et al., 2006; GRIMES et al. 2014; WHO, 2022b). Dados de 2019 mostram que pelo menos 236.6 milhões de pessoas necessitaram de tratamento preventivo, onde mais 105.4 milhões de pessoas infectadas foram tratadas (WHO, 2022a.; WHO, 2022b). No ano de 2020 o número de tratados sofreu um decréscimo, sobretudo devido a pandemia do COVID-19, evidenciando dessa maneira a gravidade das interrupções nos serviços de prestação de saúde para as doenças tropicais negligenciadas (DTNs) (WHO, 2021).

O gênero *Schistosoma* apresenta cinco espécies responsáveis pela manifestação da esquistossomose intestinal no homem, são elas: *S. guineensis*, *S. intercalatum*, *S. mansoni*, *S. japonicum*, e *S. mekongi*. Já a forma urinária da doença é ocasionada pela espécie *Schistosoma haematobium*, com distribuição e predomínio de cada espécie relacionado ao seu hospedeiro intermediário e ao clima da região. Algumas espécies apresentam maior importância clínica, como a espécie *S. japonicum* ocorrendo na Ásia, *S. haematobium* e *S. mansoni* ocorrendo no Oriente Médio e África, com predominância do *S. mansoni* nas Américas, sendo essa a única espécie presente nas Américas do Sul e Central. Estima-se, segundo dados da OMS, que 90% das pessoas que necessitam de tratamento para a esquistossomose se encontram na África (COLLEY et al., 2014; BRASIL, 2014; WHO, 2022a).

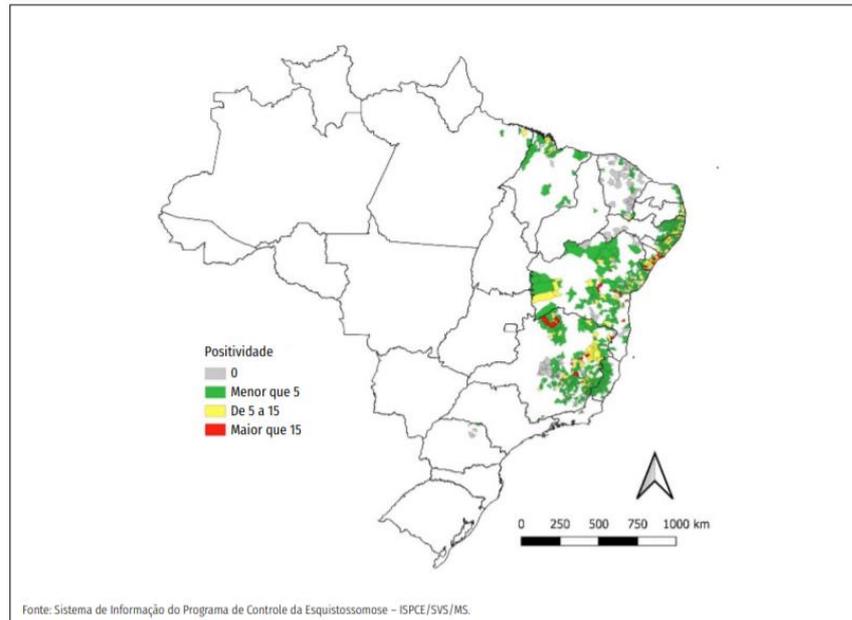
Figura 1 - Mapa da situação dos países com esquistossomose endêmica 2020.



Fonte: Disponível em: Adaptado de https://apps.who.int/neglected_diseases/ntddata/sch/sch.html.

Na América Latina, o Brasil, Venezuela, Porto Rico e Suriname se destacam com maior número de casos (VITORINO et al. 2012). No Brasil estima-se que 25 milhões de pessoas estão em áreas de risco de contaminação, e segundo Ministério da Saúde (MS), a sua transmissão está presente de forma intensificada em 19 unidades federativas (UFs), com registro de casos em todas as regiões do país (ESPIRITO-SANTO et al., 2015; BRASIL, 2017). Os estados da região Sudeste e Nordeste são os mais afetados, com sua ocorrência ligada à presença dos moluscos transmissores, e instalação do seu ciclo evolutivo (Figura 2). Apesar da esquistossomose estar incluída na Lista de Notificação Compulsória acredita-se que nem todos os casos são notificados, fazendo com que os dados reais sejam ainda mais alarmantes (BRASIL, 2014).

Figura 1 - Mapa da distribuição da esquistossomose no Brasil, 2009-2020, segundo faixa de positividade por município.



Fonte: Ministério da Saúde, 2021

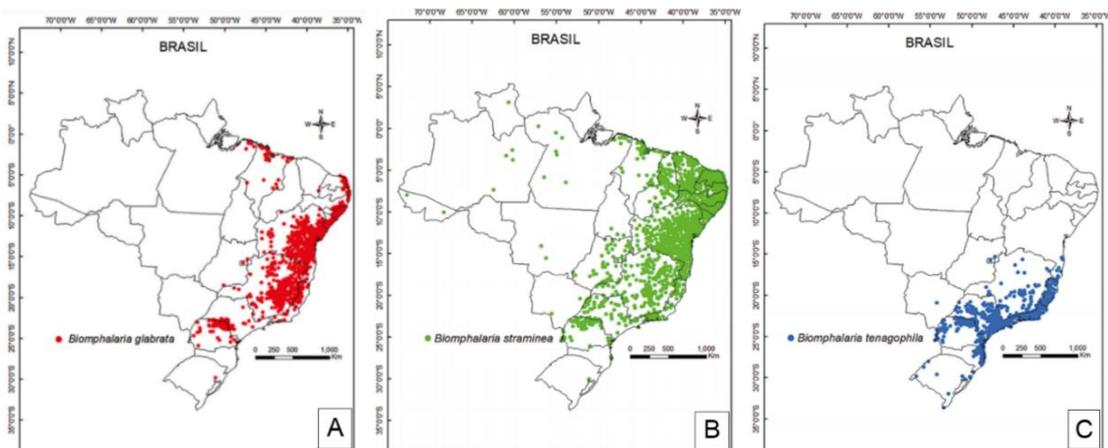
Apesar de o molusco transmissor ser classificado em 10 espécies, apenas *Biomphalaria glabrata*, *Biomphalaria straminea* e *Biomphalaria tenagophila* são conhecidos como agentes naturalmente infectados (BRASIL, 2014). Em Recife 30 criadouros de *B. straminea* foram detectados, sendo quatro destes criadouros focos potenciais de transmissão (BARBOSA et al. 2013). Na região de Porto de Galinhas, no ano de 2013, foram coletados 485 caramujos *B. glabrata* e os resultados após análise mostraram uma taxa de infecção de 81,9%, caracterizando este um local de elevada transmissão para esquistossomose (GOMES et al. 2014). A região Nordeste se destaca na distribuição das espécies de *Biomphalaria* com risco de transmissão do *S. mansoni* (Quadro 1), todavia é válido ressaltar que as demais regiões do Brasil não fogem das altas estatísticas em notificações do caramujo (Figura 3).

Tabela 1 - Relação da distribuição das três principais espécies do caramujo hospedeiro intermediário nos estados do Nordeste

NÚMERO DE MUNICÍPIOS POR ESTADO, COM PRESENÇA, AUSÊNCIA OU SEM INFORMAÇÃO DE HOSPEDEIRO INTERMEDIÁRIOS DE <i>Schistosoma mansoni</i>						
No. De ordem	Estados	Presença de molusco	<i>B. glabrata</i>	<i>B. tenagophila</i>	<i>B. straminea</i>	Ausência ou sem informação**
1	Alagoas	88	48	0	74	14
2	Bahia	415	301	8	411	2
3	Ceará	117	0	0	117	67
4	Maranhão	56	29	0	39	161
5	Paraíba	80	15	0	76	143
6	Pernambuco	170	23	0	170	15
7	Piauí	76	1	0	76	148
8	Rio Grande do Norte	159	23	0	162	8
9	Sergipe	66	50	0	46	9

** Municípios sem informações ou negativos para hospedeiros de *S. mansoni*.
 Fonte: CARVALHO, et. al, 2020 modificado.

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



Fonte: CARVALHO et. al, 2020.

Os dados apresentados pela região Nordeste influenciam para sua permanência como a mais incidente para novos casos confirmados e maior número de focos de transmissão (KATZ, 2018). O mesmo pode ser verificado em estudo realizado por Martins-Leite e colaboradores (2014), entre os anos de 2000 e 2011, que evidenciam as maiores taxas de mortalidade para a região do Nordeste, com situação epidemiológica crítica em alguns desses estados. No ano de 2015 a região

chegou a concentrar 78,7% dos casos de esquistossomose, sendo a maior prevalência de infecção, com elevado número de formas graves e óbitos atribuídos à doença no país (SILVA; NUNES; LEAL et. al., 2019).

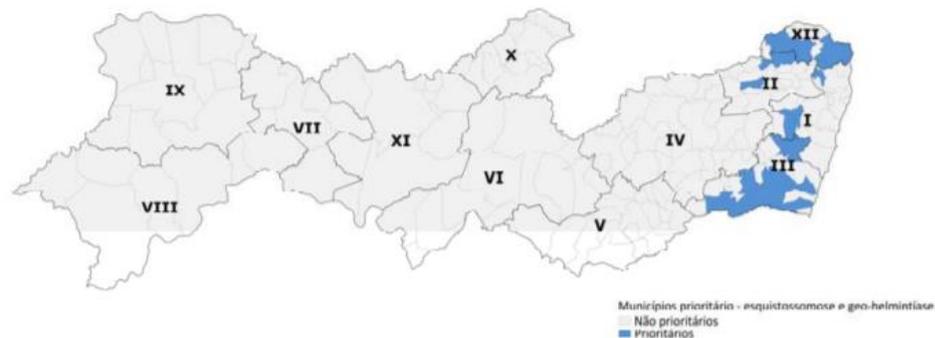
Dentre os estados brasileiros, Pernambuco se destaca devido ao elevado número de notificações para a esquistossomose, sendo considerado o estado com maior mortalidade e endemicidade. (BRASIL, 2014; SILVA e DOMINGUES, 2011). A prevalência da esquistossomose neste estado pode ser observada não apenas em regiões rurais, como também em centros urbanos e regiões antes não endêmicas. Esse novo perfil epidemiológico é evidenciado em decorrência da urbanização e o intenso êxodo rural nesta região, atrelado a uma inexistente infraestrutura sanitária que contribuem para o processo de expansão da doença (ARAUJO et al. 2007; MS, 2017). As cidades consideradas como prioritárias, que apresentaram índice de positividade $\geq 10\%$ no período 2010-2014, se concentram no Litoral, Zona da Mata, e parte do Agreste. Os municípios de destaque com grande ocorrência estão distribuídos entre as seguintes regiões de saúde (RS): RS I; RS II; RS III e RS XII (Quadro 2) (Figura 4) (SEVS/SES-PE, 2019).

Tabela 2 - Municípios prioritários por Região de Saúde no quadriênio 2019 – 2022.

RS I	Araçoiaba, Vitória de Santo Antão
RS II	João Alfredo, Machados, Vicência
RS III	Água Petra, Barreiros, Escada, Gameleira, Jaqueira, Maraiá, Palmares, Primavera, Rio Formoso, São Benedito do Sul, Xexéu
RS XII	Aliança, Goiana, Itaquitinga, Macaparana, Timbaúba

Fonte: SEVS/SES-PE, 2019

Figura 4 - Mapa com a distribuição geográfica dos municípios prioritários do Programa SANAR (2019 – 2022) para esquistossomose em Pernambuco.



Fonte: SANAR/SEVS/SES-PE, 2019

Como mencionado, a Zona da Mata se destaca como uma das principais regiões endêmicas, com clima quente e úmido, chuvas abundantes e rios de água doce, apresenta forte influência da população rural e suas condições habitacionais na prevalência da doença. A vulnerabilidade social e a ausência de saneamento básico propiciam a contaminação de coleções hídricas e de criadouros naturais dos moluscos hospedeiros intermediários, assim como as variações climáticas favorecem o alastramento dos criadouros do caramujo vetor (GOMES et al., 2012; BARRETO et al, 2015). Essa região é constituída por 43 municípios e em estudo realizado por Campos (2014), foi observado que na distribuição espacial dos portadores de esquistossomose atendidos no Hospital das Clínicas, no período de 2010 a 2012, a grande quantidade de casos registrados foram provenientes da mesorregião da Zona da Mata, exposto no quadro 3.

Tabela 3 - Distribuição das frequências dos municípios com registros de caso em que houve contato com coleções hídricas nos anos de 2010 a 2012

Municípios com registro de contato com coleções hídricas	Quantidade de casos	%	Mesorregião
Vitória de Santo Antão	25	8.4	Zona da Mata
Jaboatão dos Guararapes	21	7.1	Metropolitana
Escada	19	6.4	Zona da Mata
Nazaré da Mata	18	6.1	Zona da Mata
Aliança	9	3.0	Zona da Mata
Limoeiro	9	3.0	Zona da Mata
Rio Formoso	9	3.0	Zona da Mata
São Lourenço da Mata	9	3.0	Metropolitana
Carpina	8	2.7	Zona da Mata
Palmares	8	2.7	Zona da Mata
Recife	8	2.7	Metropolitana

Timbaúba	8	2.7	Zona da Mata
Goiana	7	2.4	Metropolitana
Bom Jardim	6	2.0	Agreste
Cabo de Santo Agostinho	6	2.0	Metropolitana
Catende	6	2.0	Agreste
Ipojuca	6	2.0	Metropolitana
Paudalho	6	2.0	Zona da Mata
Camaragibe	5	1.7	Metropolitana
Chã de Alegria	5	1.7	Zona da Mata
Gravatá	5	1.7	Agreste
Moreno	5	1.7	Metropolitana
Paulista	5	1.7	Metropolitana
Vicência	5	1.7	Zona da Mata
São Vicente Férrer	4	1.4	Zona da Mata
Água Preta	3	1.0	Zona da Mata
Barreiros	3	1.0	Zona da Mata
Bom Conselho	3	1.0	Zona da Mata
Buenos Aires	3	1.0	Zona da Mata
Canhotinho	3	1.0	Agreste
Caruaru	3	1.0	Agreste
Glória do Goitá	3	1.0	Zona da Mata
João Alfredo	3	1.0	Zona da Mata
Machados	3	1.0	Zona da Mata
Orobó	3	1.0	Zona da Mata
Ribeirão	3	1.0	Zona da Mata
Demais municípios	41	13,9	-
TOTAL	296	100	

Fonte: CAMPOS, 2014

No entanto, foi observada nos últimos anos uma redução da mortalidade por esquistossomose no Nordeste, Sudeste e Centro-Oeste. Esse fato poderia ser explicado por alguns pontos relevantes, como as ações em saúde pública, a elevação socioeconômica e o distanciamento das fontes hídricas que abrigam os moluscos infectados pelo *S. mansoni*. O ministério da Saúde (2019) chama atenção para o decréscimo nos indicadores de morbimortalidade no período de 2003 a 2017, onde foi observado uma redução de 74% nas taxas de internações e de 11% na taxa de óbitos por 100 mil habitantes. Semelhantemente pode ser verificado em estudo realizado, entre 2007 e 2015, por Soares e colaboradores, evidenciando uma redução importante no percentual de casos positivos no estado de Pernambuco, de 10,31% no início do período para 3,01% (SOARES et al., 2019).

A região da Zona da Mata apresenta os piores resultados no que diz respeito a redução de casos, mostrando que a redução não ocorreu de forma uniforme para todas as regiões de saúde. A manutenção dos indivíduos positivos pode estar ligada tanto a questões da fisiopatologia das formas graves da doença quanto à ineficácia do praziquantel, utilizado como estratégia isolada em regiões hiperendêmicas (BRITO

et al., 2020). Esse fato pode ser observado em estudo sobre eficácia do praziquantel, realizado no Quênia, por quatro anos (2010-2014), em 67 crianças. Os resultados encontrados mostram que para 15 delas, a carga parasitária não diminuiu, revelando a capacidade do parasito, apesar do tratamento, permanecer em áreas endêmicas (LELO et al., 2014).

Visando o enfrentamento às doenças negligenciadas, o Governo de Pernambuco articulou ações de promoção, prevenção e controle das doenças, organizando uma série de intervenções em municípios prioritários por meio do Programa SANAR (Programa de Enfrentamento às Doenças Negligenciadas – SANAR), instituído através do Decreto nº 39.497 em 2013. Inicialmente, ao fim do quadriênio 2011-2014, o programa teve como foco 108 municípios, passando ao final do quadriênio 2015-2018 a atuar em 144 municípios do estado (SEVS/SES-PE, 2017). Apesar da diminuição nos casos, a esquistossomose ainda é um grave problema de saúde pública que está longe de ser erradicado, mostrando que os esforços realizados não são suficientes, necessitando de maior atenção aos fatores chaves no controle da doença.

2.2 *Schistosoma mansoni*

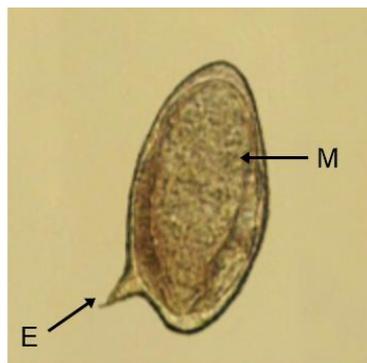
2.2.1 Aspectos morfológicos de *Schistosoma mansoni* nos diferentes estágios evolutivos

A esquistossomose mansônica (EM) é causada pelo trematódeo *Schistosoma mansoni* pertencente ao filo Platyhelminthes da Classe Trematoda (SILVA et al., 2008). Esta espécie habita nos hospedeiros vertebrados, no sistema porta e veias mesentéricas inferiores, apresentando diferenças marcantes com relação aos demais trematódeos. O *S. mansoni* possui dimorfismo sexual, isto é, separação nítida entre vermes machos e fêmeas, e alterações morfológicas são observadas ao longo do seu ciclo de vida, sendo possível distinguir diferentes formas evolutivas: ovo, miracídio, esporocisto, esquistossômulo e verme adulto (CAVALCANTI, 2008; NEVES et al., 2016).

2.2.1.1 Ovos

Os ovos (Figura 5) são produzidos nas glândulas vitelínicas e no ovário das fêmeas e passam por algumas modificações, do primeiro ao quarto estágio de maturação, até sua eliminação. Após 45 dias infecção os ovos podem ser encontrados no material fecal, medindo cerca de 150 μm de comprimento por 60 - 65 μm de largura, quando maduros. Apresentam formato oval sendo facilmente reconhecidos pela presença de um espículo ou espinho lateral, situado no polo posterior, medindo cerca de 20 μm de comprimento e formado pela membrana externa do ovo. Tem em sua constituição uma casca proteica com uma série de micro espinhos, já internamente pode ser observado uma membrana, o espaço granuloso entre a membrana e a casca (camada de Reynolds) e as células vitelínicas que originarão os miracídios. Em seu último estágio de maturação contém em seu interior um miracídio formado, que apresenta 20 dias de tempo médio de vida dentro do ovo no tecido, já no ambiente tem sobrevida de 2-5 dias sendo preciso contato aquático, luminosidade e temperatura adequada para sua eclosão e evolução (BRASIL, 2014; SILVA et al.; 2008; CARVALHO, et al. 2008; DORSEY et al., 2002; NEVES et al., 2016).

Figura 5 – Ovo de *Schistosoma mansoni*. Espículo lateral (E) e miracídio interiorizado (M)



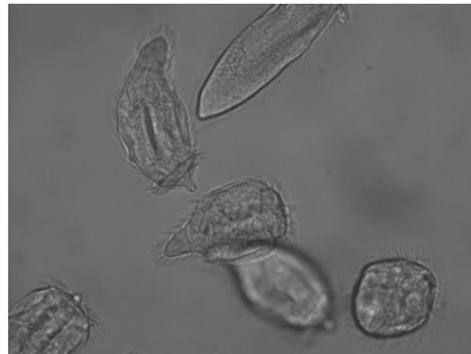
Fonte: CARVALHO, et al. 2008

2.2.1.2 Miracídios

Com forma cilíndrica, o miracídio (Figura 6) mede cerca de 150-180 μm de comprimento por 60 μm de largura. Sua superfície é composta por 21 placas epidérmicas ciliadas que auxiliam no nado e estão agrupadas em quatro fileiras.

Apresenta em sua porção anterior o terebratorium, isto é, uma papila apical em forma de cone contendo uma abertura de glândulas adesivas e de penetração e vários receptores sensoriais. Diferente dos outros trematódeos, o *S. mansoni* não apresenta glândulas cefálicas, todavia já foi observado componentes de um sistema de detecção de luz consistente com o fototropismo positivo. Seu sistema excretor elimina seus produtos de excreção e regula os seus líquidos internos, esse mecanismo é possível devido a dois pares de células em flamas ou solenócitos que seguem por túbulos coletores e finalizam nas laterais do corpo para o meio externo (VERJOVSKI-ALMEIDA et al., 2003; CARVALHO, et al. 2008).

Figura 6 – Miracídio de *Schistosoma mansoni*: Miracídios em microscopia de luz.



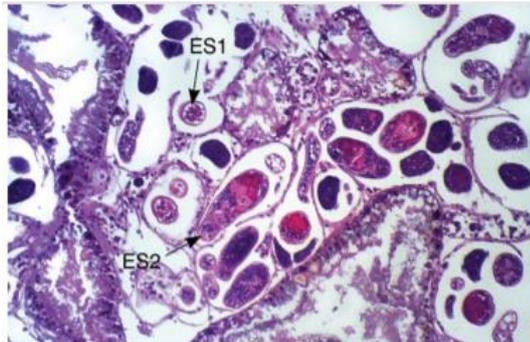
Fonte: FIOCRUZ, 2008

2.2.1.3 Esporocistos primário e secundário

A passagem de fase de vida livre do miracídio para a vida parasitária de esporocisto (Figura 7) é decorrente da necessidade de habitar em um novo ambiente com diferentes condições fisiológicas, como temperatura, oxigenação e pH. Após penetração no seu hospedeiro (tecidos moles dos caramujos) os miracídios passam por variadas modificações. Após duas horas eles perdem seu revestimento epitelial ciliado e outras estruturas externas responsáveis pela penetração se transformando em uma estrutura sacular alongada. Seguidas 24 horas de infecção é iniciada a formação de microvilosidades sobre uma nova membrana externa que está sendo formada com função de realizar trocas metabólicas e interagir com o meio celular do hospedeiro onde se encontra. Após 72 horas destaca-se a nova camada superficial ao redor do esporocisto primário ou mãe, e é por meio deste tegumento que é realizado absorção de nutrientes, já que este não apresenta sistema digestivo (CHIA-

TUNG, 1996; SILVA et al.; 2008). Após alguns dias, e depois de passarem por alterações, o esporocisto secundário ou filha é originado e após sofrerem modificações anatômicas os esporocistos secundários atingem a maturidade e abandonam o esporocisto mãe. (SILVA et al.; 2008).

