

AVALIAÇÃO TERAPÊUTICA DO PRAZIQUANTEL E DA QUERCETINA EM VERMES ADULTOS *S.MANSONI* EM EXPERIMENTAÇÃO *IN VITRO*

Data de submissão: 08/03/2023

Data de aceite: 03/04/2023

Keylla Walesca da Silva Santiago

Oswaldo Cruz Foundation – Aggeu Magalhães Institute / IAM-PE, Brazil
University of Pernambuco – UPE, Institute of Biological Sciences – University of Pernambuco – ICB/UPE, Brazil
<http://lattes.cnpq.br/3085176934451590>

Rubens Emanuel Tavares da Rocha

Oswaldo Cruz Foundation – Aggeu Magalhães Institute / IAM-PE, Brazil
<http://lattes.cnpq.br/0743864235096379>

Gabriel Gazzoni Araújo Gonçalves

University of Federal of Pernambuco – UFPE, Brazil
<http://lattes.cnpq.br/1891690680840129>

Hallysson Douglas Andrade de Araújo

University of Federal of Pernambuco – UFPE, Brazil
<http://lattes.cnpq.br/1006353889898512>

Juliana Carla Serafim da Silva

University of Pernambuco – UPE, Institute of Biological Sciences – University of Pernambuco – ICB/UPE, Brazil
<http://lattes.cnpq.br/5224553521824035>

Carlos Ralph Batista Lins

Oswaldo Cruz Foundation – Aggeu Magalhães Institute / IAM-PE, Brazil
<http://lattes.cnpq.br/9093726620207386>

Beatriz Machado Silva

Oswaldo Cruz Foundation – Aggeu Magalhães Institute / IAM-PE, Brazil

Rhaíssa Evelyn Moraes Ramos

Oswaldo Cruz Foundation – Aggeu Magalhães Institute / IAM-PE, Brazil
<http://lattes.cnpq.br/8779806332972683>

Luiz Carlos Alves

University of Federal of Pernambuco – UFPE, Brazil
<http://lattes.cnpq.br/4951638470777523>

Fábio André Brayner dos Santos

University of Federal of Pernambuco – UFPE, Brazil
<http://lattes.cnpq.br/7464633588638483>

Bruno de Melo Carvalho

University of Pernambuco – UPE, Institute of Biological Sciences – University of Pernambuco – ICB/UPE, Brazil
<http://lattes.cnpq.br/6293444890871058>

Fábio Lopes de Melo

Oswaldo Cruz Foundation – Aggeu Magalhães Institute / IAM-PE, Brazil
<http://lattes.cnpq.br/8455111843250834>

RESUMO: Introdução: A esquistossomose é uma doença infectoparasitária causada

por vermes do gênero *Schistosoma*. No Brasil, sua maior endemicidade está no estado de Pernambuco. Atualmente, o tratamento é realizado com Praziquantel (PZQ), também único medicamento de escolha. Contudo, como as cepas resistentes ao PZQ têm um desenvolvimento expansivo, o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas é extremamente importante. A quercetina (QUER) é um flavonoide amplamente distribuído na natureza que proporciona ao organismo diversos benefícios, como: potente antioxidante, anti inflamatório, imunomodulador, gastro e hepatoprotetor. Este estudo objetiva avaliar os efeitos terapêuticos do PZQ e da QUER isolados e/ou associados na esquistossomose em modelos experimentais *in vitro*. **Metodologia:** Foram utilizados 20 camundongos *Swiss* machos provenientes do Biotério da Instituição Aggeu Magalhães, 28 dias, acondicionados sob ciclo controlado (12h claro/12h escuro) sob dieta e água *ad libitum*. Os animais foram infectados por 125 cercárias/mL (por indivíduo) de *S. mansoni* da cepa LE provenientes do Serviço de Referência em Esquistossomose do IAM. Os vermes adultos foram removidos através da perfusão cardíaca, após 45 dias, seguidamente mantidos sob meio RPMI 1640 suplementado com antibióticos. Posteriormente, as placas foram incubadas a 37°C, durante 2h em estufa a 5% de CO₂ para adaptação, sendo monitoradas a cada 24h e observadas no microscópio óptico invertido. Os grupos foram distribuídos em: I) DMSO (controle negativo; 0,5 µg/mL); II) PZQ (controle positivo; 0,5 µg/mL); III) QUER (15µg/mL); IV) PZQ+QUER (0,5 µg/mL +15 µg/mL), foram testadas diferentes concentrações totalizando o volume final de 2mL. Este trabalho foi avaliado e aprovado pela CEUA /IAM, sob protocolo n° 159/2020. **Resultados:** Os grupos III e IV apresentaram 100% de mortalidade dos vermes em 24h; ausência total da atividade motora (score 0) e danos tegumentares acentuados. **Conclusão:** A quercetina mostrou atividade esquistossomicida promissora presente contra vermes adultos de *S.mansoni*, devido à sua ação direta no patógeno isoladamente e/ou associado ao praziquantel.

