



Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Biociências

CLEISA DOMINGAS GONÇALVES VIEIRA

**ASSOCIAÇÃO PRAZIQUEL/JUGLONA FRENTE A
VERMES JOVENS DE *SCHISTOSOMA MANSONI***

RECIFE
2022

CLEISA DOMINGAS GONÇALVES VIEIRA

**ASSOCIAÇÃO PRAZIQUANTEL/JUGLONA FRENTE A
VERMES JOVENS DE *SCHISTOSOMA MANSONI***

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Biomedicina da Universidade Federal de Pernambuco, como pré-requisito à obtenção do título de Bacharel em Biomedicina.

Orientador: Mônica Camelo Pessoa de Azevedo Albuquerque

RECIFE

2022

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do programa de geração automática do SIB/UFPE

Vieira, Cleisa Domingas Gonçalves .

Associação praziquantel/juglona frente a vermes jovens de *Schistosoma mansoni* / Cleisa Domingas Gonçalves Vieira. - Recife, 2022.
57 : il., tab.

Orientador(a): Mônica Camelo Pessoa Azevedo Albuquerque
Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, Biomedicina, 2022.

Inclui referências, anexos.

1. Esquistossomicida. 2. Juglona. 3. Praziquantel. 4. Associação. 5. *S. mansoni*. I. Azevedo Albuquerque, Mônica Camelo Pessoa. (Orientação). II. Título.

570 CDD (22.ed.)

CLEISA DOMINGAS GONÇALVES VIEIRA

**ASSOCIAÇÃO PRAZQUANTEL/JUGLONA FRENTE A VERMES
JOVENS DE *SCHISTOSOMA MANSONI***

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Graduação em
Biomedicina da Universidade Federal de
Pernambuco, como pré-requisito à
obtenção do título de Bacharel em
Biomedicina.

Aprovada em: 23/11/2022

BANCA EXAMINADORA

Documento assinado digitalmente
 MONICA CAMELO PESSOA DE AZEVEDO ALE
Data: 29/11/2022 12:27:18-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Orientadora: Prof. Dr^a. Mônica Camelo Pessoa de Azevedo Albuquerque
Centro de Ciências Médicas-UFPE
Área Acadêmica de Medicina Tropical

Documento assinado digitalmente
 HALLYSSON DOUGLAS ANDRADE DE ARAUJ
Data: 30/11/2022 07:18:50-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Dr. Hallyson Douglas Andrade de Araújo
Departamento de Bioquímica-UFPE

Documento assinado digitalmente
 WILZA WANESSA MELO FRANCA
Data: 29/11/2022 13:41:33-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Mestre Wilza Wanessa Melo França
Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical-UFPE

Dedico este trabalho a minha família, especialmente a minha mãe (Vitalina), meu pai, minha tia e irmãos, por todo suporte nos momentos difíceis da minha trajetória acadêmica, o apoio deles foi crucial para o encerramento deste ciclo. Gratidão!

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pela minha vida, por ele ter iluminado o meu caminho e me dado forças para ultrapassar todos os obstáculos encontrados.

Agradeço à minha orientadora Prof. Mônica Camelo Pessoa de Azevedo Albuquerque, pela oportunidade, apoio, orientações, paciência e por todo conhecimento passado.

Agradeço às minhas colegas e amigas, Alicia Souza e Stella Lourenço, pelo apoio, força e carinho, que nesses 5 anos tornaram a minha estadia no Brasil mais leve e alegre, me abraçando e acolhendo, fazendo com que a dor da saudade de casa fossem menos e os meus dias melhores.

Aos meus familiares, especialmente a minha mãe Vitalina, a mulher mais incrível, forte e batalhadora que conheço, meu exemplo de força, admiração e a minha maior inspiração, ela que sempre acreditou, apoiou e me incentivou a querer mais e correr atrás dos meus sonhos, ao meu pai João, por todos os conselhos, incentivo e apoio financeiro, a minha tia Eloisa, que sempre esteve ao meu lado me apoiando e me dando suporte em todos os momentos da vida, por todo apoio emocional e financeiro, nunca conseguirei colocar em palavras o quanto sou grata por tudo. Aos meus irmãos, Larissa, Cátia, Nilton e Cleidiane, por sempre me apoiarem e torcerem por mim, a minha professora do ensino primário, Madalena, que sempre torceu, apoiou e se manteve presente em todos esses anos

Aos meus amigos, que sempre estiveram comigo, pela amizade e por compreender a minha ausência neste período de tempo que dediquei a este trabalho.

Aos professores, pelas correções e ensinamentos.

Ao LIKA e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro, espaço e materiais para a realização dos experimentos.

Muito obrigada a todos!

GONÇALVES VIEIRA, Cleisa Domingas. **ASSOCIAÇÃO PRAZIQUANTEL/JUGLONA FRENTE A VERMES JOVEM DE *SCHISTOSOMA MANSONI***. 2022. 60 páginas. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2022.

RESUMO

O praziquantel (PZQ) é o único recurso para tratamento da esquistossomose. Embora seja eficaz, seguro e de baixo custo não é ativo contra fases jovens do *Schistosoma spp*, não previne reinfecções e já existem relatos de cepas com baixa sensibilidade e/ou resistência. Esses achados apontam a necessidade de se buscar métodos alternativos para o tratamento da esquistossomose. Deste modo, objetivou-se avaliar, *in vitro*, a atividade esquistossomicida da associação Praziquantel /Juglona (PZQ/JGN) contra vermes jovens de *Schistosoma mansoni*. Os vermes foram recuperados de camundongos infectados com cercárias da cepa BH, e incubados em meio RPMI em concentrações variando de 3,125 μM - 50 μM de JGN, e de 12,5 μM - 200 μM de PZQ, sendo monitorados nos tempos de 3h, 6h, 12h e 24h para avaliação da motilidade, mortalidade e danos tegumentares. A taxa de mortalidade em 24 horas foi utilizada para determinar a Concentração Letal 50% (CL_{50}) e, posteriormente, calcular os Índices de Combinação (IC) das associações entre concentrações inferiores a CL_{50} até a diluição de $1/32 \text{CL}_{50}$. O efeito letal da JGN sobre vermes jovens foi observado nas primeiras horas na concentração de 25 μM , apresentado uma CL_{50} de 8,76 μM em 24 horas. Quando submetidos ao PZQ, todos os vermes tiveram intensa redução da motilidade nas primeiras horas, mas o efeito letal só foi observado na concentração de 200 μM e a CL_{50} ao final de 24 horas foi de 96,57 μM . A associação PZQ/JGN mostrou Índice de Combinação (IC) sinérgico em 23 das 25 combinações avaliadas. Em cinco associações o sinergismo apresentou taxa de mortalidade de vermes igual ou superior a 70%. O menor IC foi registrado na associação $0,25\text{CL}_{50}$ de JGN e $0,125\text{CL}_{50}$ de PZQ com índice de redução de dose de 4,70 e 11,49, respectivamente. Podemos concluir que a associação PZQ/JGN norteia novas possibilidades para o tratamento da esquistossomose com uso de pequenas

doses individuais combinadas com redução dos efeitos adversos, potencialização terapêutica e eliminação das chances de surgimento de cepas resistentes ao PZQ.

Palavras-chave: Esquistossomicida. Juglona. Praziquantel. Associação. *S. Mansoni*.

GONÇALVES VIEIRA, Cleisa Domingas. **PRAZIQUANTEL/JUGLONE ASSOCIATION AGAINST YOUNG worms of *Schistosoma mansoni***.2022. 60 páginas. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2022.

ABSTRACT

Praziquantel (PZQ) is the only resource for treating schistosomiasis. Although it is effective, safe and inexpensive, it is not active against young stages of *Schistosoma spp*, does not prevent reinfections and there are already reports of strains with low sensitivity and/or resistance. These findings point to the need to seek alternative methods for the treatment of schistosomiasis. Thus, the objective was to evaluate, in vitro, the schistosomicidal activity of the association Praziquantel/Juglone (PZQ/JGN) against young *Schistosoma mansoni* worms. The worms were recovered from mice infected with cercariae of the BH strain, and incubated in RPMI medium at concentrations ranging from 3.125 μM - 50 μM of JGN, and from 12.5 μM - 200 μM of PZQ, being monitored at 3h, 6h, 12h and 24h for assessment of motility, mortality and integumentary damage. The 24-hour mortality rate was used to determine the 50% Lethal Concentration (LC50) and subsequently calculate the Combination Indices (CI) of the associations between concentrations below LC50 up to a dilution of 1/32 LC50. The lethal effect of JGN on young worms was observed in the first hours at a concentration of 25 μM , presenting an LC50 of 8.76 μM in 24 hours. When submitted to PZQ, all worms had an intense reduction of motility in the first hours, but the lethal effect was only observed at the concentration of 200 μM and the LC50 at the end of 24 hours was 96.57 μM . The association PZQ/JGN showed a synergistic Combination Index (CI) in 23 of the 25 combinations evaluated. In five associations, synergism had a worm mortality rate equal to or greater than 70%. The lowest CI was recorded in the association of 0.25CL50 of JGN and 0.125CL50 of PZQ with a dose reduction index of 4.70 and 11.49, respectively. We can conclude that the PZQ/JGN association guides new possibilities for the treatment of schistosomiasis with the use of small individual doses combined with reduction of adverse effects, therapeutic potentiation and elimination of the chances of emergence of PZQ resistant strains.

Key words: Schistosomicidal.Juglone.Praziquantel. Association. *S. mansoni*

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Distribuição mundial da esquistossomose	15
Figura 2: Expansão da esquistossomose nas áreas endêmicas.....	16
Figura 3: Distribuição da esquistossomose segundo a média do percentual de positividade por municípios. Brasil, 2009-2020.	17
Figura 4 Estágio evolutivo do <i>Schistosoma mansoni</i> (A - Vermes adultos, B - miracídio, C – Ovo, D- esporocisto, E- Cercária, F - esquistossômulo).	19
Figura 5: Espécie de <i>Biomphalaria glabrata</i> (A), <i>Biomphalaria straminea</i> (B), <i>Biomphalaria tenagophila</i> (C).....	22
Figura 6:Ciclo biológico de <i>Schistosoma mansoni</i>	24
FFigura 7:Estrutura química de Praziquantel	27
Figura 8:Estrutura química da Juglona.....	28

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Avaliação in vitro do score de motilidade, em percentagem, de vermes jovens (21 dias) de <i>Schistosoma mansoni</i> , expostos a diferentes concentrações de juglona durante 24 horas.....	35
Tabela 2 - Avaliação in vitro do score de motilidade, em percentagem, de vermes jovens (21 dias) de <i>Schistosoma mansoni</i> , expostos a diferentes concentrações de praziquantel durante 24 horas.....	36
Tabela 3 - Efeito da associação Juglona e Praziquantel sobre vermes jovens de <i>S. mansoni</i> (21 dias) após 24 horas.	37

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABC	ATP-Binding Cassete
BH	Belo Horizonte
CDPK	Proteínas Quinases Dependentes de Cálcio
DMSO	Dimetilsulfóxido ou sulfóxido de dimetilo
DRI	Índice de Redução de Dose
EM	Esquistossomose Mansonii
IC	Índice de Combinação
IL-1 β	Interleucina 1 β
IL-18	Interleucina 18
JGN	Juglona
K+	Potássio
LC	Concentração Letal
LIKA	Laboratório de Imunologia Keizo Asami
MAPK	Proteína Quinase Ativada por Mitose
MRP	Resistência a Múltiplas Drogas
Na+	Sódio
PZQ	Praziquantel
Pqp	Glicoproteína P
ROS	Espécie Reativa de Oxigênio
RNA	Ácido Ribonucleico
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SNC	Sistema Nervoso Central
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
μ M	Micrômetro
WHO	World Health Organization