Figura 7 – Esporocisto primário (ES1) e secundário (ES2) de *Schistosoma mansoni* em corte histológico de *Biomphalaria sp.*



Fonte: CARVALHO, et al. 2008

O tempo necessário para o desenvolvimento em cercárias maduras no esporocisto é de três a quatro semanas. A liberação cercariana não ocorre apenas uma única vez, e sim de maneira cadenciada e diante de estímulos ambientais. A justificativa encontrada para explicar este acontecimento é o conceito discutido por alguns autores da formação de um terceiro esporocisto, dando continuidade a uma nova geração de esporocistos (MEULEMAN et al., 1980; BAYNE & GREVELDING, 2003).

2.2.1.4 Cercárias

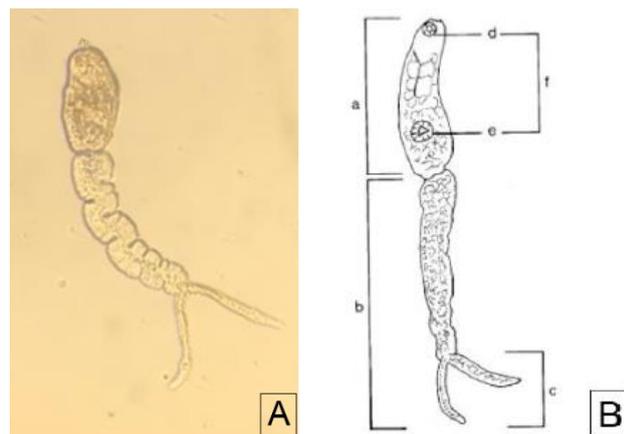
Medindo cerca de 500 μm de comprimento, as cercárias (Figura 8) tem um corpo alongado e cilíndrico com uma cauda de extremidade curta e bifurcada essencial no seu deslocamento. A cauda cercariana apresenta uma camada longitudinal e circular com duas ou três miofibrilas na sua camada longitudinal (DORSEY et al., 2002; NEVES et al., 2016).

O corpo cercariano mede cerca de 200 μm de comprimento e nele estão presentes duas ventosas: a oral e a ventral (ou acetábulo). Também são observados espinhos e grânulos no revestimento do corpo cercariano e em toda extensão da cauda. O corpo cercariano possui estruturas fundamentais, além das já citadas, como

células musculares, nervosas, do sistema digestivo, papilas sensoriais, células do sistema osmorregulador e células germinativas que irão se desenvolver nos órgãos reprodutivos nos vermes adultos, machos ou fêmeas (DORSEY et al., 2002; CAVALCANTI et al. 2009). Na sua região anterior há a presença de receptores sensoriais, terminações nervosas que estão localizadas na superfície das cercárias, que regulam seu comportamento no ambiente através de respostas aos sinais térmicos, químicos e mecânicos. Esta interação com o meio ambiente ocorre através de cílios ou até mesmo através de aberturas no tegumento da cercaria (NEVES et al., 2016; SILVA et al.; 2008).

A cercária é revestida por um tegumento sincicial, apresentando uma região citoplasmática anucleada que está unida diretamente à membrana superficial contínua. A superfície externa do seu tegumento é formada por uma membrana plasmática sobre uma membrana basal, ambas trilaminadas. Na sua superfície também é possível observar a presença de numerosas fibrilas denominadas glicocálix, que dentre outras funções, protegem a permeabilidade da cercária (DORSEY et al., 2002; SILVA, 2008).

Figura 8 – Cercária de *Schistosoma mansoni*: (A) exemplo de cercária em microscopia de luz. (B) cercária com ênfase nas estruturas: (a) corpo; (b) cauda; (c) bifurcação na cauda; (d) ventosa oral; (e) ventosa ventral ou acetábulo; (f) distância entre as ventosas.



Fonte: Arquivo pessoal, 2021; SILVA et al., 2000.

2.2.1.5 Esquistossômulos

Alterações bioquímicas e morfológicas ocorrem no processo de transformação de cercária para esquistossômulos (Figura 9). A partir da penetração na pele do hospedeiro definitivo, a cauda se desprende e seu tegumento se torna especializado para absorção, secreção e como local das ações imunológicas do hospedeiro. Esse novo ambiente induz alterações no verme para sua sobrevivência e desenvolvimento já que está passando da vida livre para uma vida parasitária (SKELLY E SHOEMAKER, 2000). Durante a transição ocorre uma reorganização do tegumento, apresentando grandes vacúolos, corpos alongados e pequenos corpos membranosos. Com cerca de três horas a grande maioria de sua membrana externa é heptalaminada e com 24 horas a principal modificação observada é a presença de pregas e cavidades na sua superfície (MCLAREN, 1980; HOCKLEY & MCLAREN, 1973). Durante sua migração no hospedeiro, o esquistossômulo passam por modificações chegando a medir cerca de 400 µm de comprimento com as extremidades cobertas de espinhos, tendo seu formato mais alongado e estreito. Também são observadas alterações no tubo digestivo com evolução de um ceco bifurcado que se une após a ventosa ventral formando assim um único ceco. É no sistema porta-hepático que os vermes jovens iniciam seu processo de maturação (PINTO et al. 1990; CARVALHO, et al. 2008).

Figura 9 – Esquistossômulo de *Schistosoma mansoni*.



Fonte: SILVA et al., 2008

2.2.1.6 Vermes jovens

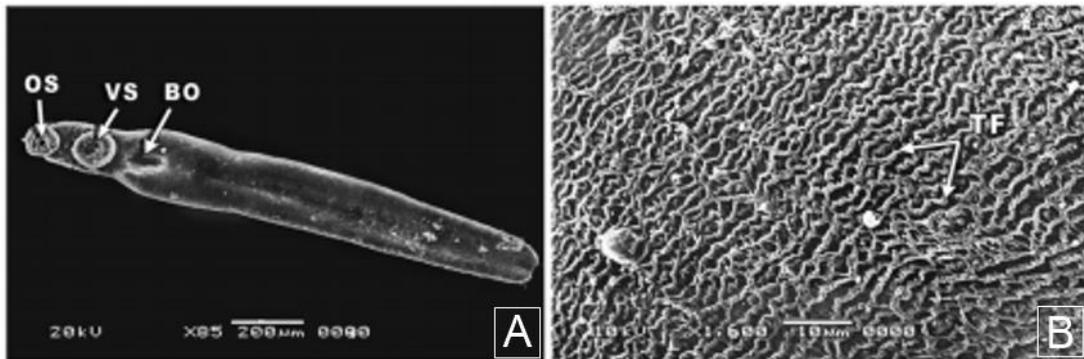
No sistema porta-hepático, o processo de maturação é iniciado sendo bem característico com 21 dias. No décimo sexto dia a aparência geral dos vermes jovens difere bastante dos vermes adultos, apresentando menos de 0,5 mm e superfície dorsal e ventral semelhantes. Nesta fase é geralmente impossível distinguir entre machos e fêmeas (VOGE et al., 1978) (Figura 10). Estudos realizados por Kamel e colaboradores (2017) em vermes juvenis (21 dias) de *S. mansoni* demonstraram nesse período a presença da ventosa oral e ventral, e já evidenciando a formação de um sulco, que futuramente se desenvolverá no canal ginecóforo. Nesse período também é possível observar a superfície dorsal dos vermes jovens coberta por fileiras de dobras tegumentares (Figura 11 A-B) (KAMEL et al.; 2017).

Figura 10 – Vermes jovens (16 dias) de *Schistosoma mansoni*, com cerca de 0,4 mm de comprimento.



Fonte: Voge et al., 1978

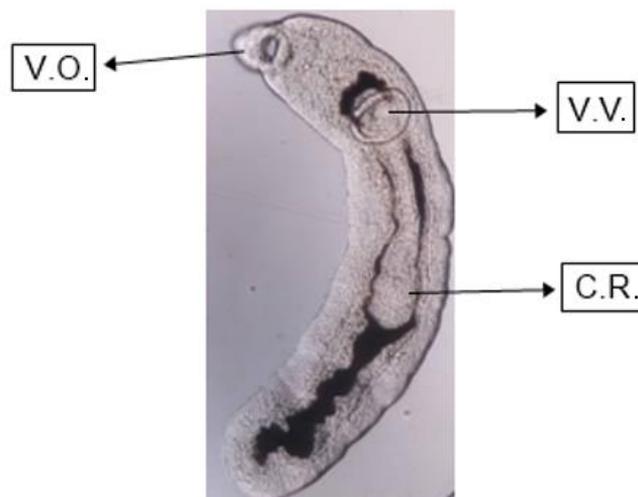
Figura 11 – Microscopia eletrônica de varredura (MEV) de vermes jovens de *Schistosoma mansoni*. (A) Vermes jovens apresentando: Ventosa oral (V.O), ventosa ventral (V.V) e formação do sulco (S), marcando o início do canal ginecóforo. (B) Superfície dorsal de vermes jovens mostrando fileiras de pregas tegumentares (P.T). (C) Verme jovem (21 dias) e suas estruturas.



Fonte: KAMEL et al., 2017

O seu sistema digestivo tem início na boca, localizado próximo da ventosa oral, seguido de um esôfago que se une posteriormente a um ceco ramificado (Figura 12). Os machos jovens e ainda pouco desenvolvidos apresentam dois lobos testiculares, por outro lado, as fêmeas jovens, em contraste às adultas já desenvolvidas, apresentam útero rudimentar e seu tegumento composto por estrias bem-organizadas, largas e profundas (SILVA et al.; 2008; KAMEL et al.; 2017).

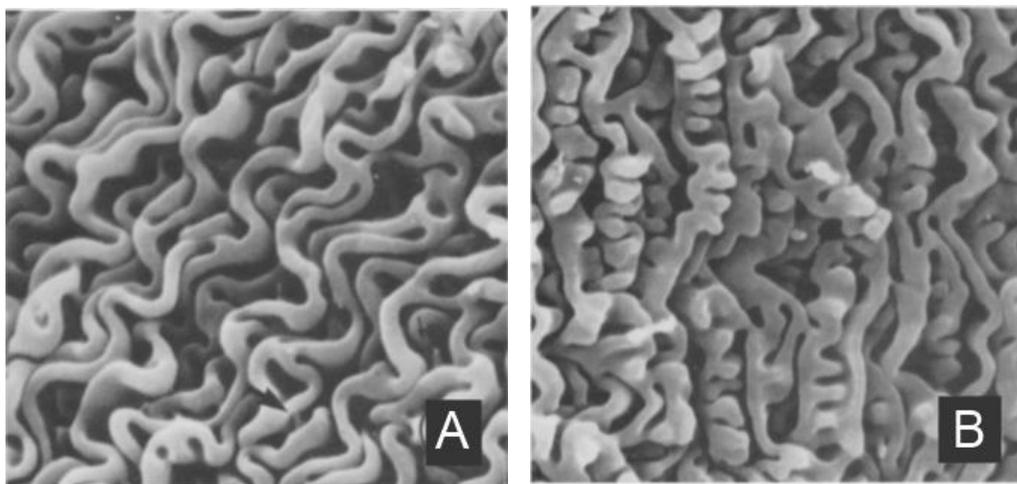
Figura 12 – Verme jovem (21 dias). Ventosa oral (V.O.); ventosa ventral (V.V.); Ceco ramificado (C.R.).



Fonte: SANTOS, 2018

Um processo de grande relevância durante o desenvolvimento e crescimento dos vermes é a formação do seu tegumento. É importante ressaltar que o tegumento do parasito é renovado a cada seis horas, e além de desempenhar importante papel na defesa frente ao sistema imunológico do hospedeiro, também está envolvido na absorção de nutrientes, osmorregulação e excreção (KAMEL et al.; 2017; OLIVEIRA et al., 2013). Com relação a esta importante estrutura, na quarta semana a superfície do corpo do macho jovem (20 dias) apresenta-se lisa e com presença de organelas sensoriais. Já na face dorsal o tegumento demonstra protuberâncias (tubérculos) com presença de espinhos (Figura 13-A) Estudos realizados por Voge e colaboradores (1978) constataram que à medida que os vermes aumentam de tamanho, o tegumento começa a apresentar pregas mais profundas, dando assim uma aparência mais enrugada. Cada dobra formada pode desenvolver reentrâncias adicionais (Figura 13-B). Se presentes, os espinhos e bulbos sensoriais podem ficar escondidos pelas dobras.

Figura 13 – Desenvolvimento de características tegumentares de vermes de *Schistosoma mansoni*. (A) microscopia da superfície dorsal da fêmea de *Schistosoma mansoni* aos 20 dias de idade. (B) superfície dorsal de verme com 20 dias de idade.



Fonte: VOGÉ et al.,1978

O tegumento neste momento apresenta duas superfícies, uma externa em contato direto com o hospedeiro, composto de dupla camada lipídica, e a superfície basal interna, constituída de uma única membrana com dupla camada. Os cítons, são as células subtegumentares, que estão diretamente conectadas ao tegumento por ligações mediadas por microtúbulos. Essas células possuem núcleo, mitocôndrias,

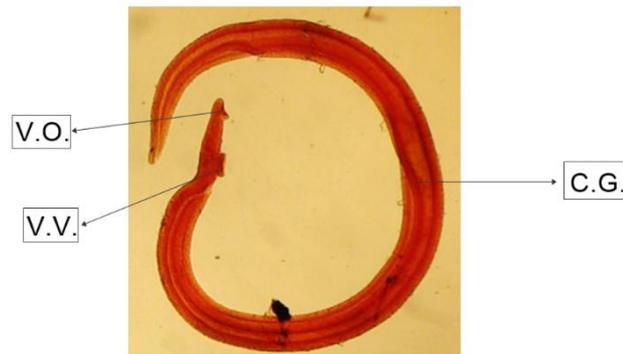
complexo de Golgi, corpos membranosos, retículo endoplasmático e corpos discoides no local de união à superfície externa (SILVA et al.; 2008).

Na quarta semana os machos já apresentam oito lóbulos testiculares, onde é observada a presença de espermatozoides. Nesse período as fêmeas já começam a desenvolver um pequeno ovário e o oótipo, local onde o ovo é encontrado em processo de formação. Por volta da quinta semana o canal ginecóforo é formado após dobramento das extremidades laterais do corpo e nas fêmeas, a proteína da casca do ovo está presente e os folículos ovarianos se desenvolvem ao longo de seu corpo (SILVA et al.; 2008).

2.2.1.7 Vermes adultos

Os vermes machos adultos apresentam coloração esbranquiçada medindo cerca de 10mm de comprimento e tem seu tegumento coberto por pequenos tubérculos. É achatado dorsoventralmente formando um tubo longitudinal conhecido como canal ginecóforo (SILVA et al. 2008). Traz na sua extremidade anterior uma ventosa oral e uma ventral (acetábulo), e na sua extremidade posterior está localizado o canal ginecóforo com função de albergar e fecundar a fêmea (Figura 14). Após a ventosa oral se encontra o esôfago e o ceco único terminando na extremidade posterior. A vesícula seminal se encontra unida ao poro genital através do ducto ejaculatório e unida ao testículo através do ducto deferente que está situado na porção final do canal ginecóforo. Desde que desprovido de órgão copulador, a fêmea é fecundada por meio do envoltório do canal ginecóforo, onde os espermatozoides são liberados no poro genital, dessa forma alcançando a fêmea. O acasalamento é fundamental para manutenção da maturidade sexual das fêmeas (MARTINEZ et al. 2003; NEVES, 2016).

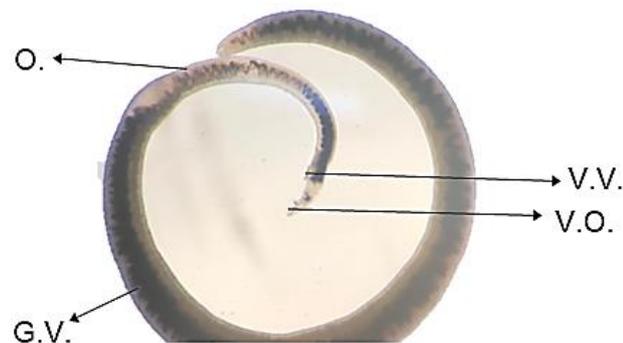
Figura 14 – Verme adulto macho se *Schistosoma mansoni*. Ventosa oral (V.O.), ventosa ventral (V.V.) e canal ginecóforo (C.G.).



Fonte: Universidade do Panamá, 2021

Os vermes adultos fêmeas diferem do macho apresentando comprimento mais longo e corpo cilíndrico medindo cerca de 15mm de comprimento (Figura 15). Sua superfície é lisa e de aparência translúcida, permitindo visualização de uma coloração amarronzada devido à presença do pigmento hemozoína no tubo digestivo, decorrente do metabolismo da hemoglobina do sangue do hospedeiro. São filiformes e sua ventosa oral e ventral (ou acetábulo) são de tamanhos inferiores quando comparadas aos do macho. Seu sistema reprodutor tem início abaixo do acetábulo, pela vulva, seguida pelo útero, oótipo e ovário. O oótipo é envolvido por células glandulares sendo uma de suas funções estimular as células vitelínicas, que ocupam a maior parte do corpo da fêmea, e que apresentam diferenças no tamanho e na função de sintetizar material para formação da casca do ovo (CARVALHO et al. 2008; PEREIRA et al. 2012).

Figura 15 – Verme adulto fêmea de *Schistosoma mansoni*. Ventosa ventral (V.V.), ventosa oral (V.O.), ovário (O.), glândulas vitelínicas (G.V.).



Fonte: Arquivo pessoal, 2021

2.2.2 Ciclo biológico do *Schistosoma mansoni*

O ciclo do *Schistosoma mansoni* requer passagem por dois hospedeiros, sendo categorizado por um ciclo do tipo heteroxênico. No hospedeiro definitivo, representado pelo homem, se realiza a reprodução sexuada dos vermes adultos e no hospedeiro intermediário, representado por moluscos do gênero *Biomphalaria*, ocorre a reprodução assexuada.

O homem infectado com casais de *S. mansoni* libera em suas fezes ovos maduros contendo no seu interior miracídios, larva aquática de vida livre infectante ao caramujo. Em contato com a água no meio externo, em condições adequadas de umidade, oxigenação da água, luminosidade e de temperatura média de 28°C, os ovos maduros eclodem e os miracídios são liberados. Com o auxílio das suas estruturas ciliares essas larvas são capazes de nadar em busca do hospedeiro intermediário, os caramujos de água doce pertencente ao filo Molusca, e gênero *Biomphalaria* (Figura 16). O encontro e reconhecimento ao caramujo é feito através de mecanismo quimiotáticos, por gradientes de partículas presentes no muco do caramujo que são detectados pelos miracídios (SOUZA, 2011; BRASIL, 2014; NEVES, 2016).

Figura 16 – Caramujos da espécie *Biomphalaria glabrata* in natura.



Fonte: Arquivo pessoal, 2021

Ao entrar em contato com os caramujos, os miracídios liberam o conteúdo de sua glândula de adesão e seu terebratorium assume forma de ventosa, que somados aos movimentos rotatórios e contráteis garantem a penetração da larva. As enzimas proteolíticas garantem a digestão dos tecidos moles do caramujo, tendo esse processo em média duração de 10 a 15 minutos (NEVES, 2016). No tecido do caramujo, o miracídio se reestrutura se desfazendo de sua camada ciliada e perdendo

parte de seus componentes externos. Em cerca de 48 horas, as células restantes se reorganizam formando um saco alongado contendo células germinativas, chamado de esporocisto I (primário ou mãe). Esta estrutura sacular se diferenciará em esporocisto secundário por um processo de poliembrião, que posteriormente se diferenciam em cercárias. As células germinativas se dividem e se diferenciam carregando consigo o mesmo sexo do miracídio que o originou. Esse processo leva aproximadamente 30 dias após a infecção do caramujo. Cerca de 100 a 300 mil cercárias podem ser geradas provenientes de um único miracídio (SILVA et al.; 2008; GRYSSELS et al. 2006).

Estímulos, tais como temperatura e luz, influenciam na emergência cercariana, isto é, na saída das cercárias dos caramujos. Além disso, as cercárias no ambiente respondem a diversos estímulos, como por exemplo, a turbulência e escuridão que aumentam seu período de natação, em contrapartida os produtos químicos da pele causam constante natação, aumentando a probabilidade de encontro com seu hospedeiro. As cercárias recém-eliminadas nadam em busca do hospedeiro, com movimentos oriundos, sobretudo, pela movimentação da cauda. No meio aquático o tempo médio de vida cercariana é de 36-48 horas (CURWEN & WILSON, 2003; MCKERROW, 2003).

A infecção ao hospedeiro definitivo tem início quando este entra em contato com água contendo as cercárias que penetram através da sua pele ou mucosa. As cercárias apresentam maior capacidade de infecção nas suas primeiras 8 horas de vida, e alguns sinais químicos, térmicos e mecânicos estão relacionados diretamente à probabilidade de encontro ao hospedeiro. A adesão ocorre através da região da ventosa oral e no processo de penetração ocorre a liberação das enzimas proteolíticas, que associado à sua ação mecânica rotatória favorece a passagem do corpo cercariano, com conseqüente perda da cauda. Esse processo de penetração varia de hospedeiro para hospedeiro, no homem dura aproximadamente 15 minutos (SILVA et al. 2008; BRACHS e HASS, 2008; HAEBERLEIN e HASS, 2008).

O corpo cercariano, agora denominado esquistossômulo, passa por alterações em busca de adaptação ao ambiente em que se encontra. Seu tegumento trilaminar passa a ser uma estrutura heptalaminar, que protege e “esconde” o parasito do sistema imunológico ao possibilitar sua adesão a diversas proteínas do hospedeiro. Também se observa troca do metabolismo oxidativo para o anaeróbio facultativo. Os esquistossômulos inicialmente transitam por estruturas que compõem a epiderme e

derme extravascular e a última barreira a ser vencida antes de caírem na circulação sanguínea ou linfática é a parede dos vasos (SKELLY e WILSON, 2006; NEVES, 2016).

O sistema venoso é a principal rota da pele para os pulmões e somente uma pequena fração utiliza a via linfática. Do pulmão os esquistossômulos são carregados para o lado direito do coração sendo então distribuídos para os pulmões através da artéria pulmonar, sendo conhecidos nessa fase como esquistossômulos pulmonares. A densidade de esquistossômulos no pulmão é aumentada entre o segundo e oitavo dia de infecção, e seu desenvolvimento completa-se nos vasos intra-hepáticos. Nesse local vão se acumulando podendo ser encontrado tanto vermes jovens como adultos (SKELLY e WILSON, 2006; NEVES, 2016).