PALAVRAS – CHAVE: Quercetina. Praziquantel. *Schistosoma mansoni*. Compostos polifenólicos. Biologia Molecular.

THERAPEUTIC EVALUATION OF PRAZICUANTEL AND QUERCETIN IN ADULTS WORMS *S.MANSONI* IN VITRO EXPERIMENTATION

ABSTRACT: Introduction: Schistosomiasis is a parasitoinfectious disease caused by worm of genre *Schistosoma*. In Brazil, schistosomiasis is in greater endemicity in the state of Pernambuco. Currently, Praziquantel (PZQ) is used to treatment also the only drug of choice. However, as PZQ-resistant strains have expansive development, the development of new therapeutics approaches is extremely important. The quercetin (QUER) is a flavonoid widely distributed in nature that provides the body with several benefits, even as: potent antioxidant, anti-inflammatory, immunomodulator, gastro and hepatoprotective. This study aims to evaluated the therapeutics effects by PZQ and QUER isolated or associated in schistosomiasis in experimentals models *in vitro*. **Methodology:** Twenty male *Swiss* mice from Bioterium of the Aggeu Magalhães Institution (IAM) were used, 28 days old, conditioned under a controlled cycle (12h light/12h dark) and maintained under diet and water *ad libitum*. The animals were infected by 125 cercariae/mL (per individual) of *S. mansoni* strain LE from the IAM Schistosomiasis Reference Service. Adults worms specimens were removed by

cardiac perfusion, after 45 days, then maintained under RPMI 1640 medium supplemented with antibiotics. Then, the plates were incubated at 37°C for 2h in an oven at 5% CO₂ for adaptation, being monitored every 24h and observed under an inverted optical microscope. Groups were distributed in: I) DMSO (negative control; 0,5 µg/mL); II) PZQ (positive control; 0,5 µg/mL); III) QUER (15µg/mL); IV) PZQ+QUER (0,5 µg/mL + 15 µg/mL), different concentrations were tested totaling the final volume of 2mL. This work was evaluated and approved by the CEUA/IAM, under protocol n° 159/2020. **Results:** Groups III and IV showed 100% mortality of adults worms within 24h; total absence of movement and severe tegumentary damage. **Conclusion:** Quercetin shown to be the most promising schistosomicidal activity present against *S. mansoni* in adults worms. because showed direct action on the pathogen whether isolated and/or associated with praziquantel.

KEYWORDS: Quercetin; Praziquantel; *Schistosoma mansoni*; Poliphenolic compounds. Biologia Molecular.

1 | INTRODUÇÃO

A esquistossomose é uma doença infectoparasitária causada por trematódeos do gênero *Schistosoma*, de ocorrência endêmica em diversos países nas regiões tropicais e subtropicais do planeta (SILVA; CHIEFFI; CARRILHO, 2005). De acordo com a Organização Mundial da Saúde, estima-se que cerca de 240 milhões de pessoas estão infectadas e aproximadamente 120 milhões sofram com algum tipo de morbidade clínica associada, caracterizando um importante problema de saúde pública (OMS, 2017).