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
2.1	DISTRUBUIÇÃO GEGRÁFICA E DADOS GEAGRÁFICOS EPIDEMIOLÓGICOS	14
2.2	O PARASITO: <i>Schistosoma mansoni</i>	18
2.2.1	ASPECTOS MORFOLÓGICOS DE SCHISTOSOMA MANSONI NOS DIFERENRES ESTÁGIOS EVOLUTIVOS	18
2.2.2	Hospedeiros	21
	2.2.3 Ciclo biológico	22
	2.3 PATOGENIA DA ESQUISTOSSOMOSE	24
	2.4 TRATAMENTO DA ESQUISTOSSOMOSE	25
3	OBJETIVOS	30
	3.1 Objetivo Geral	30
	3.2 Objetivos Específicos.....	30
4	METODOLOGIA	31
	4.1 Considerações éticas.....	31
	4.2 Animais e parasitos.....	31
	4.3 Infecção de caramujos do gênero <i>Biomphalaria glabrata</i> com miracídio de <i>Schistosoma mansoni</i>	31
	4.4 Infecção de camundongos <i>Mus musculus</i> com cercárias de <i>S. mansoni</i>	31
	4.5 Drogas	32
	4.6 Avaliação esquistossomicida da associação Praziquantel/Juglona (PZQ/JGN) sobre vermes jovens de <i>Schistosoma mansoni</i>	32
	4.7 Estudos de combinação de drogas.....	33
5	RESULTADOS	34

5.1 Avaliação da Susceptibilidade <i>In Vitro</i> de Vermes Jovens de <i>S. mansoni</i> Frente a Juglona e Praziquantel	34
5.2 Efeito da combinação PZQ-JGN contra vermes jovens de <i>Schistosoma mansoni</i> (cepa BH).....	36
6 DISCUSSÃO	38
7 CONCLUSÃO	42
REFERÊNCIA	43

1 INTRODUÇÃO

A esquistossomose é uma doença infecto parasitária, debilitante, de caráter agudo e crônico, causada pelo parasitas do gênero *Schistosoma*. Em escala global estima-se que cerca de 236.6 milhões de pessoas são portadoras da esquistossomose, distribuídas em 78 países. No Brasil a doença é detectada em todas as regiões onde aproximadamente 43 milhões de pessoas encontram-se sob risco de infecção e estima-se que, cerca de 2,5 milhões de pessoas estejam infectadas pelo *Schistosoma mansoni* (WHO, 2019; BRASIL, 2017;KATZ, 2018).

O praziquantel (PZQ) é o único fármaco presente no mercado e indicado pelo WHO para o tratamento da esquistossomose. É barato e eficaz contra todos as espécies de *Schistosoma*, apresenta baixa toxicidade e boa tolerância, mas apresenta baixa solubilidade; baixa atividade contra estágios imaturos dos vermes e resistência ou tolerância, devido ao seu uso repetido em regiões altamente endêmicas (CIOLI, 2014; SILVA, 2017; HOTEZ et al., 2019).

No entanto, o aparecimento de cepas de *Schistosoma* com baixa sensibilidade e/ou resistência ao PZQ já foram descritas e identificadas, devido ao uso repetido em regiões endêmicas. Também existem relatos de falhas terapêuticas e intolerância de pacientes, acarretando a diminuição da eficácia do tratamento (Melman et al., 2009; Olliaro PL,2014). Esses achados apontam a necessidade de se buscar métodos alternativos para o tratamento da esquistossomose, sendo uma das possibilidades a associação do PZQ com outras drogas.

A associação terapêutica pode ocasionar melhora da eficácia devido ao potencial sinérgico ou aditivo de dois ou mais medicamentos. Este recurso é uma alternativa para o aumento da eficácia terapêutica dos fármacos em várias doenças, além de retardar, minimizar ou até evitar o aparecimento de resistência e diminuir efeitos colaterais e tóxicos (WHO, 2001).

Compostos naturais vêm sendo estudados e analisados como uma alternativa terapêutica para o tratamento da esquistossomose. Entre esses produtos as naftoquinonas foram notadas. Naftoquinonas são metabólitos secundários produzidos por algas, fungos, plantas com diversas atividades farmacológica,

incluindo atividade esquistosomicida. (THOMSOM,1991; AIRES et al., 2014). A juglona, sendo uma naftoquinona, se mostra bastante promissora. Muitos estudos tem mostrado suas propriedades farmacológicas (SILVA et al, 2012).

juglona é um composto fenólico, quimicamente denominado 5-hidroxi-1,4-naftoquinona, produzido por inúmeras espécies de noqueira, incluindo a *Juglans nigra*, *Juglans regia*, *Juglans sieboldiana* e *Juglans cinerea* encontrado na casca de frutas frescas maduras, raízes, folhas e casca (STRUGSTAD et al., 2012).

Embora o mecanismo de ação da juglona não esteja esclarecido, varias atividades farmacologicas foram comprovadas, incluindo atividades antineoplásica (Ji, Yu-Bin; Qu, Zhong-Yuan; Zou, Xian 2011), antimicrobianas (KONG et al., 2008), anti inflamatórias (LANDA et al., 2012) anti-hipertensiva (AHMAD et al., 2019), sedativa (STRUGSTAD et al., 2012), e intensas propriedades antioxidantes, como supressão de ROS, quelação de íons metálicos e inibição enzimática (Shuai Chen et al 2021). Como antiparasitário apresentou efeito contra *Toxoplasma gondii* (AKERMAN e MULLER, 2005), *Trypanosoma cruzi*, *T. brucei rhodesiense* e *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).

Com base nos dados apresentados acima, é possível considerar a Juglona uma opção terapêutica em associação com o Praziquantel. Existem poucos estudos disponíveis sobre a associação de medicamentos esquistosomicidas que possibilitam um aumento na eficácia terapêutica em relação ao tratamento isolado. Essa associação pode ser uma alternativa para diminuir cepas de *Schistosoma* resistentes ao mesmo tempo em que preserva o efeito farmacológico do praziquantel.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 DISTRIBUIÇÃO GEGRÁFICA E DADOS GEAGRÁFICOS EPIDEMIOLÓGICOS

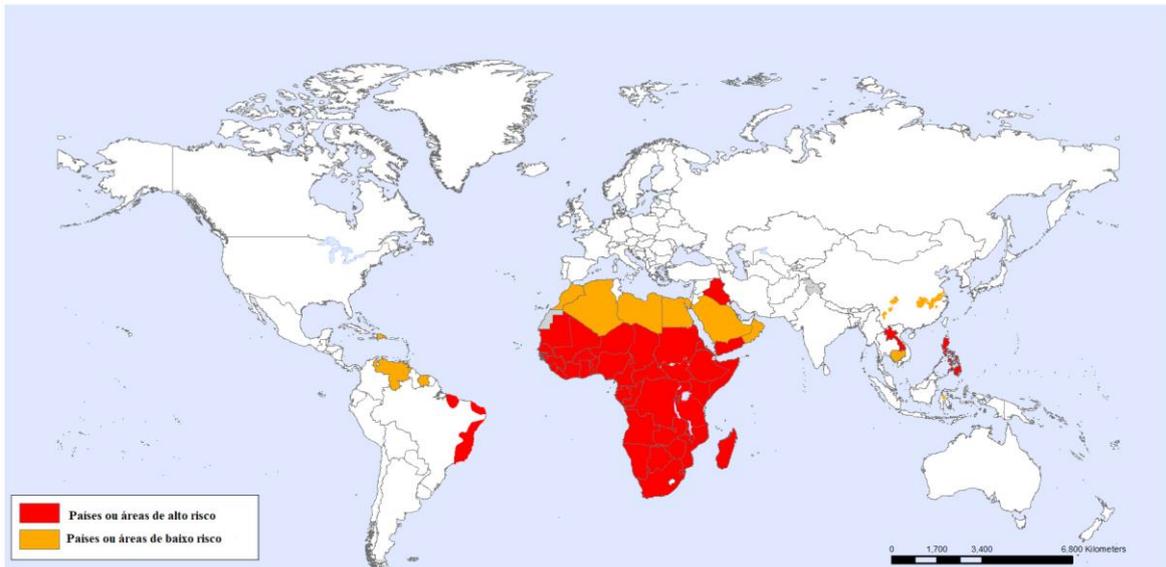
A esquistossomose é uma doença infecciosa parasitária, cujo agente etiológico são helmintos trematódeo, dioico, do gênero *Schistosoma*. Cinco espécies acometem frequentemente o homem em 78 países, são elas: *S. mansoni*, *S. haematobium*, *S. japonicum*, *S. intercalatum* e *S. mekongi*. É também conhecida por bilharziose, xistose, barriga d'água ou doença do caramujo (BRASIL, 2018).

Historicamente, as esquistossomoses originaram-se nas bacias dos rios Nilo, na África, e do Yangtze, na Ásia. Ovos de *Schistosoma* foram encontrados em vísceras de múmias egípcias cuja origem remonta a 1.250 a.C, conforme comprovou Ruffer, em 1910. Igualmente, existem relatos de que na cidade de Chang-Iha, na China, foram encontrados ovos de *Schistosoma japonicum* em cadáver de cerca de 2.000 anos (BRASIL, 2014).

Atualmente, mais de 236.6 milhões de pessoas a nível mundial encontram-se parasitadas por uma das espécies de *Schistosoma* e outras 770 milhões habitam áreas de risco, o que coloca a esquistossomose em segundo lugar entre as doenças parasitárias, atrás apenas da malária, pela sua importância e repercussão socioeconômica (WHO, 2019; MORAES et al., 2019).

A esquistossomose tem ampla distribuição geográfica, atingindo partes do Oriente Médio, Américas, Sudeste Asiático e, particularmente, a África Subsaariana (figura 1) (MCMANUS, et al., 2018). Nas Américas é encontrada em Porto Rico, Antilhas, Venezuela, Suriname e no Brasil (BRASIL, 2014). Sua distribuição geográfica está intimamente relacionada ao nível de saneamento e cuidados à saúde pública. Desta forma, fatores ambientais e socioeconômicas como falta de saneamento básico, abastecimento e tratamento de água para consumo, rede de esgoto sanitário, coleções hídricas (rio, pequenas valas, lagoas, e até pequenas poças), baixa escolaridade, favorecem a manutenção da transmissão e a propagação da doença (MASSARA, 2008; PORDEUS, 2008).

Figura 1: Distribuição mundial da esquistossomose

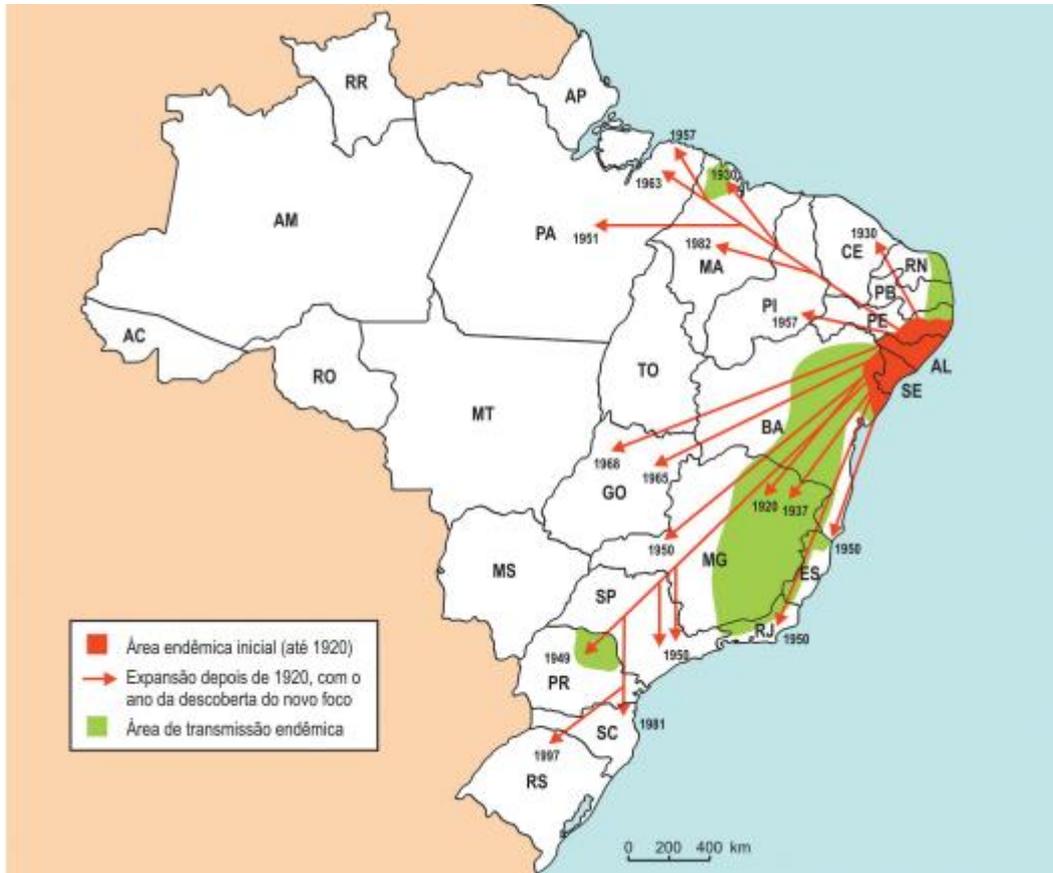


Fonte: (WHO, 2017).