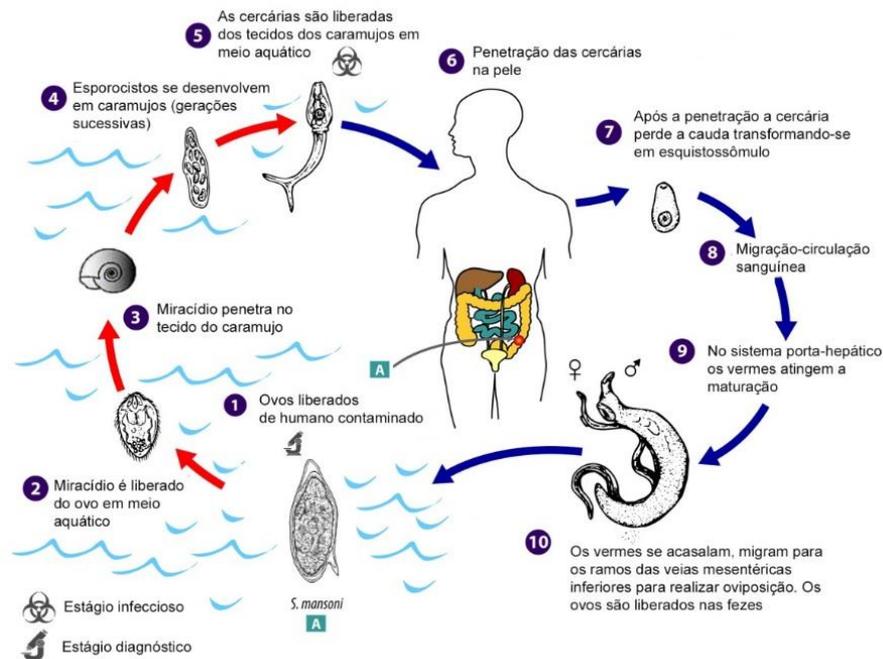
A literatura demonstra a possibilidade de três vias de migração dos pulmões para o sistema porta-hepático: Intravascular direta que pode ocorrer sem recirculação (modelo passivo) ou com recirculação; Intravascular reversa (modelo ativo) onde os esquistossômulos, após atingirem os pulmões, migrariam contra a corrente sanguínea; Transdiafragmática, nesse modelo os esquistossômulos escapariam dos capilares pulmonares em direção aos alvéolos seguindo através do tecido pulmonar até atingirem os vasos intra-hepáticos, para isso atravessando o diafragma e a cápsula hepática. Das vias exemplificadas, a via intravascular direta com recirculação mostrou ser a de maior comprovação. Nesta os esquistossômulos transitariam pela circulação pulmonar-sistêmica, sendo transportados até as câmaras esquerdas do coração para a aorta e desta seguindo para o sistema porta-hepático através das artérias hepáticas ou mesentéricas. Vários circuitos desse processo migratório podem ser necessários antes que os esquistossômulos logrem o sistema porta-hepático (MILLER e WILSON, 1980; GEORGI, WADE e DEAN, 1987; WILSON, 2009; SKELLY e WILSON, 2006; NEVES, 2016).

Os esquistossômulos são induzidos a completarem sua maturidade nos vasos intra-hepáticos entre 10 e 20 dias após a infecção, sendo observados vermes com sangue ingerido e aumento de seu volume corporal. O amadurecimento sexual na fêmea tem início com a sua chegada ao sistema porta-hepático e de seu contato íntimo com o macho, sendo isto um pré-requisito para seu amadurecimento. Por volta da terceira semana de infecção ocorre a migração para as veias mesentéricas inferiores onde comumente ocorre o acasalamento, onde o macho mantém a fêmea em seu canal ginecóforo ajudando-a na digestão do sangue e no seu transporte para

os locais de postura dos ovos entre o 30º e o 34º dia de infecção (STANDEN, 1953; CLOUGH, 1981; WHEATER e WILSON, 1979).

A migração dos ovos para a luz intestinal ocorre concomitante ao processo de maturação do miracídio dentro do ovo, que dura em média de 6-7 dias. A passagem ocasiona micro hemorragias e áreas de inflamação que são responsáveis pelo surgimento de diarreia. Em caso de não alcançar a luz intestinal os ovos podem permanecer presos na parede intestinal ou serem arrastados em direção ao fígado. É possível observar presença de ovos maduros no material fecal do hospedeiro definitivo após cerca de 42-45 dias de infecção. No ambiente os ovos permanecem viáveis por cerca de 4 a 5 dias desde que em lugares úmidos, e sob determinadas condições descritas anteriormente, os ovos eclodem liberando o miracídio reiniciando dessa maneira o seu ciclo biológico (Figura 17) (NEVES, 2016).

Figura 17 – Ciclo biológico do *Schistosoma mansoni*. A figura apresenta as formas do parasita (ovo, miracídio, cercária, esquistossômulo, vermes adultos) e seus hospedeiros intermediário (*Biomphalaria glabrata*) e definitivo (vertebrado).



Fonte: Adaptado de dpd.cdc.gov, 2019

2.2.3 Patogenia

A patogênese da esquistossomose e as lesões causadas ao organismo parasitado dependem de vários fatores: Da cepa, da carga parasitária, da idade e estado nutricional do hospedeiro, bem como da sua resposta imune às agressões do parasito. O quadro clínico da doença e suas características patogênicas podem ser divididos em duas fases: Aguda e crônica (NEVES, 2016; KLAVER et al., 2015).

É possível definir sintomas clássicos característicos de cada estágio da doença, no entanto em seus primeiros momentos pode passar despercebida ou assintomática na maioria dos portadores (VALE et al. 2017). A fase aguda pode perdurar até 120 dias após a infecção e engloba sintomas iniciais muitas vezes inespecíficos. Inicialmente os indivíduos podem apresentar uma reação inflamatória ocasionando uma erupção cutânea, a chamada dermatite cercariana ou dermatite do nadador, decorrente do contato e morte de cercárias que penetraram na pele do hospedeiro. Essas lesões podem ser visualizadas a partir de 1 hora após exposição e contato do hospedeiro, apresentando tamanho de 1-3 centímetros (ROSS et al., 2007; NEVES, 2016; LICHTENBERGOVA et al., 2008; VITORINO et al., 2012).

Após três a quatro semanas, dependendo da carga parasitária e da sensibilidade do hospedeiro, pode surgir o quadro clínico descrito como forma toxêmica. Este quadro é decorrente de uma reação de hipersensibilidade sistêmica ocasionada pela migração dos esquistossômulos ou ovos que ocorrem entre 14-84 dias após a infecção primária. Seus sintomas gerais incluem febre, fadiga, mal-estar, mialgia, tosse, leucocitose com eosinofilia, perda de peso, dispneia, dor na região do fígado ou do intestino, hepatoesplenomegalia discreta, diarreia acompanhada ou não por sangue, entre outros. Os sintomas são intensificados entre a quinta e sexta semana coincidindo com o período de oviposição. Nessa fase toxêmica, na maioria dos casos, há evolução de forma lenta para a esquistossomose crônica, caso o paciente não seja submetido a tratamento específico. É importante pontuar que as manifestações agudas são comuns nos indivíduos expostos pela primeira vez, todavia essas manifestações são raras nas populações de áreas endêmicas (GRYSEELS et al., 2006; ROSS et al., 2007; BRASIL, 2014; NEVES, 2016; VITORINO et al., 2012).

Na fase crônica existem grandes variações clínicas, e as principais lesões são decorrentes das reações imunológicas dos antígenos presentes no ovo de *S. mansoni*. Uma fração dos ovos serão lançados no meio externo junto ao bolo fecal e

os demais ficarão retidos e serão arrastados para o fígado ou, mais raramente, para outros órgãos, resultando na formação de granulomas e tecidos fibróticos (ROSS et al. 2007; HAMS e AVIELLO; FALLON, 2013). Na forma intestinal, o paciente pode apresentar fibrose da alça retossigmóide, ocasionando uma diminuição do peristaltismo e conseqüentemente constipação. Os sintomas caracterizam-se por dor abdominal crônica, desconforto, falta de apetite, fezes mucossanguinolentas, o que leva o indivíduo infectado a apresentar anemia, podendo estar associada à passagem dos ovos para o lúmen intestinal (ROSS et al., 2007; CARVALHO, 2008; NEVES, 2016).

As alterações encontradas no fígado surgem concomitantemente ao início da oviposição e formação dos granulomas, desencadeados devido a presença dos ovos arrastados para esse órgão. Os ovos liberam antígenos chamados de SEA (Soluble egg antigens – Antígenos solúveis do ovo), que induz liberação de citocinas pró-inflamatórias. A resposta inflamatória resulta na formação de uma barreira para conter o patógeno, células semelhantes a fibroblastos vão substituindo as células inflamatórias, se reunindo e organizando-se em camadas concêntricas fabricando grande quantidade de colágeno, ao final a formação do granuloma irá acarretar a perda da função da região acometida ao hospedeiro. Esses granulomas podem ser isolados ou múltiplos, com ou sem fibrose podendo também ser encontrado regiões de calcificação (HANG et al., 1974; HAMS; AVIELLO e FALLON, 2013).

A fibrose periportal, caracterizando a “fibrose de Symmers”, é uma das alterações provocadas no fígado resultando na perda da elasticidade com obstrução parcial ou total dos vasos sanguíneos acarretando hipertensão portal ao indivíduo. Essa manifestação, decorrente da formação de granulomas devido a grande quantidade de ovos nesse órgão, poderá levar ao desenvolvimento no paciente de uma série de outras alterações como a esplenomegalia, causada pela reação imunoalérgica resultando em hiperplasia do baço; ascite, conhecida como “Barriga D’água”, que pode ser observada nos quadros clínicos avançado das formas mais graves da esquistossomose sendo decorrente de alterações hemodinâmicas da circulação portal; e formação de varizes gastresofágicas como uma forma de compensação do organismo, essas varizes podem ser sensíveis e possuem um alto risco de rompimento podendo levar a hemorragia, o que pode ser fatal. Pacientes com este grau de acometimento de forma crônica estão com maior frequência nos registros de óbitos (ROSS et al. 2007, NEVES, 2016; GRYSEELS et al., 2006).

2.2.4 Tratamento

A quimioterapia é a medida principal utilizada para o controle de morbidade da esquistossomose. Inicialmente os primeiros compostos utilizados para o tratamento da esquistossomose, dentre eles compostos sintéticos derivados dos sais de antimônio e o lucantone, tiveram sua utilização proibida devido aos perigos e efeitos adversos apresentados (CARVALHO et al. 1982; KATZ e COELHO, 2008). A oxaminiquine (OXA) foi utilizada por muito tempo no tratamento de milhões de pessoas infectadas com o *S. mansoni*, antes da introdução do praziquantel (PZQ). Apresenta ação específica contra esta espécie e seu protocolo terapêutico consiste na administração oral em dose única, exibindo índice de cura semelhante ao do praziquantel. Seu uso destacava-se pela sua boa tolerância e alta eficácia, sobretudo aos vermes machos, mais susceptíveis ao fármaco. No entanto sua utilização foi suprimida devido a alguns de seus efeitos colaterais, sendo atualmente o praziquantel o fármaco de primeira escolha para o tratamento da esquistossomose (SILVA et al., 2017; CIOLI et al., 2014; NEVES, 2016).

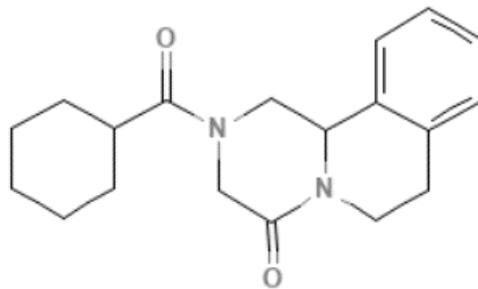
2.2.4.1 Praziquantel (PZQ)

O praziquantel apresenta espectro mais amplo em comparação a oxaminiquine agindo contra todas as espécies do gênero *Schistosoma* que infectam o ser humano. Apresenta elevada taxa de cura, baixo custo e baixa toxicidade, sendo o medicamento de escolha para o tratamento da esquistossomose em todas as suas formas clínicas. Em primeiro momento, o praziquantel foi desenvolvido para o tratamento de cestóides, tendo posteriormente seu uso expandido ao tratamento da esquistossomose. Por conseguinte, também é indicado para tratamento de teníase, cisticercose e contra *Hymenolepis nana* e *Diphyllobothrium spp*, exibindo dessa forma atividade farmacológica mais evidente e significativa contrastando com a atividade da oxaminiquine (SILVA et al., 2017).

O PZQ é um derivado pirazino-isoquinoleínico (Figura 18), de sabor amargo e inodoro, sendo praticamente insolúvel em água, porém solúvel em alguns solventes orgânicos. Apresenta rápida absorção, tendo sua biodisponibilidade significativamente aumentada após refeições gordurosa (DOENHOFF et al., 2008; OLLIARO, 2014). Com maior frequência é possível observar no indivíduo efeitos

adversos que podem ser leves e transitórios, como dor abdominal, diarreia, cefaleia, vômito, anorexia, palpitação, tremor, sonolência e ocasionalmente os pacientes podem apresentar reação urticariforme e febre (JERNIGAN e PEARSON, 1995; NEVES, 2016; BRASIL, 2014). Além disso, um quadro de eosinofilia pode estar presente, decorrente de uma resposta imunológica induzida pela morte dos vermes, com algumas alterações reversíveis das provas de função hepática e hipersensibilidade cutânea, relatada em alguns casos, nesse cenário o PZQ é contraindicado, no entanto é considerado um fármaco seguro, pois não demonstra potencial genotóxico nos testes de mutagênicidade (CHAIRMAN et al., 1991; DOMLING e KHOURY, 2010).

Figura 18 - Estrutura molecular do Praziquantel



Fonte: Pubchem, 2023

É evidente a importância do tegumento ao verme, estando envolvido em funções importantes, como na absorção de nutrientes, equilíbrio osmótico, defesa do sistema imune do hospedeiro e na secreção de metabólitos. Dessa forma, o surgimento de bolhas e vacuolização do tegumento compõem mecanismos de ação importantes relacionado à ação do PZQ (HONG; 2018). O mecanismo de ação do PZQ ainda não está totalmente esclarecido, contudo, estudos evidenciam a importância dos canais de Ca^{2+} voltagem-dependente, que acarretam o influxo acelerado de Ca^{2+} , provocando contração da musculatura lisa, paralisia e consequentemente a morte do parasito (SALVADOR-RECATALA et al. 2008; GREENBERG, 2013). A droga causa paralisia ao verme expondo antígenos-alvo ao sistema imune do hospedeiro. Em poucos minutos após administração da droga os vermes relaxam o acetábulo e são carregados ao fígado onde são expostos às

reações inflamatórias nesse meio (NEVES, 2016; MATOS-ROCHA et al., 2016; VALE et al.; 2017).

Embora comprovada eficácia do PZQ, a principal limitação no uso está relacionada à sua baixa eficácia contra estágios imaturos do verme e não prevenir reinfecções. Além disso, quando apenas vermes machos são considerados, esses irão apresentar maior sensibilidade ao PZQ quando comparado as fêmeas (DOENHOFF et al., 2000; SILVA et al., 2017; CIOLI et al., 2014; GRYSEELS et al., 2001). É alarmante o PZQ ser considerado o único medicamento de escolha para tratar uma doença que afeta milhões de pessoas, principalmente levando em consideração o surgimento de cepas de *Schistosoma* resistentes e/ou pouco sensíveis ao PZQ (ABDUL-GHANI et al., 2009). Esse cenário é preocupante principalmente em diferentes regiões endêmicas, onde se tem alto risco de reinfecções, visto que não existem vacina contra o parasito, o que pode levar a interpretação errônea sobre as taxas de cura. Associado a isto, podemos destacar também falhas no tratamento dos indivíduos infectados, em conjunto com o uso indiscriminado e recorrente do PZQ, tornando pertinente o surgimento de resistência e/ou tolerância (DOENHOFF, CIOLI e UTZINGER, 2008; WANG et al. 2012;). É possível ainda identificar cepas que apresentam naturalmente diferentes susceptibilidades aos fármacos esquistossomicidas, como também cepas resistentes aos PZQ induzidas em laboratório, apesar do mecanismo de resistência não está totalmente elucidado (ISMAIL et al., 1996; BONESSO-SABADINI e DE SOUZA DIAS, 2002; COUTO et al., 2011; COUTO, 2014).

De acordo com pesquisas realizadas por Fallon e Doenhoff (1994), foi evidenciado que camundongos tratados com doses subcurativas desenvolveram resistência ao PZQ, obtendo assim a primeira evidencia de cepas resistentes. Em comunidades do Delta do Nilo no Egito foram relatados pacientes que apresentaram ovos viáveis de *S. mansoni* em suas fezes, mesmo após serem tratados (ISMAEL et al. 1999). Diferentes países da África estão entre os mais citados na literatura referentes a casos de resistência. A fim de buscar explicação para o baixo índice de cura nesses países, Denso-Appiah & De Vlas (2002) avaliaram vários ensaios clínicos realizados com o PZQ, evidenciando em seus resultados que apesar da alta carga parasitária influenciar no índice de cura, não pode ser excluído a resistência, ou forte tolerância da cepa de *S. mansoni* ao PZQ nessa região (DOENHOFF et al. 2009). Em estudo de eficácia para tratamento coletivo, é ressaltado sobre a eficácia do PZQ ser

de apenas 50%, e que essa droga isolada é insuficiente para eliminar a esquistossomose como um problema de saúde pública (ROSS et al., 2017).

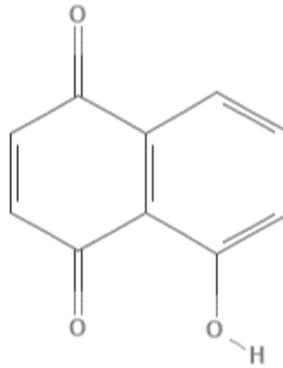
Considerando que a exposição e o emprego do PZQ, sobretudo em regiões endêmicas, ocorrer em larga escala e de forma repetida, o surgimento de cepas resistentes é uma possibilidade que deve ser considerada. As consequências deste cenário podem culminar na diminuição da eficácia do tratamento e persistência da infecção, o que é potencialmente perigoso e aponta a necessidade de identificar novos medicamentos eficazes.

2.2.5 Juglona

A juglona (5-hidroxy-1,4-naftoquinona) (Figura 19) foi isolada pela primeira vez em 1850 e em 1881 foi publicado o primeiro relatório científico sobre seu efeito alelopático, sendo utilizada como ingrediente ativo em remédios fitoterápicos e corantes comerciais (STICKNEY J. HOY P., 1881). Apresenta cor âmbar, com baixa solubilidade em água, ligeiramente solúvel em água quente e solúvel em álcool metílico e etílico, acetona, clorofórmio, benzeno e ácido acético. Tem boa resistência a variação da temperatura, apresentando temperatura de fusão de 155 °C, e é bastante reconhecida e estudada devido a sua importância nas pesquisas biológicas e medicinais (ERDEMOGLU et al., 2003; HARBORNE, 1988; TAKURH, 2011; STRUGSTAD & DESPOTOVSKI, 2012).

É uma naftoquinona encontrada naturalmente em espécies de *Juglans regia*, *Juglans nigra*, *Juglans cineraria* e em outras espécies da família Juglandaceae. Acredita-se que a *J. regia* seja nativa da Grécia e da Península Balcânica, podendo ser encontrada atualmente em diferentes continentes, crescendo na natureza em 19 países do continente asiático como também nos EUA, sendo este um dos maiores produtores de castanha de *J. regia* (WESTWOOD, 1977; TAKURH, 2011). É relatada sua presença, em quantidades significativas, em todas as partes da planta, incluindo suas folhas, raízes, caule, galhos e nozes. Dentre as espécies, a *J. regia* é a mais utilizada na extração deste componente por apresentar uma maior quantidade (TAKURH, 2011; STRUGSTAD & DESPOTOVSKI, 2012).

Figura 19 – Estrutura molecular da Juglona.



Fonte: Pubchem, 2021

As naftoquinonas constituem uma classe de metabólitos secundários que ocorrem naturalmente em uma grande variedade de plantas, estando entre os produtos naturais mais ativos. Estudos mostram as diversas propriedades farmacológicas apresentadas por esses metabólitos, como atividade antibacteriana (TAN et al., 2012), antifúngica (MONKS et al., 1990), antitumoral (PAREKH et al., 1991), como também antiparasitária (BABULA et al., 2009). A atividade antiparasitária foi reportada por uma série de naftoquinonas, dentre elas, a plumbagina, com ação leishmanicida (KAYSER et al., 2000), antimalárica (LIKHITWITAYAWUID et al., 1998), capaz de agir contra *Fasciola gigantica* (LORSUWANNRAT et al., 2013), além de estudos *in vitro* terem demonstrado sua atividade contra vermes adultos de *S. mansoni* (LORSUWANNARAT et al., 2013; ZHANG E COULTAS 2013); o lapachol também apresentou ação leishmanicida (TEIXEIRA et al., 2001) e atividade contra *Trypanosoma cruzi* (PINTO E DE CASTRO 2009), além de estudos destacarem a ação de sais de potássio de lapachol contra cercárias de *S. mansoni* (LIMA et al., 2002).

Em estudo realizado por Pinto e colaboradores (1977) foi evidenciado ação de 19 naftoquinonas com ação contra o hospedeiro intermediário do *S. mansoni* e com capacidade de inibir a penetração de cercárias de *S. mansoni* na pele de camundongos. Uma molécula promissora e de grande importância é a β -lapachona, análoga do lapachol, com capacidade de interferir nos ciclos de vida do *S. mansoni*, agindo contra esquistossômulos da pele e de pulmão, vermes jovens e vermes adultos, além de proteger contra lesão hepática induzida por seus ovos. Estudos *in vitro* demonstram a capacidade da β -lapachona em agir sobre o tegumento de vermes

adultos machos de *S. mansoni* (CEPA BH) e induzir 100% de mortalidade em 24 horas (AIRES et al., 2012, 2014).

No que se refere a juglona, já foram relatadas propriedades medicinais envolvidas em várias ações farmacológicas. Dentre suas ações, tem mostrado bom efeito antifúngico (ARASOGLU et al. 2016), anti-helmíntico (ERDEMOGLU et al., 2003), antibacteriano (WANG et al. 2016), anti-inflamatório (LANDA et al., 2012), anti-hipertensivo (AHMAD et al., 2019), sedativo (STRUGSTAD e DESPOTOVSKI, 2012), antiviral (HUSSON et al. 1986) bem como capacidades apoptóticas (LIU et al., 2017), propriedades anti-angiogênese (WANG et al., 2017) e efeitos anticancerígenos (STRUGSTAD e DESPOTOVSKI, 2012).