No Brasil, cerca de 1,5 milhões de pessoas vivem em regiões endêmicas nas quais as regiões Sudeste e Nordeste são as mais acometidas, sendo assim, da região Nordeste o estado de Pernambuco apresenta o maior nível de endemicidade do país, no qual dos 186 municípios existentes, foram registrados casos em 102 destes, com a maioria localizado nas regiões da Zona da Mata e Litoral (BRASIL, 2014). Contudo, novas áreas de transmissão foram encontradas em regiões próximas ao litoral e na Região Metropolitana do Recife, sugerindo que a doença se encontra em ativa expansão estando os indivíduos infectados por uma das diferentes espécies de *Schistosoma* sp. (BARBOSA et al., 2015).

Atualmente, o Praziquantel é o único medicamento administrado no tratamento da esquistossomose, este surgiu a mais de quatro décadas, no entanto, ele não age em todas as formas evolutivas do patógeno e não previne reinfecções, logo já existem evidências na literatura do aparecimento de cepas resistentes em consequência de sua utilização em larga escala nos programas de controle da esquistossomose (DOENHOFF; CIOLI; UTZINGER, 2008; GREENBERG, 2013). Fatores esses que, aliados à dificuldade do tratamento em crianças e adultos com problemas de deglutição, evidenciam a necessidade urgente da descoberta de novos compostos para o tratamento da esquistossomose (SILVA, et al. 2021; KOKALIARIS, et al., 2022). Muitos são os estudos com esta finalidade, nos quais se testam novos compostos naturais (CARLOTO, ACM et al., 2019; SHARMA, S et al., 2007;

MAHMOUD, MR.; EL-ABHAR, HS; SALEH, S, 2002; DE MELO et al., NI 2011) e associação de medicamentos (BOTROS, S, BENNET, JL, 2007; SILVA et al., 2021). Entretanto, até o presente momento, não foi encontrado um medicamento capaz de substituir o praziquantel no tratamento da esquistossomose.

A quercetina é um flavonóide quimicamente denominado 3,5,7,3'-4' pentahidroxiflavona, de fórmula molecular $C_{15}H_{10}O_7$. Apresenta-se na coloração amarelo-ouro, cuja densidade é de 1,8 g/cm³. Possui característica pungente e odor aromático, semelhante ao orégano, bem como pouca solubilidade em água. Comumente encontrado em maçãs, cebolas e alcaparras, apresenta atividades importantes como: potente antioxidante, anti-hipertensiva, anti-inflamatória, antimicrobiana e antiprotozoária, além de ação anti-helmíntica (CARLOTO, ACM et al., 2019). Em adição, a quercetina foi identificada como inibidor seletivo da enzima catabolizante de nicotinamida adenina dinucleotídeo oxidada (NAD⁺) de *S. mansoni* (SmNACE), localizada no tegumento do parasito adulto e presumivelmente envolvida na sua sobrevivência pela evasão do sistema imunológico do hospedeiro (CUNHA, NL et al., 2012). Ademais, Kuhn, I (2010) observou que esse mecanismo vem sendo atribuído à dois processos principais: a indução de apoptose de subpopulações de linfócitos T naive induzidas por NAD⁺, e a formação de ADP-ribose cíclico, um mensageiro de mobilização de Ca²⁺ produzido pelo NAD⁺ que está envolvido em muitas vias celulares incluindo quimiotaxia de neutrófilos e células dendríticas.

Em consonância com a literatura, os flavonóides apresentam funções anti-inflamatórias e imunomoduladoras evidenciadas, nas quais constituem uma fonte importante em sua utilização para o tratamento clínico de inúmeras doenças. Assim, o presente estudo tem como objetivo avaliar os efeitos terapêuticos do praziquantel e da quercetina isoladamente e/ou associados em vermes adultos de *S.mansoni* em experimentação *in vitro*.