A esquistossomose chegou ao Brasil junto com os escravos oriundos da costa ocidental Africana trazidos pelos portugueses, e em função da rota de navegação a doença chegou aos portos de Recife e Salvador. Dos portos de entrada, a doença se expandiu inicialmente pelo nordeste brasileiro, formando extensa área de transmissão entre os estados do Rio Grande do Norte e da Bahia (FIGURA 2) (BRASIL, 2014).

Devido a necessidade das espécies de *Schistosoma* requisitarem hospedeiros intermediários adequados, nas Américas apenas o *Schistosoma mansoni* se estabeleceu, uma vez que nessa região somente são encontrados caramujos do gênero *Biomphalaria* (BRASIL, 2014).

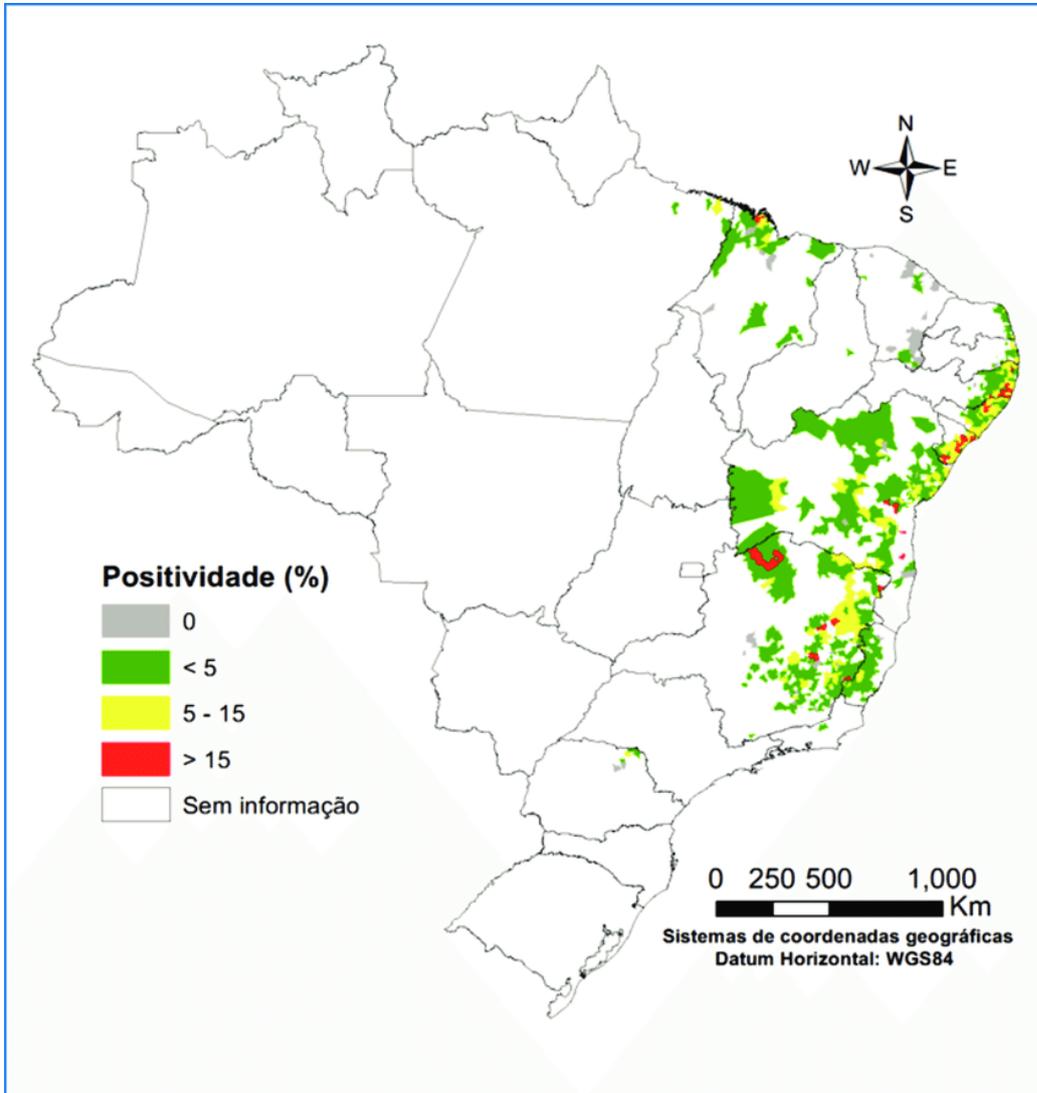
Figura 2: Expansão da esquistossomose nas áreas endêmicas



Fonte:(Brasil, 2014)

A esquistossomose está presente no Brasil de forma mais intensificada em 19 Unidades Federadas. São áreas com transmissão endêmicas que compreendem os Estados de Alagoas, Bahia, Pernambuco, Rio Grande do Norte, Paraíba, Sergipe, Espírito Santo e Minas Gerais, com predominância no norte e nordeste deste estado. No Pará, Maranhão, Piauí, Ceará, Rio de Janeiro, São Paulo, Santa Catarina, Paraná, Rio Grande do Sul, Goiás e no Distrito Federal, a transmissão é focal, não atingindo grandes áreas (FIGURA 3) (BRASIL, 2021).

Figura 3: Distribuição da esquistossomose segundo a média do percentual de positividade por municípios. Brasil, 2009-2020.



Fonte: https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/boletins/epidemiologicos/especiais/2021/boletim_especial_doe_ncas_negligenciadas.pdf. Acesso em 28.09.2022

Em 2017, as regiões endêmicas do Brasil foram responsáveis com cerca de 91,3% dos casos de esquistossomose (BRASIL, 2019). Entre os estados atingidos pela doença, os que apresentam maior incidência são os estados de Bahia com 3.226 casos (50,41%), Pernambuco com 1442(22,53%) e Sergipe com 559 casos (8,74%) (SOBRINHO et al., 2020).

Em Pernambuco, dos 185 municípios, 103 são considerados endêmicos (DUBEUX et al., 2019; JUNG et al., 2019; WHO, 2019; BRASIL, 2017), a maioria localizados nas zonas da mata norte e Sul e na Região Metropolitana (DUBEUX et al., 2019).

A migração da população portadora da esquistossomose para os centros urbanos e áreas litorâneas têm sido apontadas como um dos fatores de propagação da doença (BARBOSA et al., 2000). A ocupação nas periferias das cidades associada a falta de saneamento básico facilita o aparecimento de criadouros de caramujos infectados, aumentando as chances de contato da água contaminada com o homem, facilitando assim a propagação da doença (GOMES et al., 2014). Exemplo desse cenário foi registrado nas praias de Itamaracá, Piedade (Jaboatão dos Guararapes) e Porto de Galinhas (município de Ipojuca-PE), todas na região metropolitana do Recife, o que vem causando impacto na população dos municípios afetados (BARBOSA et al., 2000).

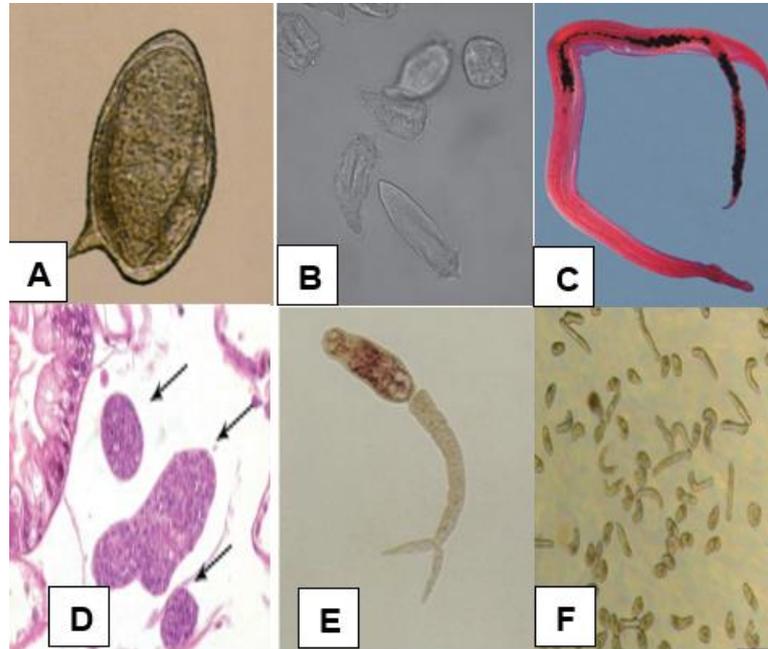
Em 2000, na praia de Porto de Galinhas, foram registrados 662 casos de esquistossomose (BARBOSA et al., 2001). Uma nova pesquisa foi realizada em 2010, e foram diagnosticados 425 novos casos de esquistossomose (BARBOSA et al., 2011).

2.2 O PARASITO: *Schistosoma mansoni*

2.2.1 ASPECTOS MORFOLÓGICOS DE SCHISTOSOMA MANSONI NOS DIFERENTES ESTÁGIOS EVOLUTIVOS.

O gênero *Schistosoma* possui diferentes estágios de desenvolvimento (vermes adultos, ovos, miracídios, esporocistos, cercárias e esquistossômulos), cada um deles com características particularidades (SOUZA et al, 2011)

Figura 4: Estágio evolutivo do *Schistosoma mansoni* (A - Vermes adultos, B - miracídio, C – Ovo, D- esporocisto, E- Cercária, F - esquistossômulo).



Fontes: (A, B, C, D. BRASIL,2014) (E, F; COELHO E CARVALHO, 2008)

Ovo

O ovo (Fig. A) mede cerca de 150 micrômetros de comprimento por 60 micrômetros de largura, apresenta formato oval e um espículo lateral na parte mais voltada para trás. Quando maduro apresenta o miracídio formado no seu interior, que usualmente é encontrada nas fezes, seu tempo média de vida é de 4 dias, nos tecidos o seu tempo de meia vida é de aproximadamente 20 dias (Brasil, 2014).

Miracídio

O miracídio (Fig. B), representa a primeira forma larvária do *S. mansoni*, sobrevive até 24 horas na água, em temperatura adequada. É móvel, e possui um formato oval revestido por numerosos cílios que revestem sua delgada cutícula ao seu sistema muscular, mede em torno de 150 a 170 mm de comprimento e de 60 a 70 mm de largura (BRASIL, 2014; KATZ, 2003)

Vermes Adultos

Os vermes adultos de *S. mansoni* (Fig. C) é de cor esbranquiçada ou leitosa, habitam preferencialmente as vênulas tributárias do sistema porta, especialmente das veias mesentéricas superiores e inferiores, do plexo hemorroidário e mesmo da porção intra-hepática da veia porta, a cópula ocorre quando a fêmea se aloja no canal ginecóforo do macho (BRASIL, 2014).

O macho mede de 6,5 mm a 12 mm de comprimento por 1mm de largura, achatado e com um aspecto cilíndrico. A fêmea é mais fina que o macho, é cilíndrica, com as extremidades mais afiladas e o comprimento duas vezes maior (KATZ; ALMEIDA, 2003).

Esporocistos

O esporocisto (fig. D) se apresenta em formato de tubo envelopado repleto de células germinativas em multiplicação. É móvel e se apresenta em 3 tipos: primário, secundário e terciário (CAVALCANTI, 2008; NEVES, 2016).

Cercária

A cercaria (fig. E) é a segunda fase de vida livre do parasito. É uma larva com corpo e cauda, adaptada à vida aquática. Mede cerca de 0,2 mm de comprimento por 0,07 mm de largura e a cauda, aproximadamente 300 mm. É na forma de cercárias (chamadas furcocercárias, por apresentarem a cauda bifurcada) que o *S. mansoni* infecta o homem, o hospedeiro definitivo (KATZ; ALMEIDA, 2003; BRASIL, 2014).