Devido à capacidade antioxidante das naftoquinonas, a juglona tem características antioxidantes e atua contra o estresse oxidativo, dessa maneira protegendo contra o desenvolvimento de várias doenças e processos de envelhecimento. Em contrapartida, a depender da dose, pode apresentar características pró-oxidantes e produzir espécies reativas de oxigênio (AHMAD e SUZUKI, 2019). A capacidade de gerar espécies reativas de oxigênio e modular a sinalização redox são propriedades encontradas na juglona e outras naftoquinonas, e apesar de apresentar diversos efeitos conhecidos o mecanismo exato de ação ainda permanece desconhecido (KLOTZ et al., 2014).

O potencial antioxidante apresentado por esta naftoquinona pode ser comprovado por vários estudos presentes na literatura. Foi revelado experimentalmente que a juglona desprotonada tem a capacidade de quelar o Fe^{2+} , levando a formação de complexos estáveis, evitando que este metal participe da geração de radicais livres (FOUEGUE et al., 2016). A juglona também demonstrou ter capacidade de prevenir a desfosforilação da proteína Tau, induzida pelo estresse oxidativo e térmico, influenciando diretamente sobre uma questão chave da doença de Alzheimer. Isso é possível através da inibição de Pin1, uma Peptidil-prolil cis/trans isomerase, enzima envolvida no processo de fosforilação de proteínas e também na regulação da sinalização celular (GALAS et al., 2006). Estudos mostram que essa enzima também está implicada em condições de resposta imune, alergia, hiperparatireoidismo, artrite reumatoide, patologia vascular, diabetes, doença de Parkinson, fibrose cardíaca, câncer, estando, por exemplo, superexpressada em gliomas humanos (JORDENS et al., 2006; WANG et al., 2017).

A redução do estresse oxidativo também é igualmente relatada nos rins, através da inibição da fosforilação de Smad2, diminuindo o processo de fibrogênese renal (DJAMALI, 2007; REESE et al., 2010). Além disso, a juglona também induziu elevação na atividade da superóxido desmutase (SOD), diminuindo o estresse oxidativo no fígado, reduzindo os níveis séricos de alanina amino-transferase, aspartato amino-transferase, ácido hialurônico, laminina, procolágeno tipo III e colágeno tipo IV e os níveis de expressão de α actina do músculo liso e colágeno III no fígado, influenciando também na sinalização celular (ZHOU et al., 2015).

Em contrapartida, no que se refere a citotoxicidade da juglona alguns mecanismos já foram estudados. Dentre eles, a biorredução da juglona com subsequente formação do radical semiquinona, este por sua vez reduz o oxigênio a superóxido, capaz de reagir com outras estruturas das células, induzindo danos à membrana celular, peroxidação lipídica, desnaturação de proteínas, podendo acarretar morte celular (ZHANG et al., 1994; AITHAL et al., 2009; SAJADIMAJD et al., 2016). Outro mecanismo envolvido na citotoxicidade da juglona diz respeito ao esgotamento da glutathione, conhecido antioxidante endógeno. Por meio do processo de arilação da glutathione, favorecido pela redução de seu grupo tiol, ocasionada pela reação da juglona com nucleófilos mediante reação de adição de Michael. Esse processo desencadeia no aumento da sua citotoxicidade ao diminuir a disponibilidade da glutathione reduzida (KLOTZ et al., 2014; BRUINS et al., 2018).

Medicamentos importantes utilizados na quimioterapia do câncer contém o núcleo de quinona, nisso a juglona foi investigada e considerada promissora como um agente antitumoral (VERMA, 2006). Há na literatura diferentes estudos que demonstram os efeitos citotóxicos da juglona, e de outras quinonas, contra vários tipos de linhagens celulares cancerígenas, com efeitos de antiproliferação e antimetástase (LU et al., 2013). Os dados disponíveis atribuem seu efeito à produção aumentada de espécies reativas de oxigênio e a peroxidação lipídica, reduzindo a viabilidade de cultura de células humanas através de danos no DNA, inibição da transcrição, redução dos níveis de p53 e pela indução da morte celular (PAULSEN e LJUNGMAN 2005; SAJADIMAJD et al., 2016). Seus efeitos inibidores mostraram ação sobre o crescimento (KAMEI H et al., 1998), e indução de apoptose de células cancerígenas (JI et al., 2011; BAYRAM et al., 2018), além de ter se mostrado um agente quimiopreventivo (SUGIE S. et al., 1998).

Tendo em vista os efeitos promissores apresentados pela juglona, foi investigado e discutido sobre sua atividade antimicrobiana, mostrando atividade sobre um amplo espectro de microrganismos (KRAJCI & LYNCH 1978). Além disso, já foi demonstrada atividade antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* (PEREIRA et al. 2007; ZMANTAR et al., 2016), susceptíveis e resistentes a antibióticos, com ação também sobre *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cepacia* (SHARMA et al. 2009) e *Helicobacter pylori*, podendo inibir três enzimas principais importantes desta bactéria (KONG et al. 2008). Foi investigado que a juglona age inibindo as proteínas bacterianas que participam da síntese de DNA, RNA e de proteínas, bem como no ciclo do ácido tricarboxílico (WANG et al., 2016).

No que diz respeito a sua ação antiparasitária, o parasita *Toxoplasma gondii* também se mostrou altamente susceptível ao estresse oxidativo ocasionado pela juglona (AKERMAN e MULLER, 2005). Com base em resultados de estudos, extratos de *Juglans regia* L. (JR), *Juglans cinerea* L. (JC) e *Juglans nigra* L. (JN) apresentaram atividade citotóxica contra formas proliferativas de *Trypanosoma cruzi*, *T. brucei rhodesiense* e *Leishmania donovani* (SALOMÃO et al. 2013; ELLENDORF et al., 2015). Também foi observada atividade sobre *Hymenolepis nana* em camundongos, e alta atividade no controle de nematoides parasitas de gênero *Meloidogyne* spp. (DAMA E JADHAV, 1997; DAMA, 2019). Além do mais, a juglona mostrou ampla atividade em ensaio envolvendo caramujos adultos de *Biomphalaria glabrata* e frente vermes adultos de *S. mansoni* (LIMA et al., 2002; RIBEIRO et al., 2009; MAGALHÃES et al., 2014).

2.2.6 Associação de fármacos

A associação sinérgica entre dois ou mais fármacos pode reduzir os efeitos tóxicos, ao contrário do que ocorre quando são administrados de forma isolada, em altas doses para atingir o efeito farmacológico esperado. Além disso, a associação também reduz a exposição do fármaco aos seus alvos biológicos pela diminuição de sua concentração e ao rápido efeito alcançado, atenuando ou eliminando a possibilidade de resistência (LÈHAR et al. 2009).

As associações de drogas podem resultar em três efeitos diferentes resultantes da interação farmacológica entre as drogas: efeito sinérgico, aditivo ou antagônico. O efeito sinérgico, decorrente da ativação de diferentes mecanismos, resulta em uma

maior eficácia pela interação de duas ou mais drogas, mesmo com uma dose menor quando comparada as doses das drogas isoladas. O efeito aditivo resulta da soma da ação individual de cada droga, decorrente da ação no mesmo receptor. Por fim, o efeito antagônico, quando as drogas interagem diminuindo ou anulando o efeito uma da outra (GOLAN et al., 2009).

Diante do cenário atual onde o controle e tratamento da esquistossomose recaem sobre um único medicamento, se faz necessário a identificação de novos medicamentos eficazes. Tendo em vista que em áreas de alta endemicidade é elevado o risco de reinfecção, tem-se como consequência a exposição excessiva do PZQ, aumentando assim o risco de surgimento de cepas resistentes. Diante das vantagens apresentadas pela associação medicamentosa, há na literatura uso deste método com resultados promissores. Alternativas são sugeridas para contornar a baixa eficácia do PZQ contra as formas imaturas do verme de *S. mansoni*, como os tratamentos que fazem uso da associação do PZQ ao arteméter uma vez que este apresenta atividade contra as formas imaturas do *Schistosoma*. A utilização desses dois fármacos em associação pode causar maior eficácia do que quando administrados separadamente representando uma alternativa para o tratamento da esquistossomose em áreas endêmicas (UTZINGER et al. 2001)

O omeprazol em associação ao PZQ mostrou uma potencial ação sinérgica, *in vitro*, e já foi utilizada por Almeida e colaboradores (2015) frente a vermes adultos de cepa LE de *S. mansoni*. Estes pesquisadores buscaram genes do *S. mansoni* cujos produtos gênicos homólogos humanos fossem alvos conhecidos de drogas já utilizadas para outras doenças. Um dos genes altamente expressos em fêmeas pareadas de *S. mansoni* foi o SmATP1A2, apresentando como homólogo humano a enzima ATP1A2 Na/K-ATPase que, por sua vez, pode ser inibida por quatro drogas, dentre elas o omeprazol. O produto do gene ATP1A2 é um dos possíveis alvos do omeprazol, ele é um inibidor da bomba de prótons bem estudado que reduz a secreção de ácido gástrico e também demonstrou inibir a Na⁺/K⁺-ATPase renal e cerebral (KEELING et al., 1985). Em vermes adultos de *S. mansoni* foi observado que a expressão de ATP1A2 aumentou após a exposição dos vermes ao PZQ, e é concebível que um aumento da atividade deste gene seja parte da resposta de sobrevivência nesses vermes adultos sob estresse do PZQ. Portanto, a inibição de ATP1A2 pelo omeprazol na presença do PZQ aumentou a mortalidade dos vermes adultos de *S. mansoni*. (ALMEIDA et al., 2015)

Outro estudo promissor destaca a ação da lovastatina (inibidor da síntese endógena do colesterol) em associação ao PZQ demonstrando resultados promissores em investigações *in vivo* e *in vitro*, o mesmo pôde ser observado para associação do clonazepam (inibidor do sistema nervoso central) com o PZQ (ARAUJO, N. et al., 2008). Neste cenário, os produtos naturais provaram ser uma valiosa e acessível fonte de direcionamento de protótipo moleculares de futuros fármacos. E diante das atividades apresentadas pelas naftoquinonas, incluindo antiparasitárias, objetivamos avaliar as propriedades esquistossomicidas ainda não estudadas da associação juglona e praziquantel sobre diferentes estágios evolutivos do *S. mansoni* (cepa BH), empregando modelo experimental *in vitro*.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

- Avaliar *in vitro* a atividade esquistossomicida da juglona (JUG), praziquantel (PZQ) e de suas associações frente as diversas formas evolutivas de *Schistosoma mansoni* (cepa BH).

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar as concentrações letais médias (CL50) da Juglona e PZQ;
- Determinar a atividade esquistossomicida da JUG e PZQ frente à esquistossômulos, vermes jovens e vermes adultos de *Schistosoma mansoni* (cepa BH);
- Avaliar a atividade esquistossomicida da associação JUG+PZQ em concentrações equivalentes a CL50 e concentrações subletais sobre esquistossômulos, vermes jovens e vermes adultos;
- Avaliar a atividade da associação JUG+PZQ sobre a capacidade de oviposição de casais de *Schistosoma mansoni* (cepa BH).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS E ANIMAIS EXPERIMENTAIS

A parte experimental da pesquisa foi iniciada após aprovação pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal do Centro de Biociências da Universidade Federal de Pernambuco – UFPE, sob o processo de número 0062/2020. Para o experimento foram utilizados camundongos fêmeas Swiss Webster (*Mus musculus*), com 30 dias de idade, fornecidos e mantidos pelo biotério do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA). Alojados em gaiolas, sobre cama de maravalha previamente autoclavada, os animais foram submetidos a fotoperíodos de 12 horas de claro e 12 horas de escuro, à temperatura de 25°C, com acesso livre à ração (Labina® / Purina, São Paulo- SP) e água potável esterilizada *ad libitum*.

A cepa de *Schistosoma mansoni* Belo Horizonte-Minas Gerais (BH), com sensibilidade ao praziquantel, foi mantida através de sucessivas passagens em camundongos Swiss fêmea e em caramujos da espécie *Biomphalaria glabrata*, devidamente alocados no moluscário da disciplina de Parasitologia, na área de Medicina Tropical do Centro de Ciências Médicas da UFPE.

4.2 COMPOSTOS

O praziquantel (RS) (2-(ciclohexilcarbonil) -1,2,3,6,7-11β-hexahidro-4H pirazino (2,1a) isoquinolin-4-ona) (MM = 312,4061 g/mol), lote 122K1443 e o composto juglona (5-hidroxi-1,4-naftalenodiona) (MM = 174,155 g/mol), Lote: STBH9858, foram ambos adquiridos na Sigma Aldrich Corporation. Na preparação das soluções, o dimetilsulfóxido (DMSO) a 1,6% foi utilizado como solvente para ambos os compostos.

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

Fezes de camundongos previamente infectados com cercárias de *Schistosoma mansoni* foram coletadas e posteriormente processadas por meio do método de sedimentação espontânea (Técnica de Hoffman). Logo após sucessivas lavagens a técnica foi finalizada com o descarte do sobrenadante e transferência do sedimento para placas de Petri. As placas foram então expostas a fontes luminosas artificiais

com cerca de 20 cm de distância das placas, por um período de 30 a 60 minutos. Busca-se com isso a eclosão de miracídios para infecção dos caramujos da espécie *Biomphalaria glabrata*. Cada caramujo foi exposto a cerca de 5 – 7 miracídios, sob condições de temperatura e luminosidade constantes, pelo período de 2 horas. Após o período de infecção os caramujos foram transferidos e agrupados em aquários contendo água e protegidos da exposição à luminosidade (STANDEN, 1952).

Para infecção dos camundongos foi necessário obter previamente uma suspensão cercariana. Esta por sua vez foi obtida através dos caramujos com 30 dias de infecção, onde foram transferidos para recipientes de vidro contendo água filtrada e desclorada e expostos à luz artificial pelo período de 60 minutos (STIREWALT, 1954).

Os camundongos, Swiss webster fêmeas, foram então previamente anestesiados, utilizando uma combinação de Dopalen® (Ketamina) e Anasedan® (Xilazina), numa proporção de 2:1, e expostos a um período de 30 minutos a uma alíquota da suspensão cercariana contendo cerca de 120 cercárias, via per cutânea. Concluída a infecção os camundongos foram novamente alojados em suas gaiolas.

4.4 AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA SUSCEPTIBILIDADE DOS ESQUISTOSSÔMULOS COM 3 HORAS DE *Schistosoma mansoni* À JUGLONA E PRAZIQUANTEL

Por meio do método de Ramalho-Pinto e colaboradores (1974) os esquistossômulos foram obtidos a partir das cercárias, as quais foram submetidas à agitação turbulenta e pressurização aumentada. Os esquistossômulos obtidos foram lavados e transferidos para placas de 24 poços, numa média de 50 por poço e mantidos por um período de três horas em meio RPMI-1640 contendo HEPES 20mM pH = 7,5, suplementado com soro bovino fetal a 10% e acrescido com penicilina (100UI/mL) e estreptomicina (100µg/mL). Foram incubados em estufa a 37°C em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂. Após esse período foram acrescentados os compostos aos poços contendo os esquistossômulos. As concentrações variaram de 100 a 350 µM para o praziquantel e de 0,0781 a 1,25 µM para a juglona. As placas foram incubadas e observadas com o auxílio de microscópio invertido após intervalos de 3, 6, 12 e 24 horas.

4.5 AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA SUSCEPTIBILIDADE DE VERMES JOVENS COM 21 DIAS DE *Schistosoma mansoni* À JUGLONA E PRAZIQUANTEL

Passados 21 dias de infecção dos camundongos com as cercárias, os vermes jovens foram recuperados após eutanásia dos camundongos por deslocamento cervical e posterior perfusão de solução fisiológica do sistema porta-hepático. Os vermes jovens foram transferidos, lavados e mantidos em placas estéreis de 24 poços com em média 26 vermes jovens por poço, contendo meio RPMI 1640 suplementado com HEPES 20mM, estreptomicina (100 µg/ mL), penicilina (100 µg/ mL) e soro bovino fetal a 10%. Essas placas foram incubadas em estufa a 37°C em atmosfera úmida 5% de CO₂. Em seguida concentrações de juglona que variaram de 3,125 µM a 50 µM e de praziquantel de 200 µM a 12,5 µM foram adicionadas aos poços e as placas foram novamente incubadas para posterior avaliação após 3, 6, 12 e 24 horas.

4.6 AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA SUSCEPTIBILIDADE DE VERMES ADULTOS COM 50 DIAS DE *Schistosoma mansoni* À JUGLONA E PRAZIQUANTEL

No 50° dia da infecção os camundongos infectados foram submetidos à eutanásia por deslocamento cervical e à perfusão, com solução salina estéril (0,9 %), do sistema porta-hepático e vasos mesentéricos inferiores. Por meio da perfusão os vermes foram recuperados e posteriormente lavados e transferidos para placas de Petri contendo meio RPMI-1640 suplementado com HEPES 20Mm pH = 7,5, estreptomicina (100 µg/ mL), penicilina (100 µg/ mL) e soro bovino fetal a 10% (DUVALL, DEWITT, 1967).

Os casais de vermes adultos foram separados em machos e fêmeas e analisados separadamente, sendo distribuídos em placas estéreis de 24 poços (6 vermes por poço) contendo o meio RPMI 1640 suplementado. Posteriormente foram incubados em estufa a 37°C em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂, pelo período de 2 horas para adaptação dos vermes ao meio.

Após adaptação dos vermes machos e fêmeas, foram adicionados nas placas soluções de juglona cuja concentrações variaram de 6,25 e 100 µM e de praziquantel de 0,3125 - 5 µM e 12,5 - 100 µM para machos e para fêmeas respectivamente. Em seguida, as placas foram novamente incubadas em estufa sob as mesmas condições descritas acima. O monitoramento dos vermes foi realizado dentro do intervalo de 24

horas, sendo avaliadas e registradas alterações, com auxílio de microscópio invertido, após 3, 6, 12 e 24 horas após exposição aos fármacos.

4.7 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ESQUISTOSSOMICIDA DA ASSOCIAÇÃO JUG/PZQ FRENTE A DIFERENTES FASES EVOLUTIVAS DE *Schistosoma mansoni* (CEPA BH)

A princípio, para realização dos testes de atividade esquistossomicida da associação JUG/PZQ, foi necessário determinar a concentração letal 50% (CL₅₀) da juglona e praziquantel. A avaliação foi conduzida frente às fases evolutivas do *Schistosoma mansoni* (cepa BH), esquistossômulos (3h), vermes jovens (21 dias), vermes adultos (50 dias) quando incubadas por um período de 24 horas. Por meio de diluições da CL₅₀, diferentes concentrações subletais de juglona e PZQ foram utilizadas frente às diferentes fases de maturação, variando de ½ a 1/32 da CL₅₀. As soluções de juglona e praziquantel em diferentes concentrações subletais foram adicionadas simultaneamente em placas de 24 poços e avaliadas nos intervalos de 3, 6, 12 e 24 horas. Em seguida as placas foram incubadas em estufa a 37°C em atmosfera úmida.

4.8 AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DA ASSOCIAÇÃO JUG/PZQ FRENTE A ATIVIDADE OVIPOSITORA DE CASAIS DE *Schistosoma mansoni* (CEPA BH).

Por meio de diluições da CL₅₀, diferentes concentrações subletais de juglona e PZQ foram utilizadas para avaliar a associação frente a atividade ovipositora dos casais de *S. mansoni*. Foram montados dois experimentos em placas separadas, em um deles as concentrações utilizadas foram norteadas pela CL₅₀ de vermes machos e outro pela CL₅₀ de vermes fêmeas. Foram utilizadas diluições entre a CL₅₀ até 1/32 de juglona e PZQ, sendo selecionados apenas concentrações subletais obtidas nos experimentos anteriores. Os vermes acasalados foram transferidos para placa de cultura 24 poços, 3 casais por poço, contendo meio de cultura RPMI-1640 e cultivados durante 5 dias em estufa a 37 °C em 5% de CO₂, respeitando o tempo de 2h sem exposição às drogas. Em cada poço os vermes foram submetidos a diferentes associações de JUG/PZQ.

Após adição das drogas foi realizada avaliação num período total de 120h, seguindo intervalos de 24h entre cada avaliação. Seguidas 48 horas de exposição, os casais foram transferidos para poços com meio de cultura sem adição das soluções de juglona e/ou praziquantel e foram avaliados por mais 72 horas, entre intervalos de 24 horas. Os ovos em cada poço foram contados e comparados com os vermes em cultura em meio RPMI 1640 acrescido ou não de DMSO a 1,6%, para saber se esse composto interfere ou não na avaliação dos vermes. Os ovos inviáveis não apresentaram sinais visíveis do miracídio em seu interior.

4.9 CRITÉRIO DE AVALIAÇÃO

Através da observação realizada com o auxílio de um microscópio invertido, foi possível identificar alterações nos vermes, machos e fêmeas. Aqueles considerados mortos não apresentaram nenhum movimento durante 2 minutos de observação. Para avaliação da motilidade, foi estabelecido uma escala de pontuação de 0-3. Sendo: 3 - vermes com o movimento do corpo completo; 2 - para uma movimentação parcial do corpo; 1 - para os vermes com movimentação apenas nas extremidades; e 0 - mortos (MANNECK et al., 2010).

Nos controles negativos para avaliar a motilidade foi adicionado DMSO a 1,6% junto ao meio e outro poço contendo apenas meio. Para obtenção das CL_{50} , do índice de combinação (IC) e das representações gráficas foi utilizado o software CompuSyn versão 1.0. Com relação ao IC, é considerado como atividade sinérgica um valor de IC menor que 1, uma atividade aditiva um valor de IC igual a 1 e uma atividade antagônica quando o IC for maior que 1 (CHOU, 2006). É possível também avaliar o grau de sinergismo apresentado pela associação podendo variar desde um sinergismo leve à um sinergismo muito forte, como pode ser analisado na tabela 4.

Tabela 4 – Descrição do grau de sinergismo com base nos valores do índice de Combinação (IC)

IC		Sinergismo
<0,1	+++++	Sinergismo muito forte
0,1 – 0,3	++++	Sinergismo forte
0,3 – 0,7	+++	Sinergismo
0,7 – 0,85	++	Sinergismo moderado
0,85 – 0,9	+	Sinergismo leve

Fonte: Adaptado de BIJNSDORP, GIOVANNETTI E PETERS, 2011.