2 | METODOLOGIA

2.1 Modelo animal

Os animais foram identificados por codificação para minimizar o risco de viés pelos observadores. O estudo foi desenvolvido com camundongos Swiss provenientes do Biotério do Instituto Aggeu Magalhães (IAM) da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) com 4 semanas de idade e alocados em ambiente controlado com ciclo claro:escuro (12h/12h), temperatura controlada em cerca de 22 °C, ração específica para roedores e água *ad libitum*.

2.2 Avaliação da sobrevivência dos vermes adultos *S.mansoni*

Foram utilizados 20 camundongos previamente infectados (após 45 dias) por

imersão de cauda em solução com cerca de 125 cercárias/mL de *S. mansoni* da cepa LE (Luis Evangelista), para obtenção desses vermes os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical, e submetidos à perfusão pelo sistema venoso portal para remoção dos parasitas infectantes. Os vermes foram recuperados em cálices estéreis, em seguida, transferidos para o meio RPMI 1640 suplementado, onde foram lavados no mesmo meio e então, quantificados.

2.3 Critérios de avaliação do efeito esquistossomicida

Dois pares de vermes adultos foram colocados em cada poço de uma placa de cultura de 24 poços contendo meio RPMI 1640 suplementado com antibióticos (penicilina 100 U/mL, estreptomicina 100 µg/mL; pH=7,5) e 10% de soro fetal bovino (FBS), e submetidos a diferentes concentrações de quercetina (SIGMA-ALDRICH®) e praziquantel (SIGMA-ALDRICH®), isolados e associados para avaliação de viabilidade dos exemplares de *S. mansoni*. Em seguida, as placas foram incubadas a 37° C durante 2 h em estufa a 5% de CO₂ para adaptação. O controle negativo continha DMSO (dimetil sulfoxido PA) (SIGMA-ALDRICH®) junto ao meio RPMI suplementado foi formado por vermes adultos incubados no veículo de suspensão (mesmo volume). O Praziquantel® (PZQ), sendo o controle positivo foi testado em 0,5 µg/mL. Após, foi adicionado ao meio em quantidade complementar para que todos os poços obtivessem um volume final de 2mL. O presente ensaio foi realizado em triplicata.

2.4 Motilidade e sobrevivência

A motilidade e sobrevivência dos vermes adultos de *S. mansoni* foram avaliadas com auxílio de um microscópio invertido (Leica Microsystems, DM IL Wetzlar, Germany) nos intervalos de 24, 48, 72, 96 e 120 h de incubação e monitorados no Laboratório de Imunologia (Instituto Aggeu Magalhães) a cada 24 horas através de microscópio invertido, observando morfologia, mortalidade e mobilidade proposta por Ramizes et al. (2007) adaptada aos experimentos, seguindo os scores atribuídos: 0- para vermes mortos com total ausência de movimentos; 1- vermes muito lentos e movimentos ocasionais das extremidades ou intestino (pequenos espasmos esporádicos); 2-vermes com movimentação da cabeça e cauda, porém com mobilidade reduzida; 3- vermes ativos, apresentando morfologia e movimentação normais. Após, o material foi removido da placa de cultura e adicionado à solução fixadora Karnovsky e encaminhado para microscopia eletrônica de varredura, para posterior observação da estrutura do parasita.

2.5 Microscopia Eletrônica de Varredura – M.E.V

Com a finalização da observação, os grupos com 100% de mortalidade em 24h tiveram os parasitos retirados da placa, e, em seguida, lavados em solução tampão (cacodilato de sódio a 0,1M, pH 7.2), colocados em tubos eppendorf para posterior fixação em tampão cacodilato de sódio a 0,1M, glutaraldeído a 2,5% e PFA a 4%. Em seguida,