Esquistossômulo

O esquistossômulo (fig. F) é a fase de transição de um organismo de forma livre para um organismo de forma parasitária. A cercária perde a sua cauda ao penetrar no hospedeiro e se transforma em esquistossômulo. O esquistossômulo é mais permeável à água devido à ausência de Glicocálix (LOVERDE, 2019; CAVALCANTI, 2008).

Vermes Jovens

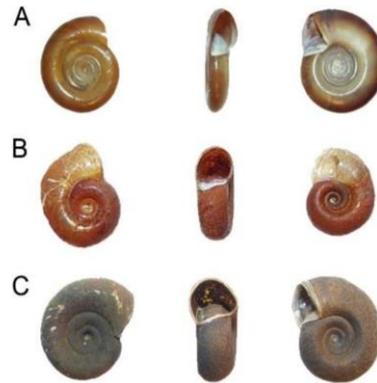
Após 21 dias de infecção, os esquistossomulos pulmonares se transformam em vermes jovens. Vermes esses que apresentam aspecto vermiforme similares aos vermes adultos, porém ainda com seus sistemas biológicos imaturos (NEVES et al., 2011a). Os vermes jovens possuem na região anterior duas ventosas: oral e ventral/acetábulo. O sistema digestivo começa na boca, próximo a ventosa oral, seguido pelo esôfago e posteriormente existe um ceco ramificado. Os machos possuem dois lobos testiculares e uma curvatura dorsoventral no corpo, enquanto as fêmeas têm o útero rudimentar (Figura 10) (TEIXEIRA et al., 2008).

2.2.2 HOSPEDEIRO

O *Schistosoma mansoni* tem um ciclo biológico do tipo heteroxênico que envolve um hospedeiro definitivo (homem), e um hospedeiro intermediário (molusco) (KATZ, ALMEIDA. 2003). Em condições ambientais, o *Schistosoma mansoni* pode infectar roedores, primatas, marsupiais, ruminantes e carnívoras silvestres, porém não existem evidências concretas da importância epidemiológica destes reservatórios (VITORINO, R et al., 2012).

Os hospedeiros intermediários do *S. mansoni* são moluscos planorbídeos do gênero *Biomphalaria* (VITORINO, R et al, 2012). Dentre as várias espécies deste gênero a *B. glabrata*, *B. tenagophila* e *B. straminea* são potencialmente adaptadas ao *S. mansoni* e possuem importância epidemiológica (Figura 4) (CARVALHO, OS, COELHO, et al., 2008). Outras espécies como *B. peregrina*, *B. amazônica*, *B. schrammi*, *B. intermedia*, *B. oligoza*, *B. occidentalis*, *B. kuhniana*, *B. cousini* são consideradas hospedeiras em potencial desse trematódeo, pela possibilidade de serem infectadas experimentalmente (BRASIL, 2014).

Figura 5: Espécie de *Biomphalaria glabrata* (A), *Biomphalaria straminea* (B), *Biomphalaria tenagophila*(C)



Fonte:(BRASIL, 2014)

A *Biomphalaria glabrata* é a espécie que mais favorece o desenvolvimento do *S. mansoni* pela sua capacidade de sobrevivência em condições ambientais críticas, pela sua elevada taxa de positividade, e por suas características biológicas favoráveis (BRASIL, 2014).

A *Biomphalaria tenagophila* e a *Biomphalaria straminea* são também importantes, sendo a primeira espécie encontrada principalmente no sul do país, estado de São Paulo e Sul da Bahia e a segunda encontrada em quase todas as bacias hidrográficas do país. A *Biomphalaria tenagophila* é a espécie que apresenta a menor taxa de infecção natural pelo *S. mansoni* (Brasil, 2014).

2.2.3 CICLO BIOLÓGICO

O ciclo biológico do *S. mansoni* é do tipo heteroxênico. No hospedeiro definitivo, os vermes adultos acasalam nos vasos do sistema porta-hepático, e seguem para os vasos mesentéricos onde ocorre a postura dos ovos. Ao atravessarem a parede do intestino, os ovos alcançam a luz intestinal e são envolvidos pelo bolo fecal e eliminados (SOUZA et al, 2011).

Os ovos de *Schistosoma mansoni* contido no material fecal e em contacto com a água, e sob luminosidade solar, temperatura alta e boa oxigenação, liberam uma larva ciliada de vida livre, chamada miracídio. Os miracídios, após a eclosão, por

algumas horas nadam ativamente em círculos para encontrar o hospedeiro intermediário, a penetração do miracídio no interior do molusco hospedeiro intermediário é facilitada por quimiorreceptores localizados em suas fibras nervosas que são capazes de reconhecer substâncias histolíticas sintetizadas e excretadas junto ao muco produzido pelo caramujo e das enzimas secretadas pelas glândulas cefálicas capazes de digerir queratina epidérmica (HAAS, 1995 e BOROS D L, 1989). O tempo total de penetração é de 10 a 15 minutos.

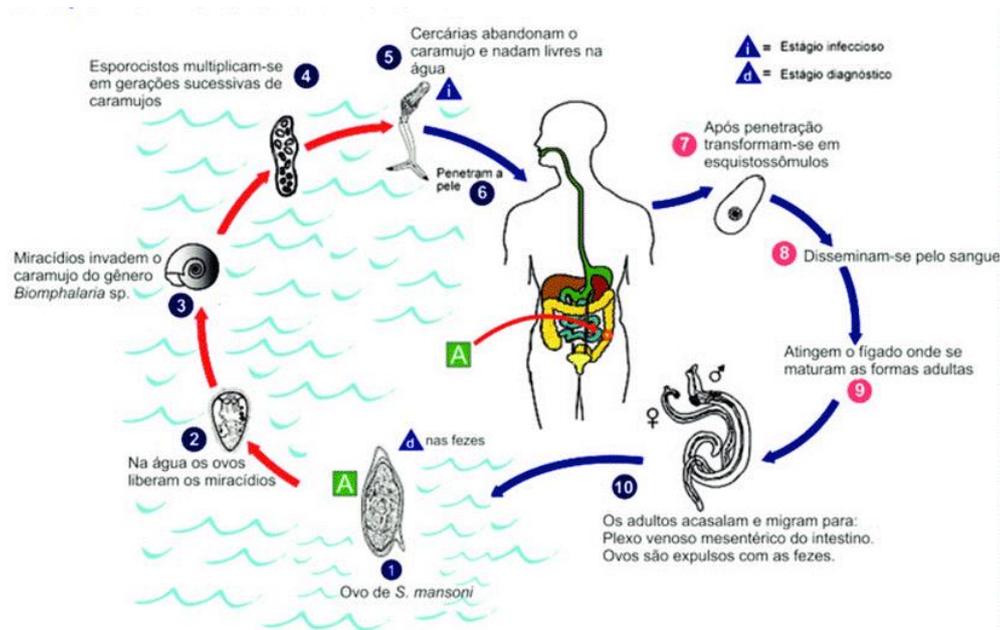
Seguindo a penetração do miracídio no caramujo ocorre a modificação de sua camada ciliada e componentes externos, apresentando somente um saco alongado, estrutura essa denominada de esporocisto I (primário ou mãe), essa estrutura aloja células germinativas que posteriormente se diferenciam em esporocistos secundários por um processo de poliembrionia e ao alcançarem as glândulas digestivas do caramujo se transformarão em cercárias. Geralmente, cada miracídio, gera cerca de 100 mil a 300 mil cercárias do mesmo sexo. Normalmente esse ciclo no hospedeiro intermediário ocorre em um período de três a cinco semanas (BOYLE et al., 2003; GRYSSELS et al., 2006).

As cercárias saem através da formação de vesículas no tegumento do molusco, que se rompem e as liberam, na água nas horas mais quentes e luminosas do dia. A sobrevivência das cercárias na água é limitada a pouco mais de dois dias, muitas morrem nos primeiros momentos, outros algumas horas depois da libertação do hospedeiro intermediário. Na sua forma livre, nadam ativamente ao encontro do hospedeiro definitivo. Ao alcançarem a pele do homem, fixam-se entre os folículos pilosos com auxílio de suas duas ventosas e penetram ativamente graças aos seus movimentos ativos e à ação das secreções histolíticas das glândulas de penetração. A penetração se dá em aproximadamente 15 minutos, levando à irritação da pele (SOUZA et al., 2011).

Depois de atravessar a pele, a cercária passa a ser chamada de esquistossômulo, esses penetram em vasos linfáticos ou vasos sanguíneos do hospedeiro. Alguns deles são vencidos pelo sistema imunológico humano, outros conseguem chegar ao coração e pulmões, e no fígado se alimentam e tornam-se vermes adultos (KATZ, ALMEIDA, 2003). No organismo humano o verme alcança a maturidade por volta do 35º dia após a penetração da cercária. (Pordeus et al, 2008).

Com o ciclo evolutivo completo os vermes migram para os vasos mesentéricos do hospedeiro e iniciam a oviposição (Figura 6) (KATZ, ALMEIDA, 2008).

Figura 6: Ciclo biológico de *Schistosoma mansoni*



Fonte: Centro de Controle de Doenças, 2017.

<https://www.cdc.gov/parasites/schistosomiasis/biology.html>

2.3 PATOGENIA DA ESQUISTOSSOMOSE

A forma clínica da esquistossomose varia de acordo com a carga parasitária, deposição contínua dos ovos nos órgãos e do sistema imunológico do hospedeiro (BRASIL, 2014).

A esquistossomose mansoni pode se manifestar de forma aguda ou crônica. Após o contato infectante, alguns pacientes queixam-se de manifestações pruriginosas na pele, de rápida duração, que quase sempre cedem espontaneamente. Esta manifestação clínica é conhecida como dermatite cercariana. Caracterizado por presença de micropápulas eritematosas e pruriginosas semelhantes a picadas de inseto e eczema de contato, alguns indivíduos também descrevem um quadro de

forma toxêmica ou febre de Katayama pode ser desenvolvido (BRASIL, 2014). sintomas agudos da doença geralmente aparecem de 4 a 10 semanas após uma forte exposição a cercárias, coincidindo com a fase migratória e de maturação do parasito nos pulmões e fígado, e maturação dos vermes fêmeas e machos ou oviposição nas veias mesentéricas (D L Boros, 1989). Apresenta-se sob forma leve, com diarreia, febre leve, cefaléia, sudorese, astenia, anorexia e emagrecimento. Pode ainda ter início abrupto, como calafrios, sudorese, astenia, anorexia, mialgia, tosse e diarréia (às vezes, disenteria, acompanhada de dores abdominais e distensão do abdome). Manifestações de hipersensibilidade como urticária, prurido generalizado, edema da face, placas eritematosas ou lesões púrpuras também podem ocorrer (PRATA, AR., e COURA, JR, 2008). Esses sintomas são transitórios e desaparecem espontaneamente pela transição da doença para fase crônica (DL Boros, 1989). Alguns pacientes desenvolvem na fase aguda, quadros clínicos mais graves com icterícia, coma ou abdômen agudo (fase aguda toxêmica).

A doença alcança a fase crônica a partir dos seis meses após a infecção, podendo evoluir por muitos anos, podendo se manifestar nas formas intestinais, hepatointestinal, hepatoesplênica ou neurológica com sintomatologias dependendo dos órgãos acometidos e da intensidade da carga parasitária, pacientes que evoluem das formas agudas para as formas crônicas usualmente apresentam modulação satisfatória do granuloma, isto é, o granuloma necrótico-exsudativo da forma aguda transforma-se em um granuloma produtivo com menor número de células inflamatórias, sem área de (PORDEUS et al., 2008; BRASIL, 2014).

A principal complicação da esquistossomose mansoni é a hipertensão portal, que nos casos avançados se caracteriza por hemorragia, ascite, edema e insuficiência hepática severa, casos que quase sempre evoluem para óbito, pois, apesar do tratamento, a fibrose e a cirrose que acontecem em torno do granuloma são irreversíveis (BRASIL, 2014).