Para avaliação da associação também é importante levar em consideração o efeito da combinação nas proporções utilizadas dos compostos e seu índice de redução de dose (DRI). O DRI é um parâmetro que representa o nível de redução da concentração de um composto na associação em comparação ao seu uso isolado. Por sua vez, o isoblograma é uma representação gráfica bastante utilizada para indicar os efeitos da interação entre os compostos. As linhas sólidas do isoblograma ligam as concentrações de IC₅₀, IC₇₅ e IC₉₀ dos compostos isoladamente, definindo assim um número infinito de combinações de fármacos que poderão produzir inibição de 50%, 75% ou 90%. As formas geométricas referem-se aos dados experimentais da associação em 24 horas de exposição, indicando interação sinérgica de acordo com sua posição em relação as linhas traçadas (TALLARIDA, 2006).

5 RESULTADOS

5.1 ATIVIDADE DA JUGLONA E PRAZQUANTEL FRENTE A ESQUISTOSSÔMULOS DE 3 HORAS DE *Schistosoma mansoni*.

Durante as 24 horas a cultura de esquistossômulos em RPMI 1640 com ou sem DMSO a 1,6%, permaneceram com seus movimentos típicos normais, isto é, com peristaltismo, ventosas aderindo ao fundo e/ou lateral da placa e tegumento íntegro (Score=3). A tabela 5 mostra as alterações de motilidade dos esquistossômulos expostos as variadas concentrações de juglona.

Os efeitos da juglona sobre os esquistossômulos começaram a ser notados nas primeiras três horas de exposição, apresentando uma letalidade de 100% na concentração de 1,25 μM . A concentração de 0,65 μM exibiu uma elevada percentagem de vermes com alterações na motilidade (72%) ao final das 24 horas de observação, apresentando uma mortalidade de 20% nas primeiras 3h, aumentando para 28% ao final das 24h. As concentrações de 0,3125 μM e 0,1561 μM causaram alterações na motilidade dos vermes em 16% e 14% respectivamente, ao final das 24h. Durante a exposição à juglona, nas três primeiras horas, foram observados efeitos sucessivos ao tegumento dos vermes, sendo verificado a presença de bolhas, alteração da coloração e aspecto granuloso no interior dos vermes. De acordo com a concentração e no decorrer do tempo de exposição os efeitos observados foram intensificados, se tornando mais críticos, com ruptura do tegumento e aumento do tamanho das bolhas.

Tabela 5 – Avaliação *in vitro* da motilidade de esquistossômulos de *Schistosoma mansoni* expostos durante 24 horas a diferentes concentrações de juglona.

Motilidade de esquistossômulos de <i>Schistosoma mansoni</i> durante 24h (%)																
Grupos	3h				6h				12h				24h			
	3	2	1	0	3	2	1	0	3	2	1	0	3	2	1	0
Controle	100				100				100				100			
DMSO (1,6%)																
Controle Meio	100				100				100				100			
Juglona																
1,25µM				100				100				100				100
0,65µM	8	12	60	20	8	6	66	20	6		74	20			72	28
0,3125µM	100				92	4	4		80	8	12		80	4	16	
0,1561 µM	100				100				100				86		14	
0,0781 µM	100				100				100				100			

3) Movimento completo do corpo; (2) Movimento parcial do corpo; (1) Imóvel, porém vivos; (0) Mortos (MANNECK et al., 2010).

Ao serem expostos ao praziquantel, os esquistossômulos sofreram de forma imediata efeito espástico sobre sua musculatura. Logo nas três primeiras horas a motilidade dos vermes foi afetada e com o passar do tempo foi sendo possível observar apenas movimentação das ventosas. Ao final das 24 horas de exposição, a mortalidade dos vermes foi evidenciada em todas as concentrações avaliadas, todavia o efeito máximo (100%) não foi alcançado. A tabela 6 mostra em scores, durante o intervalo de 24h, as alterações de motilidade dos esquistossômulos exposto ao praziquantel. Durante o tempo de exposição foram observadas nos vermes a presença de bolhas no seu tegumento, estando contraídos dando a ligeira impressão de encolhimento, sua coloração também sofreu alteração, mudando para tons mais escuros com relação ao grupo controle que não teve qualquer alteração.

Tabela 6 – Avaliação *in vitro* da motilidade de esquistossômulos de *Schistosoma mansoni* expostos durante 24 horas a diferentes concentrações de praziquantel.

Motilidade de esquistossômulos de <i>Schistosoma mansoni</i> durante 24h (%)																
Grupos	3h				6h				12h				24h			
	3	2	1	0	3	2	1	0	3	2	1	0	3	2	1	0
Controle DMSO (1,6%)	100				100				100				100			
Controle Meio	100				100				100				100			
Praziquantel																
350 µM			100				100					100			16	84
300 µM		100					100					100			32	68
250 µM		100					100					100			34	66
200 µM		100					100					100			48	52
150 µM		100					100					100			64	36
100 µM		100					100					100			74	26

(3) Movimento completo do corpo; (2) Movimento parcial do corpo; (1) Imóvel, porém vivos; (0) Mortos (MANNECK et al., 2010).

5.2 ATIVIDADE DA JUGLONA E PRAZICUANTEL FRENTE A VERMES JOVENS DE *Schistosoma mansoni* COM 21 DIAS

Vermes jovens em cultura no meio RPMI 1640 com ou sem DMSO permaneceram com seus movimentos normais, com tegumento intacto e aderindo-se ao fundo e/ou lado da placa através de suas ventosas, durante 24 horas de observação (Score 3).

A tabela 7 apresenta os resultados obtidos referentes a susceptibilidade desta fase evolutiva do *Schistosoma mansoni* à juglona. Nas primeiras 3 horas de observação as concentrações de 50 µM e 25 µM mostraram efeito máximo esquistossomicida, evidenciado pela morte dos vermes jovens (score 0). A concentração de 12,5 µM, neste mesmo tempo, causou indução da mortalidade em 20%, e redução da motilidade dos vermes, alcançando ao final das 24 horas, uma letalidade de 90%. Alterações na motilidade dos vermes também foi observado na concentração de 6,25 µM, apresentando mortalidade de 45% ao final das 24 horas de observação. A partir de 12 horas de incubação também foi evidenciado alterações da

motilidade na menor concentração avaliada de 3,125 μM , no entanto não foi observada morte desses vermes nas 24 horas de contato. Os vermes afetados pela exposição à juglona apresentaram alterações que foram se tornando mais críticas de acordo com a concentração e tempo. Os vermes apresentaram alterações tegumentares com aspecto granuloso em seu interior, formações bolhosas por todo corpo e coloração alterada. No transcorrer do tempo foi perceptível o aumento no tamanho das bolhas assim como presença de rupturas no tegumento.

Tabela 7 – Avaliação *in vitro* da motilidade de vermes jovens de *Schistosoma mansoni* expostos durante 24 horas a diferentes concentrações de juglona.

Motilidade de vermes jovens de <i>Schistosoma mansoni</i> durante 24h (%)																
Grupos	3h				6h				12h				24h			
	3	2	1	0	3	2	1	0	3	2	1	0	3	2	1	0
Controle DMSO (1,6%)	100				100				100				100			
Controle Meio	100				100				100				100			
Juglona																
50 μM				100				100				100				100
25 μM				100				100				100				100
12,5 μM	35	15	30	20	15	15	35	35	10	20	35	35		5	5	90
6,25 μM	85	10	5		70	15	15		15	20	35	30	10	15	35	45
3,125 μM	100				100				78	17	5		55	20	15	

(3) Movimento completo do corpo; (2) Movimento parcial do corpo; (1) Imóvel, porém vivos; (0) Mortos (MANNECK et al., 2010).

Nas primeiras três horas de exposição ao praziquantel foi possível observar seu efeito espástico sobre a musculatura dos vermes. Foi observado presença de bolhas, intactas ou rompidas, distribuídas pelo seu tegumento e coloração alterada, ficando cada vez mais escurecidos no decorrer do tempo. Além disso se mostraram encurtados e imóveis, apenas com movimentação discreta de suas ventosas. A mortalidade dos vermes foi alcançada apenas ao final das 24 horas, embora não tenha atingido efeito máximo, foi registrada mortalidade de 88% quando em contato com 200 μM de praziquantel (Tabela 8).

Tabela 8 – Avaliação *in vitro* da motilidade de vermes jovens de *Schistosoma mansoni* com 21 dias, expostos durante 24 horas a diferentes concentrações de praziquantel.

Grupos	Motilidade de vermes jovens de <i>Schistosoma mansoni</i> durante 24h (%)															
	3h				6h				12h				24h			
	3	2	1	0	3	2	1	0	3	2	1	0	3	2	1	0
Controle DMSO (1,6%)	100				100				100				100			
Controle Meio	100				100				100				100			
Praziquantel																
200 µM			100				100					100			12	88
150 µM			100				100					100			32	68
100 µM			100				100					100			40	60
75 µM			100				100					100			46	54
50 µM			100				100					100			99	1
25 µM			100				100					100			100	
12,5 µM			100				100					100			100	

(3) Movimento do corpo completo; (2) Movimento do corpo parcial; (1) Imóvel, porém vivos; (0) Mortos (MANNECK et al., 2010).

5.3 ATIVIDADE DA JUGLONA E PRAZIQUANTEL FRENTE A VERMES ADULTOS DE *Schistosoma mansoni* COM 50 DIAS.

5.3.1 Susceptibilidade dos vermes machos de *S. mansoni* frente a juglona e praziquantel

Os vermes adultos machos em cultura em meio RPMI 1640 com ou sem DMSO a 1,6% permaneceram com sua movimentação normal, aderindo-se ao fundo e/ou lateral da placa através de suas ventosas e com seu tegumento intacto, durante todo período de 24 horas (Score 3).

A tabela 9 apresenta os resultados obtidos para susceptibilidade de vermes adultos machos à juglona. Os registros obtidos para concentração de 100 µM evidenciaram um efeito logo nas 3 primeiras horas de incubação. Neste mesmo período, as concentrações de 50 µM e 25 µM foram capazes de diminuir a motilidade dos vermes machos em 37,5% e 12,5%, respectivamente. A partir das 12 horas de contato com 50 µM de juglona foi observada letalidade de 100% dos vermes adultos. Na concentração de 25 µM essa letalidade foi de 25% após as 24 horas. A motilidade

diminuiu progressivamente no decorrer do tempo, para as concentrações de 25 μM , 12,5 μM e 6,25 μM .

Tabela 9 – Avaliação *in vitro* da motilidade de vermes adultos machos de *Schistosoma mansoni* com 50 dias, expostos durante 24 horas a diferentes concentrações de juglona.

Motilidade de vermes adultos machos de <i>Schistosoma mansoni</i> durante 24h (%)																
Grupos	3h				6h				12h				24h			
	3	2	1	0	3	2	1	0	3	2	1	0	3	2	1	0
Controle DMSO (1,6%)	100				100				100				100			
Controle Meio Juglona	100				100				100				100			
100 μM			100				100				100				100	
50 μM	62,5	37,5			50	37,5	12,5				100				100	
25 μM	87,5	12,5			75	12,5	12,5		50	25	25		25	37,5	12,5	25
12,5 μM	100				87,5	12,5			62,5	37,5			37,5	62,5		
6,25 μM	100				100				75	25			62,5	37,5		

(3) Movimento completo do corpo; (2) Movimento parcial do corpo; (1) Imóvel, porém vivos; (0) Mortos (MANNECK et al., 2010).

Com o passar do tempo o efeito sobre o tegumento e sobre a motilidade dos vermes tornaram-se mais evidentes e intensificados de acordo com as concentrações a que foram expostos. Os vermes apresentaram contração muscular intensa, aspecto granuloso e bolhas em seu tegumento. Para concentração de 100 μM esses efeitos foram observados logo nas 3 primeiras horas. No transcorrer do tempo houve um aumento das bolhas no tegumento, com presença de microerosões, assim como uma maior intensidade na contração muscular.

Apesar das baixas concentrações utilizadas do praziquantel, nas primeiras horas foi possível observar seu efeito sobre o peristaltismo dos vermes, conseguindo paralisar a sua musculatura, como exposto na tabela 10. Com 6 horas de observação as duas maiores concentrações, de 5 μM e 2,5 μM , registraram índices de mortalidade de 62,5% e 25% respectivamente. As duas menores concentrações utilizadas não registraram taxas de mortalidade embora tenham comprometido a motilidade dos vermes sendo observado apenas uma sútil movimentação de suas ventosas.

Tabela 10 – Avaliação *in vitro* da motilidade de vermes adultos machos de *Schistosoma mansoni* com 50 dias expostos durante 24 horas a diferentes concentrações de praziquantel.

Motilidade de vermes adultos machos de <i>Schistosoma mansoni</i> durante 24h (%)																
Grupos	3h				6h				12h				24h			
	3	2	1	0	3	2	1	0	3	2	1	0	3	2	1	0
Controle DMSO (1,6%)	100				100				100				100			
Controle Meio	100				100				100				100			
Praziquantel																
5 µM		100			37,5	62,5			37,5	62,5			25	75		
2,5 µM		100			75	25			62,5	37,5			50	50		
1,25 µM		100			100				100				87,5	12,5		
0,625 µM		100			100				100				100			
0,3125 µM		100			100				100				100			

(3) Movimento completo do corpo; (2) Movimento parcial do corpo; (1) Imóvel, porém vivos; (0) Mortos (MANNECK et al., 2010).

5.3.2 Susceptibilidade de vermes fêmeas de *S. mansoni* frente a juglona e praziquantel

Durante as 24 horas de observação os vermes adultos fêmeas em cultura no meio RPMI 1640 com ou sem DMSO a 1,6%, permaneceram com sua movimentação normal, aderindo-se ao fundo e/ou lateral da placa através de suas ventosas e com seu tegumento intacto, naturalmente translucido (Score 3).

A tabela 11 apresenta os resultados da susceptibilidade dos vermes adultos fêmeas a juglona. Em 3 horas de exposição foi registrado efeito máximo de letalidade pela concentração de 100 µM, neste mesmo período as concentrações de 50 µM e 25 µM, alcançaram 75% e 50%, respectivamente. Nessas primeiras horas de observação as concentrações de 50 µM e 25 µM registraram efeito sobre a motilidade dos vermes, onde 25% e 12,5% respectivamente, mostraram movimentação sutil apenas nas suas extremidades (Score 1). Após 6 horas de exposição, a concentração de 50 µM alcançou efeito esquistossomida máximo. Com a concentração de 25 µM foi registrada 75% de mortalidade, aumentando para 87,5% ao final das 24 horas. Os vermes apresentaram diminuição de peristaltismo dos órgãos internos, coloração enegrecida, presença de bolhas no seu tegumento, intensa contração muscular e sem aderência

de suas ventosas à placa. A diminuição da motilidade e as alterações descritas tornaram-se mais críticas no decorrer do tempo e concentração.

Tabela 11 – Avaliação *in vitro* da motilidade de vermes adultos fêmeas de *Schistosoma mansoni* com 50 dias, expostos durante 24 horas a diferentes concentrações de juglona.

Motilidade de vermes adultos fêmeas de <i>Schistosoma mansoni</i> durante 24h (%)																
Grupos	3h				6h				12h				24h			
	3	2	1	0	3	2	1	0	3	2	1	0	3	2	1	0
Controle DMSO (1,6%)	100				100				100				100			
Controle Meio	100				100				100				100			
Juglona																
100µM				100				100				100				100
50µM			25	75				100				100				100
25µM		37,5	12,5	50		12,5	12,5	75		12,5	12,5	75			12,5	87,5
12,5µM	62,7	37,5				100				87,5	12,5			62,7	37,5	
6,25µM	100					50	50			25	75			12,5	87,5	

(3) Movimento completo do corpo; (2) Movimento parcial do corpo; (1) Imóvel, porém vivos; (0) Mortos (MANNECK et al., 2010).

O efeito do praziquantel sobre vermes adultos fêmeas (Tabela 12) pôde ser observado logo nas três primeiras horas, onde a maior concentração utilizada, 100 µM, induziu comprometimento intenso da motilidade dos vermes (Score 1). O dano crítico na motilidade dos vermes também foi observado nas concentrações de 75 µM e 50 µM, com 75% e 25% respectivamente. Em 6 horas de incubação com a concentração de 100 µM foi observada uma mortalidade de 12,5% cuja percentagem aumentou para 50% nas 24 horas. Todas as demais concentrações induziram paralisia intensa em 6h, e tão logo as observações foram finalizadas, concentrações inferiores também foram capazes de induzir mortalidade, com exceção da concentração de 12,5 µM. Os vermes apresentaram acometimento do tegumento mostrando um aspecto rugoso, com presença de bolhas e coloração escura.

Tabela 12 – Avaliação *in vitro* da motilidade de vermes adultos fêmeas de *Schistosoma mansoni* com 50 dias, expostos durante 24 horas a diferentes concentrações de praziquantel.

Motilidade de vermes adultos fêmeas de <i>Schistosoma mansoni</i> durante 24h (%)																
Grupos	3h				6h				12h				24h			
	3	2	1	0	3	2	1	0	3	2	1	0	3	2	1	0
Controle DMSO (1,6%)	100				100				100				100			
Controle Meio	100				100				100				100			
Praziquantel																
100 µM			100		87,5	12,5			87,5	12,5			50	50		
75 µM		25	75		100				100				62,5	37,5		
50 µM		75	25		100				100				75	25		
25 µM	87,5	12,5			100				100				75	25		
12,5 µM	100				100				100				100			

(3) Movimento do corpo completo; (2) Movimento do corpo parcial; (1) Imóvel, porém vivos; (0) Mortos (MANNECK et al., 2010).

5.5 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO LETAL 50% DA JUGLONA E PRAZICUANTEL FRENTE AS FORMAS EVOLUTIVAS DE *Schistosoma mansoni*

As concentrações de juglona e praziquantel que causaram a morte de 50% dos vermes foram determinadas frente as três fases evolutivas do *S. mansoni*: esquistossômulo, vermes jovens e vermes adultos machos e fêmeas. Os valores de CL₅₀ estão apresentados na tabela 13. Os resultados para a CL₅₀ da juglona mostram que esse composto teve atividade, consideravelmente, muito maior que o praziquantel contra esquistossômulos, reduzindo a motilidade e causando morte em concentrações inferiores a 1 µM, enquanto o PZQ requereu uma concentração de 100 µM. Esse perfil de atividade da juglona também ocorreu frente a vermes jovens e vermes adultos fêmeas. Quando a forma evolutiva de *S. mansoni* foram vermes adultos machos a CL₅₀ da juglona foi aproximadamente 25 vezes maior que a CL₅₀ do praziquantel. Os valores das CL₅₀ foram posteriormente utilizados para a avaliação dos efeitos da associação JUG+PZQ.

Tabela 13 – Valores da concentração letal 50% CL₅₀ [µM] da juglona e do praziquantel sobre as formas evolutivas de *Schistosoma mansoni* após 24h.

	CL ₅₀ [µM]			
	Esquistossômulos	Vermes jovens (21 dias)	Verme adulto macho	Verme adulto fêmea
JUG	0,57	8,7	26,4	22,6
PZQ	182,7	111,3	2,9	87,8

5.6 ATIVIDADE DA ASSOCIAÇÃO JUG+PZQ SOBRE ESQUISTOSSÔMULOS, VERMES JOVENS E VERMES ADULTOS MACHOS E FÊMEAS DE *Schistosoma mansoni* (CEPA BH)

O índice de redução de dose (DRI) e o índice de combinação (IC) foram alguns dos parâmetros utilizados para avaliar o efeito da associação JUG+PZQ. De acordo com os resultados, foi observado sinergismo (IC<1) entre os dois compostos em todas as associações testadas para o ensaio de esquistossômulos de 3 horas, apresentando associações com sinergismo muito forte (IC<0,1) e sinergismo forte (IC 0,1 – 0,3), assim como também altos valores de DRI para ambas as drogas. O melhor resultado foi alcançado com as razões de combinação de 0,125CL₅₀ de juglona e 0,0625CL₅₀ de praziquantel com IC igual a 0,09 e 86% de mortalidade. Nesta associação o praziquantel deveria apresentar uma concentração quase 39 vezes maior para obter o mesmo efeito isoladamente, enquanto a juglona deveria apresentar uma concentração quase 15 vezes maior.

A tabela 14 apresenta os melhores resultados para a associação JUG+PZQ, associações com concentrações dos compostos que variaram de 1/2 CL₅₀ até 1/32 CL₅₀. Os resultados mostram forte sinergismo, com baixos índices de combinação (IC<1), ótima eficácia e significativos resultados de DRI para ambas as drogas. A figura 20 ilustra o efeito das associações com interações sinérgicas, cujos resultados utilizados apresentaram sua razão constante. Como esperado, todas as associações causaram danos ao tegumento, que foram intensificados no transcorrer das 24 horas de observação.

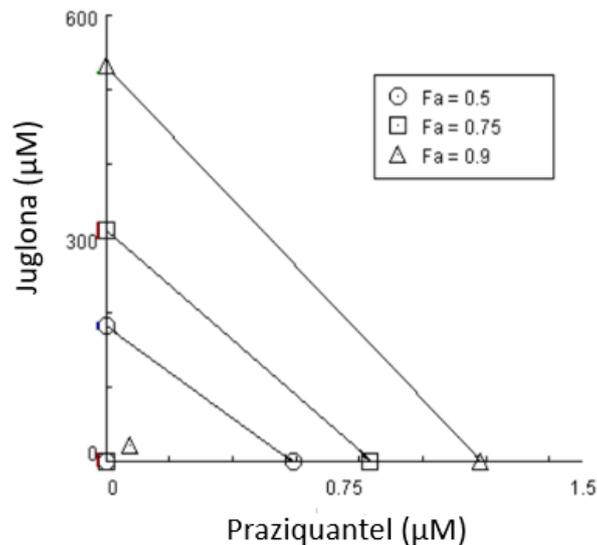
Tabela 14 – Atividade da associação JUG+PZQ frente a esquistossômulos de *Schistosoma mansoni* (cepa BH) após 24 horas.

Diluição Testada		Esquistossômulos		Índice de Redução de Dose (DRI)	
		JUG+PZQ* (Vermes Mortos)**	IC		
JUG	PZQ			JUG	PZQ
0,5 CL50	0,25 CL50	0,285 + 45,67 (90%)	0,32	4.14209	11.6971
0,25 CL50	0,25 CL50	0,142 + 45,67 (91%)	0,19	8.59329	12.3812
0,5 CL50	0,125 CL50	0,285 + 22,83 (93%)	0,24	4.68218	28.2997
0,25 CL50	0,125 CL50	0,142 + 22,83 (94%)	0,13	9.86298	30.6715
0,125 CL50	0,125 CL50	0,071 + 22,83 (84%)	0,12	13.9932	17.9854
0,125 CL50	0,0625 CL50	0,071 + 11,41 (86%)	0,09	14.7023	38.8546

*Valores de concentração expresso em μM .