a pós-fixação foi realizada em tetróxido de ósmio a 1% em tampão cacodilato 0,1M por 90 minutos ao abrigo da luz. Após, foram realizadas três lavagens em tampão cacodilato 0,1M para posterior desidratação dos exemplares de vermes, utilizando uma sequência crescente de etanol a 30%, 50%, 70%, 90% e 03 vezes a 100% por 10 minutos cada lavagem. Após o processo de desidratação das amostras, foi realizada a fase do ponto crítico para a substituição do etanol por dióxido de carbono. O equipamento utilizado foi o Critical Point Dryer, CPD 030, BAL-TEC) , Núcleo de Plataformas Tecnológicas do Instituto Aggeu Magalhães – FIOCRUZ/PE. Após essa etapa, o material seco foi retirado do equipamento e encaminhamento para ser montado em stubs metálicos utilizando uma fita dupla face de carbono. Por fim, as amostras foram metalizadas numa atmosfera de uma fina camada de ouro, para visualização e análise no microscópio eletrônico de varredura (CARL ZEISS EVO MA10, ZEISS), do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami – LIKA/UFPE.

2.6 Análise Estatística

Os dados numéricos foram analisados com o software Graphpad Prism 8 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, EUA) e são expressos como média \pm desvio padrão (DP). As diferenças estatísticas foram determinadas usando análise de variância unidirecional (ANOVA) em conjunto com o teste de Turkey para comparações múltiplas em uma única etapa. Diferenças significativas foram definidas como $p < 0,05$.

2.7 Considerações Éticas

O projeto obteve aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais do Instituto de Pesquisas Aggeu Magalhães/Fundação Oswaldo Cruz (CEUA/IAM), protocolado sob n° 159/2020 com validade até fevereiro de 2023.

3 | RESULTADOS

3.1 Efeitos *in vitro* da quercetina em vermes adultos de *S.mansoni*

A tabela 1 expressa os resultados de motilidade do ensaio esquistossomicida da quercetina contra os vermes adultos de *S.mansoni* após 24h de incubação. Os resultados mostram que quercetina (QUER: 15 $\mu\text{g}/\text{ml}$) isoladamente foi capaz de inviabilizar a motilidade dos vermes adultos (*score* 0), assim como quando associada ao praziquantel (PZQ : 0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ +QUER: 15 $\mu\text{g}/\text{ml}$) causando igual efeito. No grupo controle negativo (DMSO: 0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 100% dos vermes permaneceram vivos durante o período de monitoramento (*score* 3).

GRUPOS	24h	48h	72h
P1)DMSO (controle negativo)	100% V Score 3	100 % V Score 3	100 % V Score 3
P2)PZQ (controle positivo)	75 % M; 25% V Score 1	100% M Score 0	-
P3)QUER	100% M Score 0	-	-
P4)PZQ+QUER	100% M Score 0	-	-

Crêterios de pontua o: **Score 3-** vermes ativos com movimentos corporais normais; **Score 2-** vermes lentos com atraso movimentos corporais, podendo apresentar apenas movimentos nas extremidades da região anterior e posterior; **Score 1-** vermes muito lentos, com movimentaa o ocasional das extremidades (cabeça e cauda) ou intestino, porém com mobilidade reduzida (pequenos espasmos esporádicos); **Score 0-** vermes mortos com total ausência de movimento (Ramizes et al., 2007; Silva et al., 2018).

Tabela 1 – Score de motilidade de vermes adultos de *S. mansoni*, tratados com Praziquantel (PQZ-0,5 µg/ ml) e quercetina (QUER15 µg/ ml) a cada 24 h de incubaa o