2.4 TRATAMENTO DA ESQUISTOSSOMOSE

Atualmente o tratamento da esquistossomose recomendado pelo WHO ocorre apenas com o uso do praziquantel (PZQ). Este fármaco é uma pirazino isoquinolina com amplo espectro de atividade contra trematódeos e cestódeos (Figura 7) (NOVAES et al., 1999).

Praziquantel é eficaz contra *S. mansoni*, *S. haematobium*, *S. japonicum*, *S. intercalatum* e *S. mattheei* (GÖNNERT & ANDREWS, 1977; ANDREWS; DOENHOFF et al. 2002), atua em diferentes formas clínicas, porém estudos confirmaram que os estágios imaturos da *S. mansoni* são em grande parte refratários aos efeitos do praziquantel (BOTROS.S et al 2005).

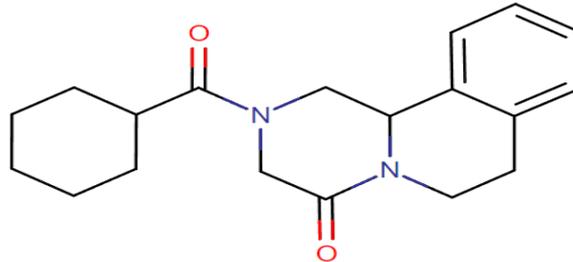
O mecanismo de ação do praziquantel deve-se à inibição da bomba Na⁺, K⁺ no tegumento dos vermes adultos de *Schistosoma*, aumentando a permeabilidade da membrana do helminto a certos cátions monovalentes e divalentes, principalmente o cálcio que leva à intensificação da atividade muscular, seguida por contração e paralisia espástica. Como consequência, os helmintos se separam dos tecidos do hospedeiro e são rapidamente deslocados das veias mesentéricas para o fígado (CARVALHO et al., 1999).

O praziquantel afeta a permeabilidade da membrana celular resultando na contração dos vermes e causando a vacuolização e desintegração do tegumento. Os efeitos secundários são a inibição da captação de glicose, redução dos níveis de glicogênio e estimulação da liberação de lactato. (DRUGBANK, DB01058).

Diversos efeitos colaterais foram relatados com o uso do praziquantel, efeitos estes podem estar ligados à forma clínica da doença (DAYAN, 2003). Os efeitos adversos mais relatados são: febre, calafrios, dores no corpo, cansaço, mal-estar, problemas cardiovasculares, convulsões, cólicas estomacais e constipação (IBM, MICROMEDEX, 2022).

Figura 7: Estrutura química de Praziquantel

Fonte: (Drugs bank, DB01058) Acesso:30/09/2022



Ao longo dos anos, diversos casos de resistência do *S. mansoni* ao praziquantel foram relatados (FALLON et al. 1994; ISMAIL et al. 1996; DOENHOFF et al., 2002). Um dos mecanismos propostos para a resistência do *S. mansoni* ao praziquantel é a indução de proteínas ATP-binding cassette (ABC) envolvidos no transporte de toxinas e xenobióticos que pode sustentar a resistência natural de vermes jovens natural (CUPIT et al., 2015), estes expressam níveis basais maiores, aproximadamente 2,5 vezes do que os dois transcritos de genes transportadores de ABC que codificam Sm MRP1 e SMDR 2 dos vermes adultos (HINES-KAY et al., 2012; KASINATHAN et al., 2012).

A disponibilidade apenas do praziquantel para tratar a esquistossomose, somado ao aparecimento de cepas de *Schistosoma* resistentes coloca em risco o tratamento e sinaliza a necessidade de se buscar novos fármacos para essa parasitose (KUSEL et al., 1999, DOENHOFF et al., 2002, FENWICK et WEBSTER, 2006).

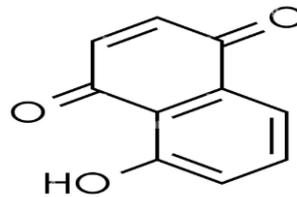
2.5 JUGLONA

Juglona, também quimicamente denominada 5-hidroxi-1,4-naftoquinona (Figura 8) é uma naftoquinona natural encontrada na casca de frutas frescas maduras, raízes, folhas e casca de plantas das espécies *Juglans nigra L.*, *Juglans regia L.*, *Juglans cinerea L.*, *Juglans sieboldiana L.*, pertencentes a família Juglandaceae (STRUGSTAD et al., 2012). Dentre as espécies vegetais, a *J. nigra L.* é a mais utilizada na extração de juglona devido a maior concentração do composto nas suas

partes anatômicas (MARYON et al., 2012). Também pode ser encontrada em *Carya ovata*, Proteaceae, Caesalpinaceae e Fabaceae (AHMAD, 2019).

Figura 8: Estrutura química da Juglona

Fonte: Alamy Stock Vector, 2021. Acesso: 30/09/2022



A juglona apresenta diversas propriedades biológicas descritas na literatura. Tem propriedades anticancerígenas (JI, YU-BIN; QU, ZHONG-YUAN; ZOU, XIANG, 2011), antimicrobianas (KONG et al., 2008), anti-inflamatórias (LANDA et al., 2012) anti-hipertensiva (AHMAD, 2019), sedativa (STRUGSTAD et al., 2012) e demonstra intensas propriedades antioxidantes, como supressão de ROS, quelação de íons metálicos e inibição enzimática (SHUAI. C et al., 2021).

Como anti-inflamatória a juglona reduz a produção de citocinas inflamatórias IL-1 β e IL-18, suprimindo seus níveis de transcrição e tradução bem como clivagem mediada por caspase-1 para suas formas ativas (KIM, NAM-HYUN et al., 2020). Sua propriedade antitumoral é atribuída a sua habilidade de sofrer reações reversíveis de oxidação e redução, podendo induzir morte celular através da formação de radicais livres por meio do radical semiquinona, sendo este responsável pela produção dos ânions superóxidos (JI, YU-BIN, QU, ZHONG-YUAN. ZOU, XIANG, 2011).

A atividade antiparasitária da juglona foi observada contra os protozoários *Toxoplasma gondii* (AKERMAN et MULLER, 2005), *Trypanosoma cruzi*, *T. brucei rhodesiense* e *Leishmania donovani* (ELLENDORF et al., 2015). Além disso, a juglona também mostrou atividade antihelmíntica sobre *Hymenolepis nana* (DAMA, JADHAV, 1997), *Meloidogyne spp.*, nematóide frequente em cultivos de *Arachis hypogaea L.* (amendoim) (DAMA et al., 1999) e vermes adultos de *S. mansoni* (cepa LE) (MAGALHÃES et al., 2014). Também mostrou atividade em ensaios envolvendo moluscos adultos de *Biomphalaria* (SAY, 1818), (RIBEIRO et al., 2009).

Além da juglona, outra naftoquinona, a β -lapachona, foi identificada como um promissor composto esquistossomicida. *In vitro*, levou a mortalidade de 100% dos vermes adultos em 24 horas, além de provocar dano no tegumento, caracterizado por redução de espículos, formação de bolhas, descamação e erosão (AIRES et al., 2014a). *In vivo*, a β -lapachona quando administrada em camundongos albergando diferentes estágios de desenvolvimento do *S. mansoni* (esquistossômulos de pele, esquistossômulos pulmonar, vermes jovens e vermes adultos) reduziu significativamente a carga de vermes e ovos e no tecido hepático reduziu a densidade numérica e o diâmetro médio de granulomas (AIRE et al., 2014b).

São poucas as informações científicas disponíveis sobre associação de medicamentos esquistossomicidas que proporcionam um aumento da eficácia terapêutica em relação à monoterapia. Poucos ensaios clínicos têm avaliado associações de praziquantel com outros compostos esquistossomicidas, como o praziquantel-oxamniquine, praziquantel-artemisinina e praziquantel-mefloquina (CUI L, SU XZ, 2009; UTZINGER J et al, 2013; KEISER, J et al, 2011).

Considerando a atividade esquistossomicida das naftoquinonas é possível considerar a Juglona uma droga atraente a terapia medicamentosa em associação ao Praziquantel. Essa associação pode ser um tratamento alternativo para cepas de *Schistosoma* resistentes ao mesmo tempo em que preserva o efeito farmacológico do praziquantel.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar, in vitro, a atividade esquistossomicida da associação do Praziquantel com Juglona (PZQ/JGN) contra vermes jovens de *Schistosoma mansoni*.

3.2 Objetivos Específicos

- Determinar as concentrações letais médias (LC₅₀) do PZQ e JGN frente a vermes jovens (21 dias) de *Schistosoma mansoni*.
- Determinar as concentrações sinérgicas da associação PZQ/JGN com atividade esquistossomicida sobre vermes jovens de *S. mansoni*.

4 METODOLOGIA

4.1 Considerações éticas

Toda a parte experimental foi iniciada após a devida autorização dada pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal do Centro de Biociências da Universidade Federal de Pernambuco-UFPE, sob o processo de número nº 0062/2020.

4.2 Animais e parasitos

Foram utilizados camundongos fêmeas, *Swiss (Mus musculus)*, pesando 30 - 35g, com 35 dias de idade, fornecidos e mantidos no biotério do laboratório de Imunopatologia Keizo Asami - LIKA, recebendo água e ração *ad libitum*, à temperatura ambiente de 25°C e fotoperíodo de 12 horas de claro e 12 horas de escuro.

Foi utilizada a cepa de *Schistosoma mansoni*, Belo Horizonte – Minas Gerais (BH), mantida no moluscário da Disciplina de Parasitologia, da Área Acadêmica de Medicina Tropical da UFPE através da passagem sucessiva do parasito entre caramujos da espécie *B. glabrata* e caramujo.

4.3 Infecção de caramujos do gênero *Biomphalaria glabrata* com miracídio de *Schistosoma mansoni*.

Fezes de camundongos infectados foram coletadas e tratadas de acordo com a técnica de sedimentação espontânea. Após este procedimento, o sedimento foi exposto à iluminação e a temperatura de 28°C, para eclosão dos miracídios de *S. mansoni*, os quais foram postos em contato com caramujos, permanecendo exposto à luz e ao calor por aproximadamente duas horas. Após infecção, os moluscos foram postos em aquários com água dechlorada e livres de exposição luminosa (STANDEN, 1952).

4.4 Infecção de camundongos *Mus musculus* com cercárias de *S. mansoni*

Os moluscos da espécie *B. glabrata* em meio aquático e sob exposição à luz, têm a capacidade de eliminar cercárias através de seus tecidos moles. Após a obtenção de uma suspensão cercariana, os camundongos previamente anestesiados

com Xilazina e Ketamina, foram infectados por via percutânea com uma fração da suspensão, contendo em média 120 cercárias. Os animais permaneceram em contato com a suspensão cercariana por 30 minutos e sob luminosidade artificial para facilitar a penetração das cercárias. Recuperados do processo anestésico, os animais foram devolvidos para suas respectivas gaiolas.

4.5 Drogas

Praziquantel(2-(cyclohexylcarbonyl)-1,2,3,6,7-11b-hexahydro-4H-pyrazino(2,1a) isoquinolin-4-one) produzido e obtido pela Sigma Aldrich Corporation
Juglona (5-hidroxi-1,4-naftoquinona) produzido e obtido pela Sigma Aldrich Corporation

4.6 Avaliação esquistossomicida da associação Praziquantel/Juglona (PZQ/JGN) sobre vermes jovens de *Schistosoma mansoni*

- **Avaliação da susceptibilidade in vitro dos vermes jovens de *S. mansoni* (cepa BH) frente à Juglona (JGN) e praziquantel (PZQ) e determinação da CL₅₀**

Após 21 dias de infecção, os camundongos foram eutanasiados por deslocamento cervical. Por meio da perfusão do sistema porta hepático e vasos mesentéricos, os vermes jovens foram recuperados e lavados em meio RPMI-1640 acrescido de HEPES 20 mM em pH=7,5 havendo suplementação com penicilina (1000 mL/L), estreptomicina (100µg/mL) e soro bovino fetal a 10%. Em seguida, vermes machos foram transferidos para placas de cultura de tecidos contendo 2 mL de meio. Cada poço recebeu dois pares de vermes (n=8) e em seguida foram incubados a 37°C, em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂.