**Porcentagem de vermes mortos (n=50) avaliados.

Figura 20 – Isoblograma revelando o efeito sinérgico da associação entre juglona e praziquantel frente a esquistossômulos de *S. mansoni* (cepa BH).



A ação sob vermes jovens também mostrou eficácia nas diferentes associações utilizadas. As associações com melhores resultados, levando em consideração também o índice de redução de dose (DRI), estão listadas na tabela 15, onde três

destes resultados mostraram forte sinergismo com IC variando de 0,1 – 0,3. Também apresentaram redução significativa do praziquantel, sendo a melhor combinação alcançada com 0,25CL₅₀ de juglona e 0,125CL₅₀ de praziquantel com IC de 0,29 e 69% de mortalidade. Nesta combinação foi possível reduzir até 10 vezes a concentração do praziquantel em comparação ao seu uso isolado, enquanto a juglona teve uma redução de até quase 5 vezes. A figura 21 ilustra o efeito das associações com interações sinérgicas, cujos resultados utilizados apresentaram sua razão constante. É importante ressaltar que a associação dos dois compostos causou importantes danos nos tegumentos dos vermes jovens de 21 dias, sendo intensificado no transcorrer das 24 horas.

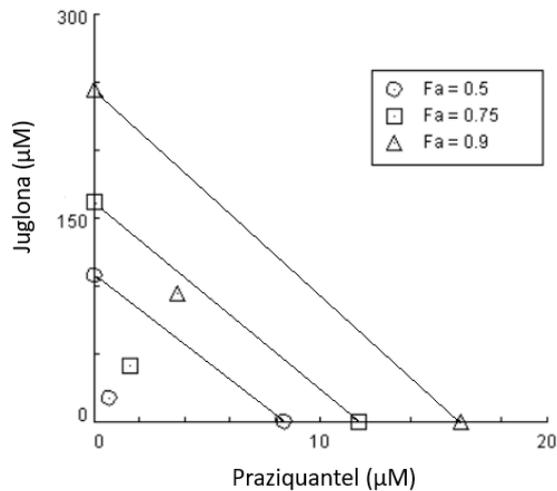
Tabela 15 – Atividade da associação JUG+PZQ frente a vermes jovens de *Schistosoma mansoni* (cepa BH) após 24 horas.

Diluição testada		JUG+PZQ* (Vermes Mortos)**	IC	Índice de Redução de Dose (DRI)	
JUG	PZQ			JUG	PZQ
0,25CL ₅₀	0,5CL ₅₀	2,19 + 55,68 (76%)	0,51	5.51370	3.03643
0,5CL ₅₀	0,25CL ₅₀	4,38 + 27,84 (69%)	0,59	2.45100	5.24695
0,25CL ₅₀	0,25CL ₅₀	2,19 + 27,84 (73%)	0,37	5.18107	5.62083
0,25CL ₅₀	0,125CL ₅₀	2,19 + 13,92 (69%)	0,29	4.90200	10.4939
0,125CL ₅₀	0,125CL ₅₀	1,09 + 13,92 (61%)	0,22	8.85314	9.24399

*Valores de concentração expresso em µM.

**Percentagem de vermes mortos (n=50) avaliados.

Figura 21 – Isoblograma revelando o efeito sinérgico da associação entre juglona e praziquantel frente vermes jovens de *S. mansoni* (cepa BH).



Todas as associações frente aos vermes adultos machos registraram índice de combinação menor que 1, apresentando resultados que alcançaram efeitos com sinergismo muito forte ($IC < 0,1$) assim como também sinergismo forte ($IC 0,1 - 0,3$). Foi registrado também uma variação de mortalidade de 80% e 100% em 27 das 36 associações testadas. A melhor combinação foi alcançada utilizando 0,125CL₅₀ de juglona com 0,25CL₅₀ de praziquantel com IC de 0,07 e efetividade contra 100% dos vermes expostos à essa associação. Foi registrado uma redução quase 30 vezes do praziquantel e em 25 vezes da juglona, quando comparado ao seu uso isolado para obter o mesmo efeito da combinação. Os melhores resultados, levando em consideração também o DRI de ambas as drogas testadas, estão listados na tabela 16. A figura 22 ilustra o efeito da combinação das doses utilizando um isoblograma clássico, onde os resultados utilizados mostraram interação sinérgica e razão constante. De maneira semelhante aos demais estágios evolutivos, todas as associações causaram danos ao tegumento dos vermes expostos, que foram intensificados no transcorrer das 24 horas de observação.

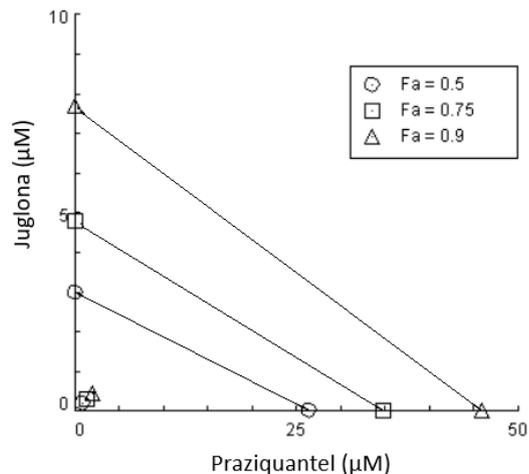
Tabela 16 – Atividade da associação JUG+PZQ frente a vermes adultos machos de *Schistosoma mansoni* (cepa BH) após 24 horas.

Diluição Testada		Vermes adultos machos		Índice de Redução de Dose (DRI)	
JUG	PZQ	JUG+PZQ* (Vermes Mortos)**	IC	JUG	PZQ
0,5CL50	0,5CL50	13,2 + 1,49 (100%)	0,22	6.35438	14.6088
0,5CL50	0,25CL50	13,2 + 0,74 (100%)	0,19	6.35438	29.2177
0,25CL50	0,5CL50	6,6 + 1,49 (100%)	0,14	12.7088	14.6088
0,25 CL50	0,25CL50	6,6 + 0,74 (100%)	0,11	12.7088	29.2177
0,25CL50	0,125CL50	6,6 + 0,37 (80%)	0,24	5.67216	14.6060
0,125CL50	0,25CL50	3,3 + 0,74 (100%)	0,07	25.4175	29.2177
0,25CL50	0,0625 CL50	6,6 + 0,18 (80%)	0,21	5.67216	29.2120

*Valores de concentração expresso em μM .

**Porcentagem de vermes mortos (n=50) avaliados.

Figura 22 – Isoblograma revelando o efeito sinérgico da associação entre juglona e praziquantel frente a vermes adultos machos de *S. mansoni* (cepa BH).



O efeito da associação frente aos vermes adultos fêmeas também se mostrou bastante satisfatório, apresentando resultados com sinergismo forte (IC 0,1 – 0,3),

sendo alcançada alta preservação do praziquantel associada a uma considerável taxa de mortalidade dos vermes. O menor índice de combinação (IC=0,1) foi registrado utilizando 0,25CL₅₀ de juglona e 0,25CL₅₀ do praziquantel, levando a uma máxima mortalidade dos vermes expostos e uma redução de 43 vezes do praziquantel, enquanto a juglona apresentou uma redução de quase 13 vezes levando em consideração a concentração que seria utilizada para obter o mesmo efeito isoladamente. Na tabela 17 estão denotadas as cinco melhores associações dentre todas as 36 utilizadas, levando em consideração três parâmetros. A figura 23 ilustra o efeito da combinação das doses utilizando um isoblograma clássico, onde os resultados utilizados apresentam interação sinérgica e razão constante. Todas as associações causaram danos ao tegumento dos vermes expostos, sendo intensificados no transcorrer das 24 horas de observação.

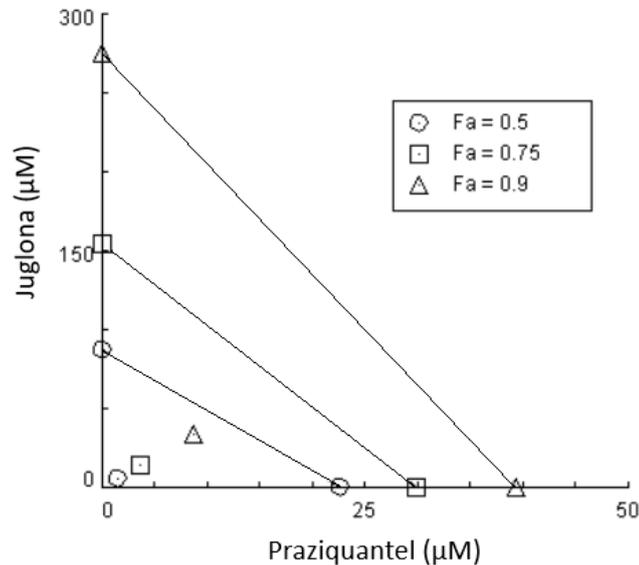
Tabela 17 – Atividade da associação JUG+PZQ frente a vermes adultos fêmeas de *Schistosoma mansoni* (cepa BH) após 24 horas.

Diluição Testada		Vermes adultos fêmeas			
		JUG+PZQ* (Vermes Mortos)**	IC	Índice de Redução de Dose (DRI)	
JUG	PZQ			JUG	PZQ
0,5CL ₅₀	0,25CL ₅₀	11,3 + 21,9 (100%)	0,17	6.36921	43.5922
0,5CL ₅₀	0,125CL ₅₀	11,3 + 10,9 (80%)	0,41	2.84270	16.4534
0,25CL ₅₀	0,25CL ₅₀	5,65 + 21,9 (100%)	0,10	12.7384	43.5922
0,25CL ₅₀	0,125CL ₅₀	5,65 + 10,9 (80%)	0,23	5.68540	16.4534
0,125CL ₅₀	0,125CL ₅₀	2,82 + 10,9 (75%)	0,16	10.5962	14.1681

*Valores de concentração expresso em µM.

**Percentagem de vermes mortos (n=50) avaliados.

Figura 23 – Isoblograma revelando o efeito sinérgico da associação entre juglona e praziquantel frente vermes adultos fêmeas de *S. mansoni* (cepa BH).



5.7 ATIVIDADE DA ASSOCIAÇÃO JUG/PZQ SOBRE A OVIPOSIÇÃO DE VERMES FÊMEAS DE *Schistosoma mansoni* (CEPA BH)

Os ovos postos pelas fêmeas acasaladas foram quantificados e os resultados mostram que as concentrações subletais utilizadas conseguiram inibir de forma efetiva a oviposição. Quando as associações foram baseadas na CL_{50} de vermes machos, das 12 combinações subletais apenas vermes em duas combinações conseguiram ovipor, no período de 120h (Tabela 18). Quando as associações foram baseadas na CL_{50} de vermes fêmeas, a oviposição foi vista apenas em 4 combinações no período de 120h (Tabela 19). Os vermes acasalados presentes em meio de cultura RPMI 1640 com ou sem DMSO a 1,6% se mantiveram em perfeito estado de oviposição, permanecendo durante toda avaliação vivos e acasalados.

Tabela 18 – Atividade da associação juglona + praziquantel sobre a oviposição de vermes fêmeas acasaladas de *S. mansoni* (cepa BH) utilizando doses subletais de acordo com a CL₅₀ de vermes adultos machos.

RELAÇÃO DA OVIPOSIÇÃO DE VERMES ACASALADOS

DILUIÇÕES	CONTAGEM DE OVOS*
0,03125JUG+0,125PZQ	1 OVO INVIÁVEL
0,03125JUG+ 0,03125PZQ	1 OVO INVIÁVEL
CONTROLE MEIO	95
CONTROLE DMSO	103

*Contagem de ovos totais para poços contendo 3 fêmeas.

Tabela 19 – Atividade da associação juglona + praziquantel sobre a oviposição de vermes fêmeas acasaladas de *S. mansoni* (cepa BH) utilizando doses subletais de acordo com a CL₅₀ de vermes adultos fêmeas.

RELAÇÃO DA OVIPOSIÇÃO DE VERMES ACASALADOS

DILUIÇÕES	CONTAGEM DE OVOS*
0,03125JUG+0,0625PZQ	1 OVO INVIÁVEL
0,0625JUG+0,125PZQ	1 OVO INVIÁVEL
0,03125JUG+0,125PZQ	1 OVO INVIÁVEL
0,125JUG+0,0625PZQ	1 OVO INVIÁVEL
CONTROLE MEIO	139
CONTROLE DMSO	115

*Contagem de ovos totais para poços contendo 3 fêmeas.

6 DISCUSSÃO

O praziquantel é atualmente o único medicamento utilizado pelos programas de controle da esquistossomose no mundo, empregado em tratamentos em larga escala, com segurança, bons resultados e eficácia contra todas as espécies do gênero *Schistosoma*. No entanto, a esquistossomose ainda é uma doença endêmica que está longe de ser erradicada, sendo preocupante seu tratamento recair sobre um único fármaco. Dessa maneira é importante e necessário o uso racional deste medicamento, como também o desenvolvimento de novos agentes esquistossomicidas. No entanto, há ainda uma resistência no que concerne aos investimentos voltados às pesquisas, sobretudo por parte das indústrias farmacêuticas. Este cenário pode ser explicado devido a esquistossomose atingir em sua grande maioria comunidades pobres, e consequentemente o retorno financeiro não seria atrativo às grandes empresas (KATZ, 2008; BERGQUIST et al.2017).

Apesar de sua eficácia, o PZQ enfrenta alguns obstáculos, como sua baixa eficácia sobre vermes jovens, acarretando o aumento da sua exposição pela necessidade do amadurecimento completo dos vermes, permitindo que eles atinjam sua maturidade sexual e deem início a oviposição, desencadeando sintomas mais graves da doença (KAMEL e BAYAUMY, 2017). Adicionalmente, o desenvolvimento de resistência e/ou tolerância a esse fármaco é uma grande preocupação, principalmente em locais endêmicos onde há o uso repetido do PZQ. Estudos evidenciaram surgimento de cepas resistentes induzidas laboratorialmente e alguns casos isolados, alertando para a possibilidade de cepas capazes de adquirir resistência naturalmente (MELMAN et al. 2009; COUTO et al. 2011).

Investigar a atividade do PZQ em associação a uma outra droga pode ser visto como uma boa estratégia no tratamento da esquistossomose. A interação sinérgica resultante na associação de algumas drogas mostra vantagens, evitando por exemplo o surgimento de cepas resistentes, e neste caso preservando o PZQ de uma exposição excessiva, pelo fato de se utilizar uma dose reduzida de cada droga que compõe esta associação. Além do mais os resultados são melhores quando comparado a atividade da droga isoladamente (LÈHAR, et al. 2009).

Com o presente risco de ineficácia do PZQ, uma série de moléculas sintéticas, semissintéticas e naturais estão sendo amplamente analisadas para avaliação de atividade contra espécies de *Schistosoma*, como é o caso das naftoquinonas. Alguns

compostos já são conhecidos e explorados, apresentando eficácia e ação esquistossomicida, como a mefloquine e o trioxaquine, já utilizados por exemplo no tratamento da malária (LAGO et al. 2017). Drogas como arteméter e mefloquine já foram consideradas, *in vivo* e *in vitro*, em associação ao praziquantel mostrando resultados promissores frente *Schistosoma mansoni* e *Schistosoma japonicum* (BOTROS, 2005; KEISER, et al. 2011; GOUVEIA et al. 2018). Da mesma maneira, estudos descritos por Almeida e colaboradores (2015), envolvendo o omeprazol em associação *in vitro*, demonstraram resultados satisfatórios para cepa LE de *Schistosoma mansoni*.

No presente trabalho foi avaliado o potencial esquistossomicida da juglona e do praziquantel, assim como a sua associação, frente a todas as formas evolutivas de *Schistosoma mansoni* (cepa BH) que parasitam o homem. Os resultados mostraram que as fases jovens apresentaram uma maior resistência ao PZQ, quando comparado aos vermes adultos. Avaliando a mortalidade no período de 24 horas de observação, os esquistossômulos de 3 horas necessitaram de uma concentração bastante superior quando comparado aos vermes adultos machos. Neste mesmo intervalo, os vermes jovens expostos a concentrações um pouco menores às utilizadas nos esquistossômulos apresentaram mortalidade equivalente. Quando comparado aos machos, as fêmeas adultas mostraram baixa sensibilidade ao PZQ, apresentando uma CL_{50} superior. Esses dados evidenciam as limitações apresentadas pelo PZQ assim como também são condizentes com pesquisa já realizada que confirma sua baixa eficácia frente ao *Schistosoma mansoni* (Cepa Porto Rico) nas fases jovens de 28 dias, sendo estes capazes de se recuperar dos efeitos espasmódicos em concentrações de até $3\mu\text{M}$ (PICA-MATTOCIA e CIOLI, 2004).

Estudos presentes na literatura procuram explicar os mecanismos envolvidos na tolerância/resistência ao PZQ, enfrentada pelas diferentes fases evolutivas do *Schistosoma*. Os canais de cálcio envolvidos na rápida contração muscular dos vermes fazem parte de um mecanismo implicado na eficácia do PZQ, no entanto sua presença em vermes adultos não causa o mesmo efeito que nos verme jovens, já que estes são menos sensíveis a este fármaco. Sabe-se que a superfamília de proteínas ABC (ATP-binding-cassette), que incluem a glicoproteína-P (gp-P), a MRP-1 e BCRP (associada ao câncer de mama), estão associadas ao processo de multirresistência das células de mamíferos aos fármacos. Essas proteínas são transportadoras dependentes de ATP, altamente expressas em células cancerígenas com certo grau

de resistência a quimioterapia, e são responsáveis pela eliminação de xenobióticos e toxinas metabólicas das células (LEONARD et al. 2003).

Transportadores semelhantes às proteínas multirresistentes (MRPs), expressas nas células tumorais, já foram correlacionadas à transportadores presentes no *Schistosoma mansoni* (cepa Porto Rico) e em outros helmintos (SATO et al. 2003; BLACKHALL et al. 2008). A fim de identificar possível envolvimento destes transportadores na resistência o PZQ, Bosch e colaboradores (2004), através de clonagem e codificação de dois cDNA, que expressam proteínas multirresistentes em *Schistosoma mansoni*, identificaram o gene SMDR2 como sendo responsável pela codificação de proteínas semelhantes à glicoproteína-P de mamíferos. A vista disto, Messerli e colaboradores (2009) avaliaram a relação entre a expressão do SMDR2 e da glicoproteína-P nos vermes adultos de *S. mansoni* (cepa NMRI) utilizando concentrações subletais do PZQ. Utilizaram também vermes cepa EE2, com sensibilidade reduzida ao PZQ, e vermes CD1, expostos pela primeira vez e sensíveis ao PZQ. Os resultados mostraram um aumento de 3 vezes na expressão do RNA de SMDR2, após 3 horas em machos adultos quando comparado ao controle negativo (cepa NMRI). Nenhuma diferença significativa foi observada, neste mesmo período, entre os grupos de fêmeas adultas tratadas e o grupo controle negativo, no entanto este último ainda apresentou um aumento de 2 a 5 vezes do RNA de SMDR2 quando comparado aos machos adultos. Esses dados corroboram com os resultados encontrados em nosso estudo, onde fêmeas apresentaram baixa sensibilidade PZQ, apresentando CL_{50} superior ao grupo de machos adultos, o que pode estar relacionado a elevados níveis de MRPs. Quando comparados aos vermes CD1 e NMRI, os vermes adultos cepa EE2 obtiveram aumento de 2 vezes do RNA de SMDR2, assim como para glicoproteína-P.

Também envolvida na excreção de xenobióticos, a proteína SmMRP1 foi identificada por Kasinathan e colaboradores (2010) em *S. mansoni* (cepa NMRI), sendo homóloga do MRP1 (proteína associada a resistência de multidrogas) em células de mamíferos. Ao serem expostos a concentrações subletais de PZQ foi possível observar aumento na expressão do RNA de SmMRP1 em vermes jovens e cercárias, quando comparada com os vermes adultos machos e fêmeas. Associado a isto, as fases jovens também apresentaram elevada expressão do RNA de SMDR2, o que indica que a baixa sensibilidade frente ao PZQ, encontrada nos esquistossômulos

e vermes jovens de 21 dias avaliadas neste trabalho, pode estar diretamente ligada a presença de transportadores de bombas de efluxo aos fármacos.

Tendo em vista a importância do tegumento ao *Schistosoma*, esta estrutura é considerada um dos alvos terapêuticos mais importantes dos fármacos esquistossomicidas. Isto se dá devido ao seu papel em garantir a sua sobrevivência no hospedeiro definitivo, desenvolvendo desta maneira múltiplas funções (BRITO et al., 2017). A camada de células sinciciais presentes no tegumento do verme confere a este uma adaptação às variações do meio em que se encontra sendo responsável pela absorção de nutrientes como lipídios, aminoácidos e carboidratos, além de também auxiliar na evasão do sistema imune durante o parasitismo, permitindo o mimetismo antigênico, bem como regulação dos íons K^+ , Na^+ , H^+ e Ca^{2+} (WENDT e COLLINS, 2020; AIRES et al., 2014).

As diversas mitocôndrias presentes no tegumento dos vermes também são importantes alvos terapêuticos a serem considerados. A juglona além de ser explorada pelas suas numerosas atividades, também tem sido alvo de pesquisas pela sua ação antiparasitária. Estudos *in vitro* comprovaram a ação da juglona sobre mitocôndrias isoladas, por meio do estresse oxidativo provocado por este composto que leva a alteração na permeabilidade da membrana mitocondrial (JI et al., 2016). A consequente diminuição de ATP leva ao desequilíbrio osmótico das membranas com posterior desregulação de bombas e canais dependentes de energia, podendo levar a presença de edema assim como provocar rupturas decorrente da desregulação dos íons de Na^+ e K^+ (SESHADRI et al., 2011; BONORA e PINTON, 2014; JI et al., 2016). Somado a isto, ainda pode ocorrer aumento de fatores pró apoptóticos (Bax), com posterior liberação de Citocromo C citosólico, ativação do sistema Caspase 3 e morte celular (CHENG et al., 2011; SESHADRI et al., 2011).