3.2 Análise ultraestrutural das alteraa es tegumentares dos vermes de *S. mansoni*

A figura 1A exibe a morfologia preservada dos vermes adultos incubados com o meio RPMI 1640 suplementado junto ao DMSO (controle negativo) e as figuras 1B e 1C, as características do tratamento *in vitro* com praziquantel. O efeito do PZQ nos vermes machos de *S. mansoni* após 24 h de exposi o apresentou verme com curvatura dorso ventral, na região anterior foi observado descama o, enquanto, na região mediana - dorsal áreas com extenso inchaço, deslocamento e aglomera o de tubérculos foram bastante evidenciadas, em alguns tubérculos ocasionando exposi o do tecido subtegumentar e erup o dos mesmos (Figuras 1B-1C). A figuras 1D mostra um verme adulto macho tratado com 15 µg/ ml de QUER por 24h e indica danos tegumentares acentuados como descama o, erosão do tegumento, destrui o de papilas e dos tubérculos, acrescido da presença de bolhas ao longo de todo tegumento do parasito (figura 1E). As figuras 1F e 1G mostram a exposi o *in vitro* dos efeitos do PZQ (0,5 µg/ ml)+QUER (15 µg/ ml) no verme macho destacando descama o, perda acentuada de espículas, destrui o total dos tubérculos, erup es tegumentares, acrescidos de danos acentuados nas ventosas oral (I) e ventral (II) (contorcidas).

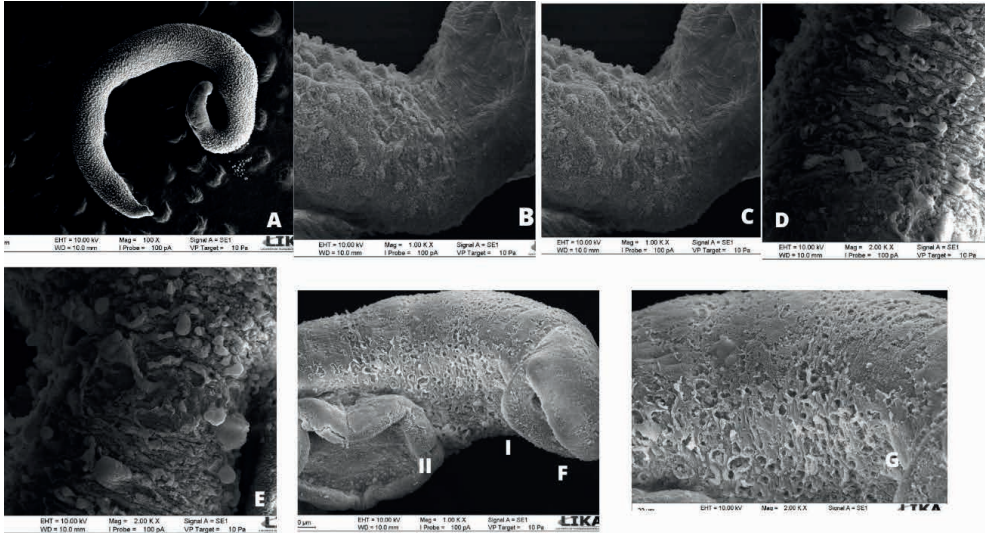


FIGURA 1: Eletromicrografias de *S. mansoni* do grupo DMSO – controle negativo (A). (B-C). Eletromicrografias de *S. mansoni* do grupo controle positivo – praziquantel (D-E) Grupo tratado com QUER (15 µg/ ml). (F-G) Grupo tratado PZQ (0,5 µg/ ml) +QUER (15 µg/ ml). I) ventosa oral. II) ventosa ventral

4 | DISCUSSÃO

A busca de novos compostos bioativos que possam ser utilizados como antiparasitário para doenças negligenciadas tem recebido uma maior atenção devido aos poucos investimentos científicos e governamentais para sanar esses agravos (WENIGER et al., 2006; BOU et al., 2014; EFFERTH et al., 2015). Vários estudos *in vitro* foram realizados para pesquisar novos compostos ativos contra espécies de *Schistosoma* sp. (CASTRO et al., 2013; 2015; MORAES, 2015; YAO et al., 2016). Esses anseios atendem a iniciativa de descobertas de novos compostos esquistossomicidas demandado pelo Programa Especial para Pesquisa e Treinamento em Doenças Tropicais (NWAKA & HUDSON, 2006).