Após um período de 2 horas de adaptação ao meio, JGN e PZQ foram adicionados ao meio em concentrações entre 3,125 µM - 50 µM para Juglona e entre 12,5 µM - 200 µM para PZQ. Os vermes foram mantidos em cultura por 24 horas e monitorados, utilizando microscópio invertido, nos intervalos de tempos 3h, 6h, 12h e 24 h para avaliação da motilidade, alterações no tegumento e taxa de mortalidade. A morte dos parasitos foi definida como a ausência de movimento durante pelo menos

2 minutos de avaliação contínua (MANNECK *et al.*2010). Todos os experimentos foram realizados em quadruplicada e repetidos pelo menos duas vezes.

4.7 Estudos de combinação de drogas

A atividade esquistossomicida da associação JGN/PZQ frente aos vermes jovens de *S. mansoni* foi determinada a partir da utilização de diferentes concentrações de JGN e PZQ, variando desde a metade da CL₅₀ até uma diluição de $\frac{1}{32}$ CL₅₀ de ambos. A associação JGN/PZQ foi introduzida de modo simultâneo em placas de 24 poços para uma avaliação de 24h nos intervalos de 3h, 6h, 12h e 24h. As placas foram incubadas em estufa a 37°C em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂.

O índice de Combinação (IC) foi calculado usando o software CompuSyn. De acordo com Chou, é considerada uma atividade sinérgica entre as drogas se o IC for menor que 1, atividade aditiva entre as drogas se o IC for igual a 1 e atividade antagônica entre as drogas se o IC for maior que 1 (CHOU, 2010).

5 RESULTADOS

5.1 Avaliação da Susceptibilidade *In Vitro* de Vermes Jovens de *S. mansoni* Frente a Juglona e Praziquantel

A juglona causou mortalidade e interferiu progressivamente na motilidade de vermes jovens de *S. mansoni*. Os efeitos esquistosomicidas observados foram concentração e tempo dependentes.

Utilizou-se como controles negativos vermes jovens cultivados em meio de cultura com DMSO a 1,6%. Os vermes permaneceram com movimentos típicos, exibindo peristaltismo dos órgãos internos, ventosas em movimento, aderindo ao fundo e/ou a lateral da placa de cultura e tegumento íntegro durante todo experimento.

Na tabela 1, são apresentadas a susceptibilidade dos vermes jovens de *Schistosoma mansoni* (cepa BH), controles e tratados com diferentes concentrações de juglona ao longo de 24 horas. Após 3 h, as concentrações de 25 μM e 50 μM tiveram efeito esquistosomicida máximo. No mesmo tempo, a concentração de 12,5 μM reduziu a motilidade dos vermes e induziu mortalidade de 20%, alcançando 90% dos vermes em 24h. Ao final da análise de 24 horas, foram evidenciadas redução de motilidade. A CL_{50} foi determinada em 8,76 μM .

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

Tabela 1- Avaliação in vitro do score de motilidade, em percentagem, de vermes jovens (21 dias) de *Schistosoma mansoni*, expostos a diferentes concentrações de juglona durante 24 horas

Score de motilidade de vermes jovens (21 dias) 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			
Meio																
50 µM				100				100				100				100
25 µM				100				100				100				100
12,5 µM	35	1	30	20	15	1	3	35	10	20	3	35		5	5	90
		5				5	5				5					
6,25 µM	85	1	5		70	1	1		15	20	3	30	10	1	35	45
		0				5	5				5			5		
3,125 µM	100				100				75	15	5		55	2	15	
															0	
CL₅₀ = 8,76 µM																

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

O efeito espástico do PZQ sobre a musculatura do verme foi evidenciado desde as primeiras horas, mantendo o verme imóvel e encurtado com movimentação discreta apenas nas ventosas até 12 h de exposição ao PZQ. A mortalidade de vermes foi registrada com 24 horas de observação, mas não foi alcançado o efeito máximo. Com a maior concentração a mortalidade foi de 88% (Tabela 2). O tegumento dos vermes, ao longo do tempo, apresentou formações bolhosas, algumas intactas e outras nitidamente rompidas, a coloração também apresentou alterações tornando-se escura.

Tabela 2 - Avaliação *in vitro* do score de motilidade, em percentagem, de vermes jovens (21 dias) de *Schistosoma mansoni*, expostos a diferentes concentrações de praziquantel durante 24 horas.

Score de motilidade de vermes jovens (21 dias) de <i>Schistosoma mansoni</i> durante 24h (%)																
Grupos	3h				6h				12h				24h			
PZQ	3	2	1	0	3	2	1	0	3	2	1	0	3	2	1	0
Controle	100				100				100				100			
Meio																
200µM			100				100				100			12	88	
150µM			100				100				100			32	68	
100µM			100				100				100			40	60	
75µM			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		
CL50 = 96,57 µM																

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

5.2 Efeito da combinação PZQ-JGN contra vermes jovens de *Schistosoma mansoni* (cepa BH)

A associação entre concentrações menores que a IC₅₀ de JGN e PZQ demonstrou sinergismo em 23 das 25 combinações frente a vermes jovens de *S. mansoni*.

Os melhores resultados dentre as 25 combinações de diluições da LC₅₀, variando de ½ a 1/32, expressos em percentagem de vermes mortos, Índice de Combinação e Índice de Redução de Dose (DRI) são mostrados na tabela 3. O índice

de combinação (IC) representa quanto sinérgica é a associação. Quando o IC é menor que um ($IC < 1$) indica que a associação é sinérgica. Também é necessário levar em consideração o efeito que a combinação das drogas obteve na determinada proporção, ou seja, uma relação entre a preservação das drogas e o efeito que obtiveram juntas. O DRI representa o grau de redução da concentração de uma droga na associação, uma relação entre a concentração reduzida utilizada na associação e o quanto seria necessário para atingir o mesmo efeito que obteve na combinação, em seu uso isolado.

Levando em consideração o percentual de mortalidade de vermes jovens com valor igual ou superior a 70%, cinco associações JGN-PZQ foram identificadas com IC variando de 0,59 a 0,29 e DRI de 2,35 a 9,75 para a JGN e 3,02 a 11,47 para o PZQ.

O menor IC foi registrado na associação 0,25CL₅₀ de JGN e 0,125CL₅₀ de PZQ com DRI de 4,70 e 11,49, respectivamente.

Tabela 3 - Efeito da associação Juglona e Praziquantel sobre vermes jovens de *S. mansoni* (21 dias) após 24 horas.

Verme Jovens					
Razão Testada		JGN + PZQ*	IC	DRI	
JGN	PZQ	(% de Vermes Mortos)		JGN	PZQ
0.25CL50	0.5CL50	2.19+ 48.28 (76%)	0.50	5.08	3.19
0.5CL50	0.25CL50	4.38+ 24.14 (70%)	0.59	2.35	5.74
0.25CL50	0.25CL50	2.19 + 24.14 (73%)	0.37	4.87	6.04
0.25CL50	0.125CL50	2.19 + 12.07 (70%)	0.29	4.70	11.49
0.125CL50	0.5CL50	1.09 + 48.28 (73%)	0.43	9.75	3.02

*Valores de concentração expressos em μM .

IC = Valor de índice de combinação (menor que 1 indica sinergismo)

6 DISCUSSÃO

O praziquantel é o único fármaco disponível para tratamento da esquistossomose e responsável pelo controle desta parasitose. Apesar disso, das 290,8 milhões de pessoas que necessitaram de tratamento preventivo, apenas 33 % receberam tratamento com PZQ, em 2018 (WHO, 2022). Há, no entanto, uma tendência de que o uso do PZQ aumente, devido às campanhas de administração em massa de medicamentos direcionadas à idade escolar (WHO,2019). Com o aumento da frequência do tratamento, inevitavelmente, elevará a pressão do medicamento e, conseqüentemente, o risco de disseminação da resistência ao PZQ. Até o momento, já foi observada suscetibilidade reduzida de isolados de *S. mansoni* e *S. haematobium* ao PZQ (WANG et al, 2012). Soma-se a este cenário a baixa susceptibilidade dos vermes jovens, não sendo possível tratar os indivíduos no início da infecção, sendo necessária à espera do desenvolvimento completo do verme para seguir com o tratamento; portanto, o PZQ não pode prevenir populações em risco de (re)infecção, sendo isso uma grande lacuna em termos de intervenção terapêutica (KAMEL; BAYAUMY,2017).

Até o momento, nenhuma nova opção terapêutica para tratar a esquistossomose chegou ao mercado. Diante desse fato, em sua programação para eliminar a esquistossomose como problema de saúde pública até 2030, a Organização Mundial da Saúde pede o desenvolvimento de novas intervenções, incluindo alternativas ao PZQ (WHO, 2020).

Os compostos naturais vêm sendo estudados e analisados como uma alternativa terapêutica para o tratamento da esquistossomose. Neste contexto as naftoquinonas tem se destacado. Naftoquinonas são metabólitos secundários produzidos por algas, fungos, plantas e animais com diversas atividades, como: antineoplásica, antimalárica, esquistossomicida, antiviral, anti-inflamatório, anticâncer, leishmanicida, fungicida e bactericida. (THOMSON,1991; SANTANA et al., 1980; BRAGA e SANTANA, 2003; HUSSAIN et al., 2007; AIRES et al., 2014).

A Juglona é uma naftoquinona, extraída de caules, folhas e sementes, das espécies *Juglans nigra L.*, *Juglans regia L.*, *Juglans cinérea L.*, *Juglans sieboldiana*, da

família Juglandaceae. Apresentando diversas atividades biológicas, o extrato de juglona tem sido utilizado para tratar doenças inflamatórias, bacterianas, parasitárias, infecções virais, fungos e micoses. Apesar das inúmeras atividades, o seu mecanismo de ação ainda não foi totalmente esclarecido(AHMAD et al., 2019).

A combinação de fármacos tem sido aplicada na prática clínica com o propósito de obter maior eficácia terapêutica. É muito frequente a associação medicamentosa nas terapias antibacterianas e antivirais (OKDAH et al., 2018). Além disso, a diminuição da dose administrada isoladamente quando aplicada em associação a outro fármaco reduz efeitos adversos, e diminui significativamente o aparecimento de resistência aos fármacos.

Atualmente, vem sendo considerada a possibilidade de combinação de drogas para tratar a esquistossomose. Alguns estudos descrevem associações do PZQ com outras drogas *in vivo* e *in vitro*, como a associação praziquantel/omeprazol *in vitro*, descrito por Almeida e colaboradores (2015), onde obteve bons resultados frente ao *Schistosoma mansoni* (cepa LE). Outro estudo explorou uma promissora associação entre piplartine e epiisopiloturine com o praziquantel, *in vitro*, frente a vermes adultos do *S. mansoni* (cepa BH) (CAMPELO et al., 2017). Há ainda estudos envolvendo drogas antimaláricas, *in vivo* e *in vitro*, como arthemeter e mefloquina em associação com o praziquantel, mostrando potenciais resultados frente a *Schistosoma mansoni* e *Schistosoma japonicum* (BOTROS, 2005; KEISER, et al. 2011; GOUVEIA et al. 2018).

No presente estudo, a juglona, uma naftoquinona com ampla atividade biológica, foi capaz de provocar 100% de mortalidade de vermes jovens de 21 dias, na concentração de 25µM, no período de 24 horas. Esses achados, revelam a eficácia da JGN frente a vermes jovens quando comparado ao PZQ no mesmo intervalo (tabela 1 e 2). Sabe-se que uma das limitações encontrada no tratamento pelo praziquantel é a sua baixa eficácia contra as fases jovens das espécies de *Schistosoma* (KAMEL e BAYAUMY, 2017). Isso permite que os vermes atinjam a sua maturidade sexual e se acasalem, dando início ao processo de oviposição resultando na reação inflamatória, a qual é responsável pela morbidade e mortalidade na esquistossomose. Quando combinada ao PZQ a juglona foi capaz de promover atividade sinérgica sobre vermes jovens de *S. mansoni*, apresentando IC com

concentrações equivalentes a 0,25CL₅₀ de JGN e 0,125CL₅₀ de PZQ com DRI de 4,70 de Juglona e 11,49 de PZQ.

Podemos sugerir que o efeito sinérgico da associação juglona/praziquantel seja compartilhado pelos efeitos farmacológicos de cada um dos compostos isoladamente.