Ademais, alterações tegumentares no *S. mansoni* foram visualizados quando expostos a algumas naftoquinonas. Esses compostos fazem parte do grupo das quinonas, sendo um grupo de substâncias orgânicas semivoláteis, na sua maioria apresentando coloração e tendo presença constante na natureza. A plumbagina, naftoquinona análoga da juglona, mostrou atividade esquistossomicida *in vitro* sobre os vermes adultos machos e fêmeas, partindo da concentração de $1\mu g/mL$. Os vermes desacasalados apresentaram alterações como edema, bolhas, rachaduras, superfície rugosa e aparência fibrosa de seu tegumento, sendo essas alterações dependente do tempo e de sua concentração (LORSUWANNARAT et al., 2013). Nesse cenário

também se destaca a β -lapachona, uma naftoquinona com atividade frente a *S. mansoni*. Estudos *in vitro*, frente a machos adultos, mostraram a eficácia da β -lapachona em uma concentração de 100 μ M, causando lesões tegumentares, com redução de espinhos, descamação, formação de bolhas, além de induzir mortalidade máxima período de 24 horas (AIRES et al., 2012, 2014).

Os estudos presentes na literatura firmam o papel que as naftoquinonas tem em gerar espécies reativas de oxigênio resultando em danos e em morte celular. Assim sendo, o mecanismo de ação da juglona parece estar relacionado com sua capacidade de gerar espécies reativas de oxigênio (SESHADRI et al., 2011). Com propósito de controlar o estresse oxidativo, o *S. mansoni* apresenta em suas células uma única Tiorredoxina Glutationa Redutase (SmTGR). Achados importantes oriundos de pesquisas demonstram a importância que a SmTGR tem na sobrevivência do parasito. Foi evidenciado, em estudos *in vitro*, que a supressão de RNA da SmTGR acarretou a morte de 92% de vermes adultos de *S. mansoni* (KUNTZ et al. 2007). Semelhantemente, o uso de inibidores, tais como auranofina, tártaro de potássio antimolínico e oltipraz, resultou na morte de 100% dos vermes de *S. mansoni* (PRAST-NIELSEN, HUANG e WILLIAMS, 2011; SAYED et al., 2008; WILLIAMS et al., 2012).

Estudos *in vitro* com alvos no SmTGR já foram explorados por meio de derivados sintéticos de 1,4-naftoquinonas, sendo promissores ao causar inibição do SmTGR de *S. mansoni*. Além disso, Johann e colaboradores (2015) identificaram diferentes compostos 1,4-naftoquinônicos agindo como antagonistas competitivos ou bloqueadores de SmTGR, evidenciando a morte de vermes de *S. mansoni* que tiveram a expressão de SmTGR inibida em um período de até 4 dias. Neste mesmo estudo a juglona obteve destaque por apresentar mecanismo de ação aparentemente diferente, uma vez que foi a molécula com menos alterações na presença do selênio, que compete com o sítio ativo desta enzima. Essas informações podem contribuir para a elucidação da atividade esquistossomicida da juglona nos diferentes estágios evolutivos do *S. mansoni* (LANFRANCHI et al. 2012; JOHANN et al. 2015).

A ação da juglona parece estar relacionada com sua capacidade de gerar espécies reativas de oxigênio. A estrutura deste composto permite uma boa permeabilidade em membranas celulares, assim como habilidade para interferir no ciclo redox de células tumorais e nas células dos microrganismos. Ainda que seu mecanismo de ação frente ao *Schistosoma* não esteja totalmente elucidado, é possível pressupor algumas vias responsáveis pela sua atividade citotóxica,

antimicrobiana e antiparasitária (CATANZARO et al., 2018). A grande predisposição deste composto é em sofrer redução enzimática, acarretando na geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) ($O_2^- \bullet$, $HO\bullet$, $1O_2$ e H_2O_2), e por intermédio disso, a juglona é capaz de causar hipóxia intracelular, com consequente produção de super ânions, aumentando desta forma a peroxidação lipídica e a desorganização de proteínas, ácidos nucleicos e enzimas (SESHADRI et al., 2011; AHMAD e SUZUKI, 2019).

No presente estudo os efeitos da juglona e a integridade de esquistossômulos de 3 horas, vermes jovens de 21 dias e adultos (fêmeas e machos) sofreram interferências relacionadas a morte, motilidade e alterações, de aderência e de contração muscular, sendo observadas de maneira progressiva e em diferentes concentrações de juglona. As alterações no tegumento puderam ser evidenciadas tanto pela presença de bolhas, irregularidades, edemas, aspecto granuloso, rupturas e erosões, como também pela alteração da sua coloração, passando de cor ligeiramente translúcida para uma coloração opaca e enegrecida. Em nossos resultados, com 3 horas de observação, a juglona foi capaz de atingir efeito máximo diante de esquistossômulos e vermes jovens de 21 dias, alcançando este feito em concentrações menores, e com menos tempo de incubação, que as utilizadas no ensaio com o PZQ. A maioria das fases evolutivas avaliadas mostraram maior sensibilidade a juglona, esse fato pode ser comprovado ao analisar a CL_{50} , que foram maiores quando tratadas com o praziquantel. Os efeitos da juglona observados frente as fases jovens de *S. mansoni* é encorajador, e surge como uma possibilidade de preencher as lacunas existentes na eficácia do PZQ.

Nos ensaios de associação foi observado sinergismo nos ensaios para vermes adultos, fêmeas e machos, e para vermes jovens. Resultados ainda mais satisfatórios puderam ser evidenciados para as concentrações testadas em esquistossômulos, onde todas apresentaram índice de combinação menor que um ($IC < 1$). Associado a isto, os ensaios para todas as fases evolutivas mostraram associações com significativo efeito esquistossomicida, assim como ótimos índices de redução de dose (DRI) para ambas as drogas. Estes resultados são promissores tendo em vista os efeitos da associação JUG/PZQ em todos os estágios evolutivos, uma vez que o PZQ apresenta limitações. É, portanto, válida a hipótese de que a ação da juglona acarretou uma maior preservação do praziquantel, diminuindo sua exposição e levando a um expressivo grau sinérgico.

No que se refere ao efeito da associação JUG/PZQ frente à oviposição de casais, foi observado uma redução e inibição total da oviposição em fêmeas acasaladas. Este fato é importante visto que o processo patológico da esquistossomose está diretamente relacionado a resposta imunogênica ao ovo, além de que a sobrevivência de casais de *S. mansoni* poder chegar a anos nos órgãos e tecidos do hospedeiro (BRASIL, 2014). Sabe-se que tanto a juglona quanto o praziquantel agem impedindo a oviposição, todavia seu mecanismo de ação ainda permanece incerto. É possível que todas as interferências descritas anteriormente causadas tanto pelo praziquantel quanto pela juglona interfiram e comprometam o aparelho reprodutor dos vermes, em especial o das fêmeas.

Em estudo de citotoxicidade foi evidenciado que diferentes concentrações de juglona, variando de 1,5625 μM a 100 μM frente a diferentes fases evolutivas de *S. mansoni* (cepa BH), não foram capazes de alterar a viabilidade de esplenócitos durante 72 horas de tratamento (NUNES, 2020). Em contrapartida foi demonstrado por Neves e colaboradores (2011) que o PZQ reduziu a viabilidade de esplenócitos murinos nas concentrações de 1 μM durante 72 horas, podendo desencadear necrose e apoptose dos esplenócitos tratados (NEVES et al., 2011). No entanto, os efeitos da juglona em linhagens celulares saudáveis são controversos, apresentando concentrações inibitórias médias variando entre 8,1 μM a 28,7 μM para fibroblastos L929, queratinócitos, macrófagos e células mononucleares de sangue periférico e apresenta hemólise em concentrações altas (>200 $\mu\text{g/mL}$). Esta diferença pode estar relacionada aos seus diferentes mecanismos de ação (ERISEN et al., 2020; INBARAJ e CHIGNELL, 2004; MARTINS et al., 2015; MONTENEGRO et al., 2010).

Tem-se como finalidade através deste estudo analisar a hipótese de que a juglona livre e em associação ao PZQ possui atividade esquistossomicida, assim como capacidade de promover atividade sinérgica sobre as fases evolutivas do *S. mansoni*. Os resultados obtidos indicam que houve um sinergismo em diferentes graus em todas as fases evolutivas (esquistossômulos, vermes jovens, vermes adulto machos e fêmeas), assim como efeito esquistossomicida e DRI significativos, dependendo da combinação de concentrações utilizadas e das diferenças de susceptibilidade de cada estágio evolutivo.

7 CONCLUSÃO

Nos resultados obtidos, podemos concluir que a juglona apresenta atividade esquistossomicida frente às fases evolutivas de *Schistosoma mansoni* (cepa BH), em especial frente a esquistossômulos de 3h, vermes jovens de 21 dias e vermes adultos fêmeas com 50 dias, onde seus efeitos foram mais evidentes. Os efeitos foram observados neste trabalho, tanto com juglona isolada ou em associação com o praziquantel.

Dado o exposto, a associação Juglona+Praziquantel apresentou eficácia diante do *S. mansoni* (cepa BH) em avaliações de 24h, apresentando índice de combinação (IC) indicativo de atividade sinérgica para os esquistossômulos de 3 horas, vermes jovens com 21 dias e vermes adultos machos e fêmeas, sendo capaz de provocar mortes, alterações de motilidade e danos tegumentares nos vermes. Em adição, a combinação desses compostos permitiu diminuição da dose utilizada da juglona e do praziquantel em comparação ao seu uso isolado, como também causou inibição da oviposição dos casais.

Os resultados desse estudo indicam novas possibilidades para o tratamento da esquistossomose, uma vez que a associação de fármacos que apresente efeito sinérgico é no momento uma ótima estratégia para potencialização terapêutica e eliminação das chances de cepas resistentes ou com baixa sensibilidade ao PZQ.

8 PESPECTIVAS

Avaliar detalhadamente, utilizando microscópio eletrônico de varredura (MEV), as alterações tegumentares causadas pela combinação dos compostos em concentrações que apresentaram resultados promissores. Assim como também investigar as demais concentrações subinibitórias frente a esquistossômulos com 3 horas, bem como realizar investigação *in vivo* sobre a atividade da associação quimioterápica JUG/PZQ, por administração oral, frente as fases evolutivas de *S. mansoni* (cepa BH), avaliando a absorção e metabolismo das drogas.

REFERÊNCIAS

- ABDUL-GHANI R.; LOUTFY N.; SAHN A. E.; HASSAN, A. Current chemotherapy arsenal for Schistosomiasis mansoni: alternatives and challenges, **Parasitology Research**, v. 10, pp. 955–965, 2009.
- AHMAD, T.; KHAN, T.; SHAH, A. J. Juglone as antihypertensive agent acts through multiple vascular mechanisms. **Clinical and Experimental Hypertension**, v. 00, n. 00, 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. L. et al. Ultrastructural analysis of β -lapachone-induced surface membrane damage in male adult *Schistosoma mansoni* BH strain worms. **Experimental Parasitology**. 142: 8 μ –90, 2014.
- AITHAL, B. K. et al. Juglone, a naphthoquinone from walnut, exerts cytotoxic and genotoxic effects against cultured melanoma tumor cells. **Cell Biology International**. 33:1039–1049, 2009.
- AKERMAN, S.E.; MULLER, S. Peroxiredoxin-linked detoxification of hydroperoxides in *Toxoplasma gondii*. **Journal of Biological Chemistry**. 280(1):564-570, 2005.
- ALMEIDA, G. T. et al. Synergy of omeprazole and praziquantel in vitro treatment against *Schistosoma mansoni* adult worms. **PLOS Neglected Tropical Diseases**. 9 (9): e0004086, 2015
- ARASOGLU, T. et al. Enhancement of antifungal activity of juglone (5-hydroxy-1,4-naphthoquinone) using a poly (D,L-lactico-glycolic acid) (PLGA) nanoparticle system. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 64:7087–7094, 2016.
- ARAÚJO, K. C. G. M. Análise espacial dos focos de *Biomphalaria glabrata* e de casos humanos de esquistossomose mansônica em Porto de Galinhas, Pernambuco, Brasil, no ano de 2000. **Cadernos de Saude Publica**. 23(2):409-17, 2007.
- ARAÚJO, N. et al. Oxamniquine, praziquantel and lovastatin association in the experimental Schistosomiasis mansoni. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**.103(5): 450-454, 2008.

- ARAÚJO, N. P.; COUTO, F. F. B.; ZANI, C. L.; KATZ, N. Avaliação da Atividade Esquistossomicida do carvacrol em experimentos *in vitro* e *in vivo*. **Revista de Patologia Tropical**. v. 45, n. 2, p.179-191, 2016
- BABULA, P. et al. Naphthoquinones as allelochemical triggers of programmed cell death. **Environmental and Experimental Botany**. 65, 330–337, 2009.
- BARBOSA, C. S. et al. Casos autóctones de esquistossomose mansônica em crianças de Recife, PE. **Revista Saúde Pública**. 47(4): 684-90, 2013.
- BARBOSA, C. S. et al. Current epidemiological status of schistosomiasis in the state of Pernambuco, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. 105 (4): 549-554, 2010.
- BARBOSA, V. S. et al. Os Sistemas de Informação Geográfica em estudo sobre a esquistossomose em Pernambuco. **Revista Saúde Pública**. 51:107, 2017
- BARRETO, A. V. M. S. et al. Análise da positividade da esquistossomose mansoni em Regionais de Saúde endêmicas em Pernambuco, 2005 a 2010. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**. 24(1):87-96, 2015.
- BAYNE, C. J.; GREVELDING, C. G. Cloning of *Schistosoma mansoni* sporocysts in vitro and detection of genetic heterogeneity among individuals within clones. **The Journal of Parasitology**, 89: 1.056-1.060, 2003.
- BAYRAM D. et al. Determination of apoptotic effect of juglone on human bladder cancer TCC-SUP and RT-4 cells: An in vitro study. **Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology**. 37:173–181, 2018.
- BERGQUIST, R. et al. Controlling schistosomiasis with praziquantel: How much longer without a viable alternative?. **Infectious Diseases of Poverty**. 6(74): 1-10, 2017.
- BIJNSDORP, I. V.; GIOVANNETTI, E.; PETERS, G.J. Analysis of drug interactions. **Methods in Molecular Biology**. 731:421-34, 2011.
- BONESSO-SABADINI, P.I.; DE SOUZA DIAS, L.C. Altered response of strain of *Schistosoma mansoni* to oxamniquine and praziquantel. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 97, pp. 381–385, 2002
- BONORA, M.; PINTON, P. The mitochondrial permeability transition pore and cancer: molecular mechanisms involved in cell death. **Frontiers in Oncology**. v. 4, p. 1–12, 2014.
- BOTROS, S. S. et al. Current status of sensitivity to praziquantel in a focus of potential drug resistance in Egypt. **International Journal for Parasitology**. 35: 787– 791, 2005

BOURGUIGNON, S.C. et al. *Trypanosoma cruzi*: Insights into naphthoquinone effects on growth and proteinase activity. **Experimental Parasitology**, Vol 127: 160 -166, 2011.

BRACHS, S.; HASS, W. et al. Swimming behaviour of *Schistosoma mansoni* cercariae: responses to irradiance changes and skin attractants. **Parasitology Research**. 102:685-690, 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Vigilância da Esquistossomose mansoni: diretrizes técnicas**. 4. Ed. Brasília: Ministério da Saúde. 144 p, 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Informe Técnico “Campanha Nacional de Hanseníase, Verminoses, Tracoma e Esquistossomose 2015”**. Brasília: Ministério da Saúde, 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Vigilância em saúde no Brasil 2003|2019: da criação da Secretaria de Vigilância em Saúde aos dias atuais**. Boletim Epidemiológico. 2019.

BRITO, M. I. B. S.; SILVA, M. B. A.; QUININO, L. R. M. Situação epidemiológica e controle da esquistossomose em Pernambuco: estudo descritivo, 2010-2016. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, Brasília, v. 29, n. 2, e2019252, 2020.

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.

BRUINS, J. J., ALBADA, B., VAN DELFT, F. Ortho-Quinones and analogues thereof: Highly reactive intermediates for fast and selective biofunctionalization. **Chemistry**. 24:4749–4756, 2018.

CAMPOS, J. V., **Aspectos epidemiológicos e distribuição espacial dos portadores de esquistossomose atendidos no Hospital das Clínicas – Pernambuco no período de 2010 a 2012**. 2014. Dissertação (Mestrado) – Programa de pós-graduação integrado em Saúde Coletiva – Universidade Federal de Pernambuco, Recife. 2014.

CARVALHO, O. S. et. al. Distribuição espacial de *Biomphalaria glabrata*, *B. straminea* e *B. tenagophila*, hospedeiros intermediários de *Schistosoma mansoni* no Brasil. In: CARVALHO, O. S., COELHO, P. M. Z., and LENZI, H. L., orgs. **Schistosoma mansoni e esquistossomose: uma visão multidisciplinar**. Rio de Janeiro. pp. 393-418, FIOCRUZ, 2008

CARVALHO, O. S. et. al. Moluscos Hospedeiros Intermediários de *Schistosoma mansoni* do Brasil. **Série Esquistossomose – 18**. Belo Horizonte: Instituto Rege Rachou / Fundação Oswaldo Cruz, 2020. Disponível em: <<http://pide.cpqrr.fiocruz.br>>. Acesso em: 15/03/2022.

CARVALHO, S. A. Tratamento da Esquistossomose Mansonii. **Revista de Medicina.** 64(1): 17- 20, 1982.

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

CAVALCANTI, M. G. S. et al. Ultrastructural and cytochemical aspects of *Schistosoma mansoni cercaria*. **Micron.** 40: 394-400, 2009.

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

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 Biochemistry Activation of the Permeability Transition Pore by Bax via Inhibition of the Mitochondrial BK Channel. **Cellular Physiology Biochemistry,** v. 49, n. 0, p. 191–200, 2011.

CHIA-TUNG, S, et al. Review: Schistosoma mansoni: the ultrastructure of larval morphogenesis in *Biomphalaria glabrata* and of associated host-parasite interactions. **Japanese Journal of Medical Science and Biology.** 49:129-149, 1996.

CIOLI, D. et al. Schistosomiasis control: praziquantel forever? **Molecular & Biochemical Parasitology.** 195: 23-29, 2014.

CLARK, A.M.; JURGENS, T.M.; HUFFORD, C.D. Antimicrobial activity of juglone. **Phytotherapy Research.** 4, 11–14, 1990.

CLOUGH, E. R. Morphology and reproductive organs and oogenesis in bisexual and unisexual transplants of mature *Schistosoma mansoni* females. **The Journal of Parasitology.** 67: 535-539, 1981.

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

COUTO, F.F.B. et al. Schistosoma mansoni: a method for inducing resistance to praziquantel using in fected *Biomphalaria glabrata* snails. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.** v. 106, pp. 153–157, 2011.

COUTO, F. F. B. **Estudo da resistência do Schistosoma mansoni Sambon, 1907 ao praziquantel.** 2014. 98 f. Tese (Doutorado Ciências) - Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, Centro de Pesquisas René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz, Belo Horizonte, 2014.

CURWEN, R. S. & WILSON, R. A. Invasion of skin by schistosome cercariae: some neglected facts. **Trends in Parasitology**, 19: 63-66, 2003.

DAMA, L. B., JADHAV, B. V. Anthelmintic effect of Juglone on mature and Immature *Hymenolepis nana* in mice. **Rivista di Parassitologia**. (2):301–2, 1997.

DAMA, L. In vitro nematicidal activity of Juglone against *Meloidogyne incognita* race 2 infesting pomegranate. **Journal Life Science and Biomedicine**. 9 (6): 164-169, 2019

DANSO-APPIAH, A. & DE VLAS, S. J. Interpreting low praziquantel cure rates of *Schistosoma mansoni* infections in Senegal. **Trends in Parasitology**, 18: 125-129, 2002.

DJAMALI, A. Oxidative stress as a common pathway to chronic tubulointerstitial injury in kidney allografts. **American Journal Physiology-Renal Physiology**. 293:F445–F455, 2007.

DOENHOFF, M. J. Praziquantel: its use in control of schistosomiasis in sub-Saharan Africa and current research needs. **Parasitology**.136: 1825–1835, 2009.

DOENHOFF, M. J., KIMANI, G., CIOLI, D., 2000. Praziquantel and the control of schistosomiasis. **Journal Parasitology Today**. 16, 364–366, 2000.

DOENHOFF, M. J.; CIOLI, D.; UTZINGER, J. Praziquantel: mechanisms of action, resistance, and new derivatives for schistosomiasis. **Current Opinion Infectious Diseases**. v. 21, pp. 659–67, 2008.

DOMLING, A.; KHOURY, K. Praziquantel and Schistosomiasis. **ChemMedChem**, n. 5, p. 1420–1434, 2010.

DORSEY, C. H. et al. Review: Ultrastructure of the *Schistosoma mansoni* cercaria. **Micron**. 33:279-323, 2002.

ELLENDORFF, T. et al. PLS-Prediction and Confirmation of Hydrojuglone Glucoside as the Antitrypanosomal Constituent of Juglans Spp. **Molecules**. 2015;10082–94.

ERDEMOGLU, N, KÜPELI, E., YESILADA, E. Anti-inflammatory and antinociceptive activity assessment of plants used as remedy in Turkish folk medicine. **Journal of Ethnopharmacology**. 89: 123-129, 2003.

ERISEN, S. et al. Cytotoxic and mutagenic potential of juglone: a comparison of free and nano-encapsulated form. **Archives of Industrial Hygiene and Toxicology**. v. 71, p. 69–77, 2020.

ESPÍRITO-SANTO, M. C. C. et al. Comparative Study of the Accuracy of Different Techniques for the Laboratory Diagnosis of *Schistosomiasis mansoni* in Areas of Low

Endemicity in Barra Mansa City, Rio de Janeiro State, Brazil. **BioMed research international**. v. 2015, p. 135689, 2015.

FOUEGUE, A. D. T., et al. Structural and Antioxidant Properties of Compounds Obtained from Fe²⁺ Chelation by Juglone and Two of Its Derivatives: DFT, QTAIM, and NBO Studies. **Bioinorganic Chemistry and Applications**. vol. 2016, 13 pages, 2016.

GALAS, M. et al. The Peptidylprolyl cis / trans -Isomerase Pin1 Modulates Stressinduced 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.

GEORGI, J. R.; WADE, S. E. & DEAN, D. A. *Schistosoma mansoni*: mechanisms of attrition and routes of migration from lungs to hepatic portal system in the laboratory mouse. **The Journal of Parasitology**. 73: 706-711, 1987.

GOLAN, David. E. et al. **Princípios de Farmacologia: A base fisiopatológica da farmacoterapia**. 2^aed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009.

GOMES, E. C. S. et al. Schistosomiasis transmission and environmental change: a spatio-temporal analysis in Porto de Galinhas, Pernambuco – Brazil. **International Journal of Health Geographics**. 11: 51, 2012.

GOMES, E. C. S. et al. Risk analysis for occurrences of schistosomiasis in the coastal area of Porto de Galinhas, Pernambuco, Brazil. **BMC Infectious Diseases**. 14:101, 2014.