A membrana mais externa dos vermes machos (tegumento) do *S. mansoni* mostrou ser um importante alvo no desenvolvimento de novos fármacos esquistossomicidas, levando em consideração que o tegumento faz o primeiro contato com as drogas (MELMAN et al., 2009; SILVA et al., 2021). Entre as diversas funções vitais realizadas pelo tegumento destacam-se funções importantes nos diferentes processos metabólicos do verme, tais como: desenvolvimento, absorção de nutrientes, excreção, metabolização dos lipídios e colesterol, síntese de algumas proteínas, modulação imune, desempenhando papel fundamental na proteção contra o ataque do sistema imunológico do hospedeiro (SKELLY, PJ et al., 2014; SOTILLO, J. et al., 2015). As análises observadas através da M.E.V revelaram alterações tegumentares severas e progressivas que ocorreram após a exposição a quercetina isoladamente (QUER: 15 µg/ ml) e/ou associado com praziquantel

(PZQ: 0,5 µg/ ml +QUER: 15 µg/ ml) no intervalo de 24 hs. Neste estudo, os resultados obtidos *in vitro* mostraram que a QUER foi ativa contra vermes adultos de *S. mansoni*. Essas alterações tegumentares nos vermes provavelmente não permitirá a reparação tecidual dos mesmos, os danos foram altamente extensos podendo também evidenciar antígenos na superfície do verme, este perfil tanto favorece a resposta imune do hospedeiro como complementa a atividade do medicamento praziquantel (SOTILLO J et al., 2015). Alguns estudos *in vitro* sobre produtos naturais relataram que os vermes machos de *S. mansoni* são frequentemente mais suscetíveis do que os vermes femininos (DE MELO et al., 2011; SANDERSON et al., 2002). No entanto, neste estudo em todas as concentrações de QUER, estudadas *in vitro*, apresentaram redução da motilidade dos vermes, envelhecimento dos vermes, danos severos no tegumento, incluindo perda de espículas, destruição dos tubérculos, depressão, descamação, erosão tegumentares e formação de bolhas nos vermes adultos.

Alguns estudos realizados utilizando os polifenóis flavonoides, incluindo a quercetina conferem potencial antioxidante reduzindo os radicais livres presentes nas células, o que pode ocasionar em alterações benéficas nas vias metabólicas tais como, síntese de proteínas e enzimas, melhorando de forma geral o sistema homeostático importante do organismo (KANDASWAMI, C; MIDDLETON, EJ, 1994; BOOTS, AW et al., 2008; UEDA, S et al., 2002).

Em relação ao PZQ, a droga é eficaz sobre as espécies que infectam os humanos conferindo alterações tegumentares, caracterizadas por vacuolizações, *peeling* do tegumento, tubérculos e espinhos, aumento da permeabilidade da membrana e influxo de Ca²⁺, ocasionando uma excessiva contração muscular, seguida de paralisia e morte do *S. mansoni* (XIAO et al, 2007). Apesar dos diversos trabalhos reportarem uma boa atividade esquistossomicida ao longo de décadas, há muitos esforços para aprofundar o mecanismo de ação desse fármaco. As alterações tegumentares observadas na M.E.V corroboram com os nossos resultados.

5 | CONCLUSÃO

Neste estudo, os ensaios realizados *in vitro* com o composto polifenólico quercetina evidenciaram potencial efeito sobre a motilidade e mortalidade dos vermes adultos de *Schistosoma mansoni*, além de provocar alterações ultraestruturais relevantes no tegumento do parasito.

REFERÊNCIAS

BARBOSA, CS et al. **Turismo de risco para esquistossomose mansônica em Porto de Galinhas, Estado de Pernambuco, Brasil.** Rev Pan-Amaz Saúde; v.6, n..3, p.51-58; 2015

BOOTS, AW et al. GR. ***in vitro* and *ex vivo* anti-inflammatory activity of quercetin in healthy volunteers.** Nutrition. v.24, n.7-8, p.703-10, 2008

BOTROS, S, BENNET, JL. **Praziquantel resistance.** Expert Opin Drug Discov. 2007; 2: 535- 540.