O mecanismo de ação do praziquantel deve-se provavelmente à inibição da bomba Na⁺, K⁺ presente no tegumento dos vermes adultos de *Schistosoma*, aumentando a permeabilidade da membrana do helminto a certos cátions monovalentes e divalentes, principalmente o cálcio que leva à intensificação da atividade muscular, seguida por contração e paralisia espástica. Como consequência, os vermes se separam dos tecidos do hospedeiro e são rapidamente deslocados das veias mesentéricas para o fígado (CARVALHO et al., 1999), porém mesmo apresentando canais de cálcio em suas células, a fase jovem de *Schistosoma mansoni* é a menos sensível à droga.

Por outro lado, a juglona e outras naftoquinonas são capazes de gerar espécies reativas de oxigênio (HAO et al., 2012, EL HADRAMI et al., 2005, SESHADRI et al., 2011). *S. mansoni* apresenta apenas uma enzima é responsável pelo controle do estresse oxidativo, a Glutathione Tiorredoxina redutase de *Schistosoma mansoni* (SmTGR) (LYU et al., 2020). Acredita-se que a SmTGR é multifuncional e desempenha o papel de glutathione redutase e Tiorredoxina redutase, que estão presentes em eucariotos (ALGER e WILLIAMS, 2002). Estudos *in vitro* que induziram a supressão de RNA da SmTGR levaram a morte de vermes adultos de *S. mansoni* (KUNTZ et al., 2007). Além disso, o uso de compostos capazes de inibir TRG, como é o caso de auranofina, tártarato de potássio, antimolínico e oltipraz, resultou em morte em 100% de *S. mansoni* (SAYED et al., 2008; PRAST-NIELSEN; HUANG; WILLIAMS, 2011; WILLIAMS et al., 2012). Tais achados demonstram que a SmTGR é crucial na sobrevivência do parasito, mostrando-se como um alvo terapêutico em potencial.

Os compostos 1,4-naftoquinônicos são considerados potenciais inibidores de SmTGR em vermes adultos de *S. mansoni*. Johann e colaboradores (2015) identificaramos diferentes compostos 1,4-naftoquinônicos que agiram como antagonistas competitivos ou bloqueadores de SmTGR. Nesse mesmo estudo, o

composto juglona obteve destaque por apresentar um mecanismo de ação diferente dos demais, visto que foi a molécula que menos sofreu alterações na presença do selênio, que compete pelo sítio ativo da enzima. Esses resultados podem nortear o meio que a juglona mata os diferentes estágios evolutivos de *S. mansoni* (LANFRANCHI et al., 2012; JOHANN et al., 2015).

7 CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos pode-se concluir que a juglona apresenta atividade esquistossomicida frente a vermes jovens de *Schistosoma mansoni* (cepa BH), apresentando CL_{50} de 19,01 μM , em contraste com o PZQ que apresentou uma IC_{50} de 96,57 μM .

A juglona em associação ao praziquantel mostrou sinergismo com taxa de mortalidade igual ou superior a 70% em cinco combinações e com baixo índice de combinação.

Com isso, o uso de fármacos associados ao praziquantel norteia novas possibilidades para o tratamento da esquistossomose usando pequenas doses individuais de drogas combinadas. Concomitantemente, proporciona, redução dos efeitos adversos, potencialização terapêutica e eliminação das chances de surgimento de cepas resistentes ao PZQ, bem como aos futuros quimioterápicos.

REFERÊNCIA

AHMAD, T and SUZUKI, Y. "Juglone in oxidative stress and cell signaling." *Antioxidants* 8.4 (2019): 91.

AHMAD, T.; KHAN, T.; SHAH, A. J. Juglone as antihypertensive agent acts through multiple vascular mechanisms. *Clinical and Experimental Hypertension*, v. 42, n. 4, p.1–10, 2019.

AIRES A. L.; et al. β -Lapachone: A naphthoquinone with promising antischistosomal properties in mice. *Phytomedicine*. v. 21, p. 261-267, 2014b.

AIRES, A.L.; XIMENES, E.C.P.A.; SILVA, R.A.R.; BARBOSA, V.X.; GÓES, A.J.S.; PEIXOTO, C.A.; SOUZA, V.M.O.; ALBUQUERQUE, M.C.P.A. Ultrastructural analysis of b-lapachone-induced surface membrane damage in male adult *Schistosoma mansoni* BH strain worms. *Experimental Parasitology* 142 (2014) 83–90 (B).

AKERMAN, S. E., & MULLER, S. Peroxiredoxin-linked detoxification of hydroperoxides in *Toxoplasma gondii*. *Journal of Biological Chemistry*, 280(1), 564-570, 2005.

ALGER, H. M.; WILLIAMS, L. The disulfide redox system of *Schistosoma mansoni* and the importance of a multifunctional enzyme, thioredoxin glutathione. *Molecular & Biochemical Parasitology*, v. 121, p. 129–139, 2002.

ALMEIDA , SOUZA ALR, ALLEGRETI SM, FREZZA TF, PINTO MC, FERREIRA AG, CHUNG MC. Síntese e atividade biológica do derivado 6-formil-oxamniquina. *Rev Bras Ciênc Farm*. 2008; 44(4):749-54.

ALMEIDA, G. T. et al. Synergy of Omeprazole and Praziquantel In Vitro Treatment against *Schistosoma mansoni* Adult Worms. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 9, n. 9, p. 1–23, 2015.

ARAÚJO NP, SOUZA SP, PASSOS LKJ, SIMPSON AJG, DIAS NETO E, PEREIRA TR, CERUTTI JRC, ALENCAR FEC, DIETZE R, KATZ N. Suscetibilidade aos agentes quimioterápicos de isolados de *Schistosoma mansoni* oriundos de pacientes tratados com oxamniquina e praziquantel e não curados. *Rev Soc Bras Med Trop*, 1996; 29: 467 – 76.

BARBOSA, C. S. et al. Epidemia de esquistossomose aguda na praia de Porto de Galinhas, Pernambuco, Brasil. *Cadernos de Saúde Pública*, Rio de Janeiro, v. 17, n. 3, p. 725–728, 2001.

BARBOSA, C. S.; PIERI, O. S.; SILVA, C. B. & BARBOSA, F. S., Ecoepidemiologia da esquistossomose urbana na ilha de Itamaracá, Pernambuco. *Revista de Saúde Pública* 34: 337-34, 2000.

BARBOSA, C. S.; LEAL-NETO, O. B.; GOMES, E. C.; ARAÚJO, K. C.; DOMINGUES, A.L.. The endemisation of schistosomiasis in Porto de Galinhas, Pernambuco, Brazil, 10 years after the first epidemic outbreak. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. v. 106, n. 7, p. 878-883, 2011.

BONESSO-SABADINI PIP, DIAS LCS. Altered response of *Schistosoma mansoni* to oxamniquine and praziquantel. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 2002; 97 (3): 381 – 5.

BOROS, D. L. Immunopathology of *Schistosoma mansoni* infection. *Clin. Microbiol. Rev.*, v. 2, n. 3, p. 250-269, 1989.

BOTROS S, SAYED H , AMER N , EL-GHANNAM M , BENNETT JL , DAY T.A. Current status of sensitivity to praziquantel in a focus of potential drug resistance in Egypt . *Int J Parasitol* 35: 787 – 791, 2005.

BOYLE, J. P. et al. Using RNA interference to manipulate endogenous gene expression in *Schistosoma mansoni* sporocysts. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 128: 205-215, 2003.

BRAGA, R.M.C. e Santana et al., D.P. 2003- Lapachol - química, farmacologia e métodos de dosagem. Revista Brasileira de Farmácia, v 84, n. 1, p. 9-16.

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

BRASIL, Ministério da Saúde. Esquistossomose: causas, sintomas, tratamento, diagnóstico e prevenção. Ministério da Saúde, 2019. Disponível em: <http://portalms.saude.gov.br/saude-de-a-z/esquistossomose>. Acesso em: 15/09/22

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

BRASIL. Ministério da Saúde. Doenças Tropicais negligenciadas. Boletim epidemiológico, 30 de janeiro – Dia mundial de combate às Doenças tropicais negligenciadas. Brasília, março, 2021. Disponível em: >https://www.gov.br/saude/pt-br/centraisdeconteudo/publicacoes/boletins/epidemiologicos/especiais/2021/boletim_especial_doencas_negligenciadas.pdf

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

CAMPELO, YURI DIAS MACEDO et al. Synergistic effects of in vitro combinations of pipartine, epiisopiloturine and praziquantel against *Schistosoma mansoni*.

Biomedicine & Pharmacotherapy, v. 88, p. 488-499, 2017.

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

CARVALHO, OS., COELHO, PMZ., and LENZI, HL., orgs. Schistosoma mansoni e esquistossomose: uma visão multidisciplinar [online]. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2008, pp. 964-1008. ISBN 978-85-7541- 370-8. Available from SciELO Books.

CHEN, S., Wu, X., & Yu, Z. Juglone Suppresses Inflammation and Oxidative Stress in Colitis Mice. *Frontiers in immunology*, 12, 2021.

CIOLI, D., PICA-MATTOCCIA, L., BASSO, A., & GUIDI, A. Schistosomiasis control: praziquantel forever? *Molecular and biochemical parasitology*, 195(1), 23-29, 2014
COELHO et al. Resistance to Oxamniquine of a Schistosoma mansoni Strain isolated from patient submitted to repeated treatments. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo* 39 (2) • Mar 1997.

COUTO, FFB, COELHO, PMZ, ARAÚJO N, KATZ N, KUSEL, JR, JANOTTI-PASSOS, LK, MATTOS, ACA. Schistosoma mansoni: a method for inducing resistance to praziquantel using infected Biomphalaria glabrata snails. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 2011; 106 (2): 153-7.

CUI L, SU XZ. Discovery, mechanisms of action and combination therapy of artemisinin. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2009; 7: 999–1013.

CUPIT, et al,. What is the mechanism of action of praziquantel and how might resistance strike? *Future medicinal chemistry*, 7.6: 701-705, 2015.

DA SILVA, V. B. R., CAMPOS, B. R. K. L., DE OLIVEIRA, J. F., DECOUT, J. L., DE LIMA, M. D. C. A. Medicinal chemistry of antischistosomal drugs: Praziquantel and

oxamniquine. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 25(13), 3259-3277, 2017.

DAMA L.B. AND JADHAV B.V. Anthelmintic effect of Juglone on mature and Immature *Hymenolepis nana* in mice. *Rivista di Parassitologia*, n. 2, p. 301–302, 1997.

DAYAN A. D. Albendazole, mebendazole and praziquantel. Review of non-clinical toxicity and pharmacokinetics. *Acta Tropica*, 2003; 86(2-3):141-59. *Diseases*, v. 6, n. 3, p. 393–405, 2020.

DOENHOFF, M. J.; KUSEL, J. R.; COLES, G. C.; CIOLI, D. Resistance of *Schistosoma mansoni* to praziquantel: is there a problem? *Trans R. Soc. Trop. Méd.*, v. 96, p. 465-469, 2002.

DRUGBANK. Praziquantel. Drug created at June 13, 2005 13. Disponível em: [`https://go.drugbank.com/drugs/DB01058`](https://go.drugbank.com/drugs/DB01058). Acesso em 28/09/2022.

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

EL HADRAMI, A., KONE, D., & LEPOIVRE, P. Effect of juglone on active oxygen species and antioxidant enzymes in susceptible and partially resistant banana cultivars to Black Leaf Streak Disease. *European Journal of Plant Pathology*, 113(3), 241-254, 2005.

ELLENDORFF T, BRUN R, KAISER M, SENDKER J and SCHMIDT T.J. (2015). PLS-Prediction and Confirmation of Hydrojuglone Glucoside as the Antitrypanosomal Constituent of *Juglans* Spp. *Molecules*, 20(6), 10082-10094.

EMANUEL, A. PRATA, E. Comparação entre praziquantel e oxamniquine no tratamento da esquistossomose mansoni. Rev. Soc. Bras. Med Trop. 16(2). Jun 1983.

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

FENWICK, ALAN; WEBSTER, Joanne P. Schistosomiasis: challenges for control, treatment and drug resistance. Current opinion in infectious diseases, v. 19, n. 6, p. 577-582, 2006.

FOSTER R, CHEETHAM BL. Studies with the schistosomicide oxamniquina (UK4271). I. Activity in rodents and in vitro. Trans R Soc Trop Med Hyg 67:674-84, 1973.