GOUVEIA, M. J. et al. Drug Repurposing for Schistosomiasis: Combinations of Drugs or Biomolecules. **Pharmaceuticals**. 11(1): 1-34, 2018.

GRABE, K. & HAAS, W. Navigation within host tissues: *Schistosoma mansoni* and *Trichobilharzia ocellata* schistosomula respond to chemical gradients. **International Journal for Parasitology**. 34: 927-934, 2004.

GREENBERG, R. M. New approaches for understanding mechanisms of drug resistance in schistosomes. **Parasitology**. v. 140, pp. 1534–1546, 2013.

GRIMES, J. E. T. et al. The Relationship between Water, Sanitation and Schistosomiasis: A Systematic Review and Meta-analysis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**. 8(12): e3296, 2014.

GRYSEELS, B. et al. Are poor responses to praziquantel for the treatment of *Schistosoma mansoni* infections in Senegal due to resistance? An overview of the evidence. **Tropical Medicine & International Health**. 6: 864–73, 2001.

GRYSSELS, B. et al. Human schistosomiasis. **The Lancet Infectious Diseases**. 368:1106-18, 2006.

HAEBERLEIN, S.; HASS, W. et al. Chemical attractants of human skin for swimming *Schistosoma mansoni* cercariae. **Parasitology Research**. 102:657-662, 2008.

HAMS, E; AVIELLO, G FALLON, P. G. The *Schistosoma* granuloma: friend or foe? **Frontiers in immunology**. [S.l.], v. 4, n. 89, abr. 2013.

HANG, L. M.; BOROS, D. L.; WARREN, K. D. Induction of Immunological Hyporesponsiveness to Granulomatous Hypersensitivity in *Schistosoma mansoni* Infection. **The Journal of Infectious Diseases**. v. 130, n. 5, p. 515–522, 1974.

HE, Y. X. et al. Comparison of skin invasion among three major species of *Schistosoma*. **Trends in Parasitology**. 21:5, 2005.

HOCKLEY, D. J. & MCLAREN, D. J. *Schistosoma mansoni*: changes in the outer membrane of the tegument during development from cercaria to adult worm. **International Journal for Parasitology**. 3(1): 13-25, 1973.

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

HUSSON, G. P., VILAGINES, R., DELAVEAU, P. Recherche des propriétés antivirales de quelques extraits d'origine naturelle. **Annales Pharmaceutiques Françaises**. 44: 41–48, 1986.

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

ISMAEL, M. et al. Resistance to praziquantel: direct evidence from *Schistosoma mansoni* isolated from egyptian villagers. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. 60 (6):932–935, 1999.

ISMAIL, M. et al. 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.

JERNIGAN, J. A.; PEARSON, R. D. Antiparasitic agents. In: MANDELL D. A., DOUGLAS G., BENNET J. E., et al. **Principles and practice of infectious diseases**. 4^a ed. New York: Churchil Livingstone. p. 1235-44, 1995.

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

JI, Y.B., QU, Z.Y., ZOU, X. Juglone-induced apoptosis in human gastric cancer SGC-7901 cells via the mitochondrial pathway. **Experimental and Toxicologic Pathology**.63:69–78, 2011.

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. **The journal of biological chemistry**. v. 281, n. 10, p. 6349–6357, 2006.

JUNG, H. Topology and function of the Na⁺ /proline transporter of *Escherichia coli*, a member of the Na⁺ /solute cotransporter family. **Biochimica et Biophysica Acta**. 1365:60-4, 1998.

KAMEI, H. et al. Inhibition of cell growth in culture by quinones. **Cancer Biotherapy. Radiopharmaceuticals**. 13:185–188, 1998.

KAMEL, R. O. A.; BAYAUMY, F. E. Ultrastructural alterations in *Schistosoma mansoni* juvenile and adult male worms after in vitro incubation with primaquine. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. 112 (4): 247-254, 2017.

KASINATHAN, R. S. et al. Modulation of a *Schistosoma mansoni* multidrug transporter by the antischistosomal drug praziquantel. **The FASEB Journal**. 24 (1): 128-135, 2010.

KATZ N.; COELHO, P. M. Z. Clinical therapy of *Schistosomiasis mansoni*: The Brazilian contribution. **Acta Tropica**. v.108, pp. 72-78, 2008.

KATZ, N. The discovery of *Schistosomiasis mansoni* in Brazil. **Acta Tropica**. 108:69-71, 2008.

KATZ, N. **Inquérito Nacional de Prevalência da Esquistossomose mansoni e Geohelmintoses**. 76 p. 22. Ed. Belo Horizonte: CPqRR, 2018.

KAYSER, O. et al. In vitro leishmanicidal activity of monomeric and dimeric naphthoquinones. **Acta Tropica**. 77: 307-314, 2000.

KEELING D. J. et al. Studies on the mechanism of action of omeprazole. **Biochemical Pharmacology**, 34: 2967–2973, 1985.

KEISER, J. et al. Interactions of mefloquine with praziquantel in the *Schistosoma mansoni* mouse model and in vitro. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. 66(8):1791-1797, 2011.

- KLAVER, E.J. et al. *Schistosoma mansoni* soluble egg antigens induce expression of the negative regulators SOCS1 and SHP1 in human dendritic cells via interaction with the mannose receptor. **PLOS One**. 10: e0124089, 2015.
- KLOTZ, L. O., HOU, X., JACOB, C. 1,4-naphthoquinones: from oxidative damage to cellular and inter-cellular signaling. **Molecules**, 19:14902–14918, 2014.
- KONG, Y. et al. Natural product juglone targets three key enzymes from *Heliobacter pylori*: Inhibition assay with crystal structure characterization. **Acta Pharmacologica Sinica**. 29(7):870–876, 2008.
- KRAJCI, W.M, & LYNCH, D. L. The inhibition of various micro-organisms by crude walnut hull extracts and juglone. **Microbios Letters**. 4:175–181, 1978.
- KUNTZ, A. N. et al. Thioredoxin Glutathione Reductase from *Schistosoma mansoni*: An Essential Parasite Enzyme and a Key Drug Target. **PLOS Medicine**. v. 4, n. 6, 2007.
- LAGO, E. M. et al. Antischistosomal agents: state of art and perspectives. **Future Medicinal Chemistry**. 10 (1): 89-120, 2017.
- LANDA, P. et al. Redox and Non-Redox Mechanism of In Vitro Cyclooxygenase Inhibition by Natural Quinones. **Planta Med**. 78:326–33, 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.
- LÈHAR, J. et al. Synergistic drug combinations improve therapeutic selectivity. **Nature Biotechnology**. 27(7): 659–666, 2009.
- LELO, A. E. et al. No apparent reduction in schistosome burden or genetic diversity following four years of school-based mass drug administration in Mwea, central Kenya, a heavy transmission area. **PLOS Neglected Tropical Diseases**;8(10):e3221, 2014.
- LEONARD, G. D. et al. The role of ABC transports in Clinical Practice. **Oncologist**. 8 (5): 411-424, 2003.
- LICHTENBERGOVA, L. et al. Antibody responses induced by *Trichobilharzia regenti* antigens in murine and human hosts exhibiting cercarial dermatitis. **Parasite Immunology**. 30(11-12):585-95, 2008.
- LIKHITWITAYAWUID, K. et al. Antimalarial naphthoquinones from *Nepenthes thorelii*. **Planta Med**. 64: 237- 241, 1998.

LIMA, N. M. F. Toxicity of lapachol and isolapachol and their potassium salts against *Biomphalaria glabrata*, *Schistosoma mansoni* cercariae, *Artemia salina* and *Tilapia nilotica*. **Acta Tropica**. 83: 43-47, 2002.

LIMA, N. M. F. et al. Molluscicidal hydroxynaphthoquinones and derivatives. Correlation between their redox potentials and activity against *Biomphalaria glabrata*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**. 13, 822–829, 2002.

LORSUWANNARAT, N. et al. The anthelmintic effect of plumbagin on *Schistosoma mansoni*. **Experimental Parasitology**. v. 133, n. 1, p. 18–27, 2013.

LORSUWANNARAT, N. et al. The in vitro anthelmintic effect of plumbagin on newly excysted and 4-week-old juvenile parasites of *Fasciola gigantica*. **Experimental Parasitology**. 136c: 5-13, 2013.

LU, J.J. et al. Quinones derived from plant secondary metabolites as anti-cancer agents. **Anticancer Agents in Medicinal Chemistry**. 13:456–463, 2013.

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. **International Journal of Tropical Diseases**. 2(4), 2014.

MAGALHÃES, L. G. et al. *In vitro* schistosomicidal activity of curcumin against *Schistosoma mansoni* adult worms. **Parasitology Research**, v. 104, n. 5 p. 1197–1201, 2009.

MARTINEZ, E. M. et al. Características biológicas e morfológicas de cepas brasileiras de *Schistosoma mansoni* em *Mus musculus*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. 36 (5): 557-564, 2003.

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

MARTINS-MELO, F. R. et al. Trends in schistosomiasis-related mortality in Brazil, 2000-2011. **International Journal for Parasitology**. v. 44, p. 1055-1062, 2014.

MATOS-ROCHA, T. J. et al. Ultrastructural changes in *Schistosoma mansoni* male worms after in vitro incubation with the essential oil of *Mentha x villosa* Huds. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**. 58: 2–7, 2016.

MCKERROW, J. J. Invasion of skin by schistosome cercariae: some neglected facts. **Trends Parasitology**. 19: 66-68, 2003.

MCLAREN, D. J. ***Schistosoma mansoni*: the parasite surface in relation to host immunity**. Letchworth: Research Studies Press, 1980.

MELMAN, S. D. et al. Reduced susceptibility to praziquantel among naturally occurring Kenyan isolates of *Schistosoma mansoni*. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, 3(8): e504, 2009.

MESSERLI, S. M. et al. *Schistosoma mansoni* P-glycoprotein levels increase in response to praziquantel exposure and correlate with reduced praziquantel susceptibility. **Molecular Biochemical Parasitology**. 167 (1): 54-59, 2009.

MEULEMAN, E. A. et al. Development of daughter sporocysts inside the mother sporocyst of *Schistosoma mansoni* with special reference to the ultrastructure of the body wall. **Z. Parasitenkd.** 61: 201-212, 1980.

MILLER, P.; WILSON, R. Migration of the schistosomula of *Schistosoma mansoni* from the lungs to the hepatic portal system. **Parasitology**. 80: 267-288, 1980.

MINISTERIO DA SAÚDE. **Boletim epidemiológico. Secretaria de Vigilância em Saúde. Doenças Tropicais Negligenciadas.** Número Especial. Mar. 2021

MONKS, T. J. et. Epidermal ornithine decarboxylase induction and mouse skin tumor promotion by quinones. **Carcinogenesis**. 11, 1795–1801, 1990.

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.

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

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, 2011

NUNES, P. H. V. **Avaliação da atividade esquistossomicida da juglona frente a *Schistosoma mansoni* (CEPA BH)**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Pernambuco. Recife, p. 99. 2020.

OLIVEIRA, C. N. F. et al. Tegument of *Schistosoma mansoni* as a Therapeutic Target, Parasitic Diseases Rashika El Ridi. **IntechOpen**, 2013.

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**. v. 69, pp. 863–870, 2014.

PAREKH, H.; CHAVAN, S.; CHITNIS, M. Modulation of the thiol pools by vitamin K3 and its effect on survival of sensitive and resistant murine tumor cells. **Anticancer Drugs**. 2, 159–168, 1991.

PAULSEN, M.T.; LJUNGMAN, M. The natural toxin juglone causes degradation of p53 and induces rapid H2AX phosphorylation and cell death in human fibroblasts. **Toxicology and Applied Pharmacology**. 209, 1–9, 2005.

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**. 112 (3): 1087-96, 2012.

PÉREZ-SACAU, E. et al. Antiplasmodial Activity of Naphthoquinones Related to Lapachol and β -Lapachone. **Chemistry & Biodiversity**. v. 2, n.2, p. 264-274, 2005

PICA-MATTOCCIA, L.; CIOLI, D. Sex- and stage-related sensitivity of *Schistosoma mansoni* in vivo and in vitro praziquantel treatment. **International Journal for Parasitology**. 34 (4): 527-533, 2004.

PINTO, A. V., DE CASTRO, S. L. The trypanocidal activity of naphthoquinones: A review. **Molecules**. 14: 4570-4590, 2009.

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.

PINTO, R. M. et al. Autoradiographic analysis of *Schistosoma mansoni* migration in NZ rabbit. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. 85 (1): 91-94, 1990.

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.

PEREIRA, J.A. et al. Walnut (*Juglans regia* L.) leaves: Phenolic compounds, antibacterial activity and antioxidant potential of different cultivars. **Food Chemistry and Toxicology**. 45:2287–2295, 2007.

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**. vol. 3 1. 4 Jan. 2010.

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.

ROCHA, J. A. **Variabilidade genética e avaliação anti-schistosoma dos alcaloides pilosina, epiisopilosina, isopilosina e macaubina de jaborandi (*Pilocarpus microphyllus* Stapfex Wardlew.)**. 2013. 145f. Dissertação (Mestrado em

Biotecnologia) - Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia – Universidade Federal do Piauí, Parnaíba, 2013.

ROCHA, T. J. M. et al. Aspectos epidemiológicos e distribuição dos casos de infecção pelo *Schistosoma mansoni* em municípios do Estado de Alagoas, Brasil. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**. 7(2): 27-32, 2016.

ROSS, A. G. P. et al. Katayama syndrome. **Lancet Infectious Diseases**. 7 (3): 218-24, 2007

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**. 52:193–203, 2016.

SALOMÃO, K. et al. Trypanosoma cruzi mitochondrial swelling and membrane potential collapse as primary evidence of the mode of action of naphthoquinone analogs. **BMC Microbiology**. 13:196, 2013.

SALVADOR-RECATALA, V. et al. Atypical properties of a conventional calcium channel β subunit from the platyhelminth *Schistosoma mansoni*. **BMC Physiology**. 8:6, 2008.

SANTOS, V. H. B. DOS. **Avaliação da atividade esquistossomicida da associação β lapachona/praziquantel**. 2018. Dissertação (Doutorado em Ciências Farmacêuticas - PPGCF) –Universidade Federal de Pernambuco, Recife. 2018.

SATO, H. et al. Excretion of fluorescent substrates of mammalian multidrug resistance-associated protein (MRP) in the *Schistosoma mansoni* excretory system. **Parasitology**. 128 (pt 1): 43-52, 2003.

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.

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.

SEVES-PE. **Plano Integrado de Ações para o Enfretamento às Doenças Negligenciadas no Estado de Pernambuco/ SANAR – 2015 – 2018**. Secretaria Estadual de Saúde. 1ªed. Recife: Secretaria Estadual de Saúde, 2017.

SHARMA, N. et al. Microwave-assisted efficient extraction and stability of juglone in different solvents from *Juglans regia*: Quantification of six phenolic constituents by validated RP-HPLC and evaluation of antimicrobial activity. **Analytical Letters**. 42:2592–2609, 2009.

SILVA, L. F. D. et al. Schistosomiasis mansoni in the northeast region of Brazil: temporal modeling of positivity, hospitalization, and mortality rates. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. 11;52:e20180458, 2019.

SILVA, P. C. V.; DOMINGUES, A. L. C., Aspectos epidemiológicos da esquistossomose hepatoesplênica no Estado de Pernambuco, Brasil. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**. Brasília, 20(3):327-336. 2011.

SILVA, V. B. R. et al. Medicinal chemistry of antischistosomal drugs: Praziquantel and oxamniquine. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**. 25: 3259-3277. 2017.

SKELLY, P. J. & SHOEMAKER, C. B. Induction cues for tegument formation during the transformation of *Schistosoma mansoni* cercariae. **International Journal for Parasitology**. 30: 625-631, 2000.

SKELLY, P. J.; WILSON, R. A. Making Sense of the Schistosome Surface. **Advances in Parasitology**. 63: 185-284, 2006.

SOARES, D. A. et al. Epidemiological assessment of schistosomiasis in the state of Pernambuco through a beta regression model. **Archives of Health Investigation**. 26(2) 116-120, 2019.

SOUZA, FPC, Vitorino RR, Costa AP, et al. Esquistossomose mansônica: aspectos gerais, imunologia, patogênese e história natural. **Revista da Sociedade Brasileira de Clínica Médica**. 9(4):300-7, 2011.

STANDEN, O. D. The penetration of the cercariae of *Schistosoma mansoni* into the skin and lymphatics of the mouse. **Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**. 47: 292-298, 1953.

STEINMANN, P. et al. Schistosomiasis and water resources development: systematic review, meta-analysis, and estimates of people at risk. **Lancet Infectious Diseases**., v. 6, pp. 411–425, 2006.

STICKNEY, J. S., HOY, P. R. Toxic action of black walnut. **Transactions of the Wisconsin Horticultural Society**. 11:166–167, 1881.

STRUGSTAD, M. & DESPOTOVSKI, S. A summary of extraction, properties, and potential uses of juglone: A literature review. **J. Ecosys. Manag**. 13, 1–16, 2012.

TALLARIDA, R. J. An overview of drug combination analysis with isobolograms. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**. 319: 1-7, 2006.

TALLARIDA, R. J. Drug Synergism: Its Detection and Applications. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**. 3 (298): 865-872, 2001.

TAN, D.T.C. et al. Synthesis and antibacterial activity of juglone derivatives. **Journal of Chemistry and Chemical Engineering**. 6, 84–89, 2012.

TEIXEIRA, M. J. et al. In vitro and in vivo leishmanicidal activity of 2-hydroxy-3-(3-methyl-2-butenyl)-1,4-naphthoquinone (lapachol). **Phytotherapy Research**. 15: 44-48, 2001.

THAKUR, A. K. Juglone: A therapeutic phytochemical from *Juglans regia* L. **Journal of Medicinal Plants Research**. 5, 5324-5330, 2011.

UNIVERSIDADE DO PANAMÁ. **Schistosoma mansoni Verme adulto macho**. Disponível em: <<https://www.telmeds.org/parasitologia/clase-trematode/schistosoma-sp/schistosoma-mansoni/schistosoma-mansoni-verme-adulto-macho/>>. Acesso em: 18/08/2021

UTZINGER, J et al. Effect of combined treatment with praziquantel and artemether on *Schistosoma japonicum* and *Schistosoma mansoni* in experimentally infected animals. **Acta Tropica**. 80:9-18, 2001.

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

VERJOVSKI-ALMEIDA, S. et al. Transcriptome analysis of the acoelomate human parasite *Schistosoma mansoni*. **Nature Genetics**. 35: 148-157, 2003.

VERMA, R.P. Anti-cancer activities of 1,4-naphthoquinones: A QSAR study. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**. 6:489–499, 2006.

VITORINO, R. R. et al. Esquistossomose mansônica: diagnóstico, tratamento, epidemiologia, profilaxia e controle. **Revista da Sociedade Brasileira de Clínica Médica, São Paulo**. v. 10, n. 1, p. 39-45, 2012.

VOGE M.; PRICE Z.; BRUCKNER D. A. Changes in Tegumental Surface during Development of *Schistosoma mansoni*. **The Journal of Parasitology**. 64(4), 585–592, 1978.

WANG, J. et al. Juglone reduces growth and migration of U251 glioblastoma cells and disrupts angiogenesis. **Oncology Reports**. 38:1959–1966, 2017.

WANG, J. et al. Antibacterial Activity of Juglone against *Staphylococcus aureus*: From Apparent to Proteomic. **International Journal of Molecular Sciences**., n. Figure 1, p. 1–12, 2016.

WANG, W. Susceptibility or resistance of praziquantel in human schistosomiasis: a review. **Parasitology Research**. 111:1871-1877, 2012.

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

WESTWOOD, M. N. **Temperate Zone Pomology**. W .H. Freeman and Co., San Francisco, 1977.

WHEATER, P. R.; WILSON, R. A. *Schistosoma mansoni*: A histological study of migration in the laboratory mouse. **Parasitology**. 79:49-62, 1979.

WHO, World Health Organization. **Neglected tropical diseases: 2020 preventive chemotherapy treatment coverage declines due to COVID-19 disruptions**. Disponível em: <<https://www.who.int/news/item/08-12-2021-schistosomiasis-and-soil-transmitted-helminthiases-treating-millions-of-people-despite-the-pandemic>>. Acesso em: 26/04/2022

WHO, World Health Organization. **Schistosomiasis**. Disponível em: <https://www.who.int/health-topics/schistosomiasis#tab=tab_1> Acesso em: 25/04/2022 (b)

WHO, World Health Organization. **What is schistosomiasis?** Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/schistosomiasis>>. Acesso em 08/01/2022. (a)

WILLIAMS, D. L. et al. Thioredoxin Glutathione Reductase-Dependent. **Antioxidants & Redox Signaling**. v. 00, n. 00, 2012.

WILSON, R. A. The saga of schistosome migration and attrition. **Parasitology**. 136: 1581-1592, 2009.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Status of Schistosomiasis endemic countries**. Disponível em: <https://apps.who.int/neglected_diseases/ntddata/sch/sch.html>. Acesso em: 18/12/2021

ZHANG, R. et al. Effects of nitroxide stable radicals on juglone cytotoxicity. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. 312:385–391, 1994.

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

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. J. et al. Hepatoprotective effect of juglone on dimethylnitrosamine-induced liver fibrosis and its effect on hepatic antioxidant defence and the expression levels of α -SMA and collagen III. **Molecular Medicine Reports**.12(3):4095-4102, 2015.

ZMANTAR, T. et al. Microbial Pathogenesis Use of juglone as antibacterial and potential ef fl ux pump inhibitors in *Staphylococcus aureus* isolated from the oral cavity. **Microbial Pathogenesis**, v. 101, p. 44–49, 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, 12 de abril de 2021

Ofício nº 14/21

Da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE
 Para: **Prof. Mônica Camelo Pessoa de Azevedo Albuquerque**
Departamento de Medicina Tropical
 processo nº0062/2020

Certificamos que a proposta intitulada **“Avaliação *in vitro* do potencial esquistossomícida da associação juglona/praziquantel”**.. registrado com o nº0062/2020 sob a responsabilidade da **Prof. Mônica Camelo Pessoa de Azevedo Albuquerque** 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 30/03/2021

Finalidade	() Ensino (x) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	15 de janeiro de 2021 a 28 de fevereiro de 2022
Espécie/linhagem/raça	Camundongos <i>Mus musculus</i> , heterogênico, Swiss webster
Nº de animais	60
Peso/Idade	30-35 gramas / 30 dias
Sexo	Femea (60)
Origem: Biotério de Criação	Biotério da Imunopatologia Keizo Asami (LIKA) da UFPE
Destino: Biotério de Experimentação	Biotério da Imunopatologia Keizo Asami (LIKA) da UFPE