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

CARLOTO, ACM et al. **Flavonoides e curcuminoides – potenciais alternativas terapêuticas para a esquistossomose: uma revisão bibliográfica.** SaBios: Rev. Saúde e Biol., v.14, n.2, p. 48-56, mai./ago., 2019

CUNHA, NL et al. **In Vitro Schistosomicidal Activity of Some Brazilian Cerrado Species and Their Isolated Compounds. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine,** v.2012, p.1-8, 2012. SaBios: Rev. Saúde e Biol., v.14, n.2, p. 48-56, mai./ago., 2019

DE MELO, NI et al. **Schistosomicidal activity of the essential oil of Ageratum conyzoides L (Asteraceae) against adult Schistosoma mansoni worms** Molecules, 16 (2011), pp. 762-773

DOENHOFF, MJ; CIOLI, D; UTZINGER, J. **Praziquantel: mechanisms of action, resistance and new derivatives for schistosomiasis.** Curr Opin Infect Dis. 2008;v 21:p 659–67.

GREENBERG, RM. **New approaches for understanding mechanisms of drug resistance in schistosomes.** Parasitology. Cambridge University Press. 2013: 1-13.

KANDASWAMI, C; MIDDLETON, EJR. **Free radical scavenging and antioxidant activity of plants flavonoids.** Adv. Exp. Med. Biol., New York, v. 366, p. 351-376, 1994.

KOKALIARIS, C et al. **Effect of preventive chemotherapy with praziquantel on schistosomiasis among school-aged children in sub-Saharan Africa: a spatiotemporal modelling study.** Lancet Infect Dis. 2022 Jan;22(1):136-149. doi: 10.1016/S1473-3099(21)00090-6. Epub 2021 Dec 2. Erratum in: Lancet Infect Dis. 2022 Jan;22(1):e1.

KUHN, I. **Identification by high-throughput screening of inhibitors of Schistosomamansoni NAD+ catabolizing enzyme.** Bioorganic & medicinal chemistry, v. 18, n. 22, p. 7900-7910, 2010.

MAHMOUD, MR.; EL-ABHAR, HS; SALEH, S. **The effect of Nigella sativa oil against the liver damage induced by Schistosoma mansoni infection in mice.** Journal of Ethnopharmacology 79 (2002) 1–11

MELMAN, SD et al. **Reduced Susceptibility to Praziquantel among Naturally Occurring Kenyan Isolates of Schistosoma mansoni.** PLOS Negl Trop Dis.; 8: e504, 2009.

OMS. Organização Mundial de Saúde. **What is schistosomiasis?** 2014, 2017

SHARMA, S et al. **Resveratrol and curcumin suppress immune response through CD28/CTLA-4 and CD80 stimulatory pathway.** Clinical and Experimental Immunology, v.147, p.155-163, 2007.

SILVA, JCS et al. **In vitro and in vivo effects of P-MAPA immunomodulator on schistosomiasis.** Acta Trop. 2021 Jun;218:105909. doi: 10.1016/j.actatropica.2021.105909. Epub 2021 Mar 28. PMID: 33789153.

SILVA, LC; CHIEFFI, PP; CARRILHO, FJ. **Schistosomiasis mansoni -- clinical features.** Gastroenterol Hepatol. v. 28, p.30-39, 2005

SKELLY, PJ et al. **Schistosome feeding and regurgitation.** PLoS Pathogens, v. 10, p. e1004246, 2014

SOTILLO, J et al. **A quantitative proteomic analysis of the tegumental proteins from *Schistosoma mansoni* schistosomula reveals novel potential therapeutic targets.** International Journal for Parasitology, v.45, p. 505–516, 2015.

UEDA, S et al. **Bacalin induces apoptosis via mitochondrial pathway as prooxidant.** Molecular Immunology, v. 38, p. 78791, 2002.