FOSTER R. The preclinical development of oxamniquina. Rev Inst Med Trop São Paulo 15 (suppl 1):1-9, 1973.

FREESE, E, et al. Evolution of schistosomiasis endemicity in the Zona da Mata de Sul, Pernambuco State, Brazil. Epidemiology and current situation: under control or out of control? Cad. Saúde Pública 14(4). Out 1998.

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

GONNERT R, ANDREWS, P (1977). Praziquantel, a new broad-spectrum antischistosomal agent. Z Parasitenkd 52:129–150.

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

GRYSEELS, B. et al. Human schistosomiasis. Lancet, v. 368, p. 1106-1108, 2006.

- HAAS, W. et al. Finding and recognition of the anail intermediate hosts by 3 species of echinostome cercariae. *Parasitology*, v. 110, p. 133-142, 1995.
- HAO, M. I. A. O., GING-YING, C. A. O., QING-HUA, S. H. A. N. G., & YUAN-YING, J. I. A. N. G. Antimicrobial activities of naphthoquinone derivatives extracted from plants. *30(5)*, 334-335, 2012.
- HINES-KAY, J. et al. Transcriptional analysis of *Schistosoma mansoni* treated with praziquantel in vitro. *Mol. Biochem. Parasitol.* 186, 87–94 ,2012.
- HOTEZ, P. J. et al. Advancing the Development of a Human Schistosomiasis Vaccine. *Trends in Parasitology*, v. 35, n. 2, p. 12–16, 2019.
- HUSSAIN, H.; KROHN, K.; AHMAD, V.U.; MIANA, G.A. e Green, I.R. Lapachol: an overview. *Arkivoc*, v.(ii), p. 145-171, 2007. ISMAIL, M.; METWALLY, A.; FARGHALY, A.; BRUCE, J.; TAO, L.F.; BENNETT, J.L. Characterization of isolates of *Schistosoma mansoni* from Egyptian villagers that tolerate high doses of praziquantel. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 1996, 55,214–218.
- ISMAIL, MAGDI M. et al. Laboratory induced resistance to praziquantel in experimental schistosomiasis. *Journal of the Egyptian Society of Parasitology*, v. 24, n. 3, p. 685-695, 1994.
- JI, YU-BIN; QU, ZHONG-YUAN; ZOU, XIANG (2011). "Juglone-induced apoptosis in human gastric cancer SGC-7901 cells via the mitochondrial pathway". *Experimental and Toxicologic Pathology*. 63 (1–2): 69–78.
- JOHANN, L. et al. Synthesis and evaluation of 1, 4 – naphthoquinone ether derivatives *Journal of Tropical Diseases*, v. 2, n. 4, 2014.
- Juglone: A Literature Review. *Journal of Ecosystems and Management*, v.13, n. 3, p.1-16, Vol.12, No 13 (2012).

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

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

KATZ, N. Inquérito Nacional de Prevalência da Esquistossomose mansoni e Geohelminthoses/Naftale Katz. – Belo Horizonte: CPqRR, 2018. CDD – 22. ed. – 614.5

KATZ, Naftale; ALMEIDA, Karina. Esquistossomose, xistosa, barriga d'água. *Cienc. Cult.*, São Paulo , v. 55, n. 1, p. 38-43, Jan. 2003.

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.

KEISER, J.; MANNECK, T.; VARGAS, M. Interactions of mefloquine with praziquantel in the *Schistosoma mansoni* mouse model and in vitro. *J. Antimicrob. Chemother.*, 2011, 66,1791-1797.1994.

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

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

KUSEL, J., & HAGAN, P. Praziquantel—its use, cost and possible development of resistance. *Parasitology Today*, 15(9), 352-354, 1999.

LANDA, P. et al. Redox and Non-Redox Mechanism of In Vitro Cyclooxygenase Inhibition by Natural Quinones. *Planta Med*, v. 78, p. 326–333, 2012.

LANFRANCHI, D. A. et al. Synthesis and Biological Evaluation of 1,4-Naphthoquinones and Quinoline-5,8-diones as Antimalarial and Schistosomicidal Agents. *Organic & Biomolecular Chemistry*, v. 10, n. 31, p. 6375–6487, 2012.

LIMA L. S., Barbosa L. C. A., de ALVARENGA E. S., DEMUNER A. J., and da Silva A. A. Synthesis and phytotoxicity evaluation of substituted para-benzoquinones. *Aust. J. Chem.* 56, 625–630, 2003.

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

LYU, H. et al. Characterization of lead compounds targeting the selenoprotein thioredoxin glutathione reductase for treatment of schistosomiasis. *Infectious Diseases*, v. 6, n. 3, p. 393–405, 2020.

MAGALHÃES, L. G. et al. Journal of Tropical Diseases Chemoprevention of Schistosomiasis : In vitro Antiparasitic Activity of Nineteen Plant-derived and Synthetic Simple Naphthoquinones and Naphthols against *Schistosoma Mansoni* Adult Worms. *Journal of Tropical Diseases*, v. 2, n. 4, 2014.

MARTIN L. NELWAN, PhD. Schistosomiasis: Life Cycle, Diagnosis, and Control. *Current Therapeutic Clin Exp.* 2019; 91: 5–9.

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

MASSARA, CRISTIANO LARA et al. Aceitação entre estudantes do ensino básico do desenho animado OX na Xistose para construção de conhecimentos sobre esquistossomose. *Revista Eletrônica de Comunicação, Informação e Inovação em Saúde*, v. 15, n. 1, 2021.

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

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

MICROMEDEX, Micromedex, Truven Health Analytics, 2022.

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

NEGHINA, R., A.M., MERKLER, C., MARINCU, I., MOLDOVAN, R., JACOBICIU, I., 2009. Intestinal schistosomiasis, importation of a neglected tropical disease in Romania: case report of a traveler to endemic regions. Travel Medicine and Infectious Disease 7,49–51.

NEVES, D. P. Parasitologia Humana. 13a 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, 2011b.

NOVAES MRCG, Souza JP, Araújo HC. Síntese do antihelmíntico praziquantel, a partir da glicina. Quím Nova 1999;22(1):5-10.

NOVAES, CARVALHO MARIA RITA, CARVALHO GARBI; SOUZA, JOÃO PEDRO DE; ARAÚJO, HUGO CLEMENTE. Síntese do anti-helmíntico praziquantel, a partir da

glicina. *Química Nova*, 1999, 22: 05-10.

OKDAH, LILIANE et al.,. New therapy from old drugs: synergistic bactericidal activity of sulfadiazine with colistin against colistin-resistant bacteria, including plasmid-mediated colistin-resistant mcr-1 isolates. *International journal of antimicrobial agents*, v. 51, n. 5, p. 775-783, 2018.

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

PAIVA, S.R.; FIGUEIREDO, M.R.; KAPLAN, M.A.C. Atividade Biológica de Naftoquinonas de Espécies de Bignoniaceae. *Revista Fitos*. 2012, Vol. 7.enantiomer). *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, n. 69, p. 863–870, 2014.

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

PORDEUS, L. C.; AGUIAR, L. R.; QUININO, L. R. M.; BARBOSA, C. S. A ocorrência das formas aguda e crônica da esquistossomose mansônica no Brasil no período de 1997 a 2006: uma revisão de literatura. *Epidemiol. Serv. Saúde*. Sep.; Vol.17, n..3, p.163-175, 2008. Disponível em: <http://scielo.iec.gov.br/pdf/ess/v17n3/v17n3a02.pdf>.

PORDEUS, L. Cavalcanti et al. A ocorrência das formas aguda e crônica da esquistossomose mansônica no Brasil no período de 1997 a 2006: uma revisão de literatura. *Epidemiologia e Serviços de Saúde*, v. 17, n. 3, p. 163-175, 2008.

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.

PRATA, AR., and COURA, JR. Fases e formas clínicas da Esquistossomose mansoni. In: CARVALHO, OS., COELHO, PMZ., and LENZI, HL., orgs. Schistosoma mansoni e esquistossomose: uma visão multidisciplinar [online]. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2008, pp. 739-787. ISBN 978- 85-7541-370-8.

RIBEIRO, KARLOS AL 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, n. 1, p. 44-50, 2009.

RICHARDS HC, FOSTER R 1969. A new series of 2-aminomethyltetrahydroquinoline derivatives displaying schistosomicidal activity in rodents and primates. *Nature* 222:581-582.

ROCHA, T, Aspectos epidemiológicos e distribuição dos casos de infecção pelo *Schistosoma mansoni* em municípios do Estado de Alagoas, Brasil. *Rev Pan-Amaz Saude* 2016; 7(2):27-32.

SALOMÃO, KELLY et al. Trypanosoma cruzi mitochondrial swelling and membrane potential collapse as primary evidence of the mode of action of naphthoquinone analogues. *BMC microbiology*, v. 13, n. 1, p. 1-13, 2013.

SANTANA, C.F.; LINS, L.J.P.; ASFORA, J. J.; MELO, A.M.; LIMA, O.G, e d'ALBUQUERQUE. I.L. 1980/1. Primeiras observações com emprego de lapachol em pacientes humanos portadores de neoplasias malignas. *Revista do Instituto de Antibióticos*, v.20, p. 61, 1980/1.

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. (2011). Plumbagin and juglone induce

caspase-3-dependent apoptosis involving the mitochondria through ROS generation in human peripheral blood lymphocytes. *Free Radical Biology and Medicine*, 51(11), 2090-2107. SILVA, A.M.P.;

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

SOBRINHO, FERNANDA STEFANNY LIMA et al. Incidência de Esquistossomose Mansônica no Nordeste brasileiro, no período de 2013 a 2017. *Diversitas Journal*, v. 5, n. 4, p. 2881-2889, 2020.

SOUZA, FELIPE PEREIRA CARLOS et al. Esquistossomose mansônica: aspectos gerais, imunologia, patogênese e história natural. *Rev Bras Clin Med*, v. 9, n. 4, p. 300-7, 2011.

STELMA FF, et al. Efficacy and side effects of praziquantel in an epidemic focus of *Schistosoma mansoni*. *Am J Trop Med Hyg* 1995; 53 (2): 167-70.

STRUGSTAD, MARYON; DESPOTOVSKI, SASKO. A summary of extraction, synthesis, properties, and potential uses of juglone: A literature review. *Journal of Ecosystems and Management*, v. 13, n. 3, 2012.

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

THOMSON, R.H. - Distribution of naturally occurring quinones. *Pharmaceutisch Weekblad Scientific edition*, v.3, n. 2, p. 70-73, 1991.

THOMSON, R.H. *Naturally occurring quinones*. 2nd Ed., Academic Press, New York, 1971.

UTZINGER, J., KEISER, J., SHUHUA, X., TANNER, M., & SINGER, B. H. Combination chemotherapy of schistosomiasis in laboratory studies and clinical trials. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 47(5), 1487-1495, 2003.

VITORINO, R et al. Esquistossomose mansônica: diagnóstico, tratamento, epidemiologia, profilaxia e controle. *Rev Bras Clin Med. São Paulo*, 2012 jan-fev;10(1):39-45.

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

WHO Weekly epidemiological record, 13 December 2019, 94th year, No 50, 2019, 94, pp 601–612.

WHO. Ending the neglect to attain the sustainable Development Goals-A Road map for neglected tropical diseases 2021-2030. Geneva, 2020. Disponível em: <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/schistosomiasis>> acesso em 04 de novembro de 2022.

WHO. Schistosomiasis, 2019. Disponível em: <https://www.who.int/schistosomiasis/disease/en/>>. Acesso em: 25/09/2022

WHO. Report of the WHO informal consultation on schistosomiasis in low transmission areas control strategies and criteria for elimination. London 10-13 april 2000. WHO Document WHO/CDS/CPE/SIP/2001.1. Geneva, Switzerland. 2001

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

ANEXOS



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

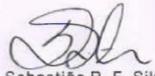
Ofício nº 14/21

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 esquistossomicida 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	<input type="checkbox"/> Ensino <input checked="" type="checkbox"/> Pesquisa Científica
Vigência da autorização	15 de janeiro de 2021 a 28 de fevereiro de 2022
Espécie/linhagem/raça	Camundongos Mus musculus, 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

Atenciosamente



Prof. Sebastião R. F. Silva
 Presidente CEUA/UFPE
 SIAPE 2345691