



Universidade Federal do Maranhão
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde
Doutorado



**EFEITO DO PRAZIQUANTEL NA RESPOSTA IMUNE DE
CAMUNDONGOS INFECTADOS POR *Schistosoma mansoni* DURANTE 60
E 90 DIAS**

RANIELLY ARAUJO NOGUEIRA

São Luís

2024

RANIELLY ARAUJO NOGUEIRA

**EFEITO DO PRAZIQUANTEL NA RESPOSTA IMUNE DE
CAMUNDONGOS INFECTADOS POR *Schistosoma mansoni* DURANTE 60
E 90 DIAS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Maranhão como requisito para obtenção do título de doutora em Ciências da Saúde.

Orientadora: Profa. Dra. Flávia Raquel Fernandes do Nascimento

Coorientador: Prof. Dr. Rafael Cardoso Carvalho

São Luís

2024

Ficha gerada por meio do SIGAA/Biblioteca com dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Diretoria Integrada de Bibliotecas/UFMA

Nogueira, Ranielly Araujo.

Efeito do Praziquantel Na Resposta Imune de Camundongos Infectados Por Schistosoma Mansoni Durante 60 e 90 Dias / Ranielly Araujo Nogueira. - 2024.

102 f.

Coorientador(a) 1: Rafael Cardoso Carvalho.

Orientador(a): Flávia Raquel Fernandes do Nascimento.

Tese (Doutorado) - Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde/ccbs, Universidade Federal do Maranhão, São Luís, Ma., 2024.

1. Esquistossomose. 2. Quimioterapia. 3. Praziquantel. 4. Alvos Moleculares. 5. Resposta Imune. I. Carvalho, Rafael Cardoso. II. Nascimento, Flávia Raquel Fernandes do. III. Título.

RANIELLY ARAUJO NOGUEIRA

**EFEITO DO PRAZIQUANTEL NA RESPOSTA IMUNE DE
CAMUNDONGOS INFECTADOS POR *Schistosoma mansoni* DURANTE 60
E 90 DIAS**

BANCA EXAMINADORA

Aprovado em: 11 de junho de 2024

Guilherme Silva Miranda
Doutorado em Parasitologia
Instituto Federal do Maranhão

Lucilene Amorim Silva
Doutorado em Patologia
Universidade Federal do Maranhão

Hermes Ribeiro Luz
Doutorado em Ciências Veterinárias
Universidade Federal do Maranhão

João Gustavo Mendes Rodrigues
Doutorado em Parasitologia
Universidade Estadual do Maranhão

Rafael Cardoso Carvalho (Coorientador)
Doutorado em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres
Universidade Federal do Maranhão

Flávia Raquel Fernandes do Nascimento (Orientadora)
Doutorado em Imunologia
Universidade Federal do Maranhão

AGRADECIMENTOS

A Deus pelo seu infinito amor e cuidado em minha vida. Jamais imaginei o quão longe chegaria e até aqui Ele me guiou e sustentou. Obrigada, Senhor!

À minha orientadora, Profa. Dra. Flávia Raquel Fernandes do Nascimento, pela oportunidade de aprender e conviver com uma pesquisadora de referência. Obrigada por todo o conhecimento compartilhado e paciência durante esses anos.

Ao meu coorientador, Prof. Dr. Rafael Cardoso Carvalho, agradeço pelos conhecimentos compartilhados, pela amizade e por todo suporte, principalmente, por tranquilizar minha mente com belíssimas palavras de apoio e calma.

Aos “Mansônicos”: Gabriela Sampaio, Gustavo Rodrigues, Irla Licá, Gleycka Gomes, Guilherme Miranda e Vitor Santos, um time ao qual não existem palavras para descrever o grau absurdo de inteligência, proatividade e de partilha que vocês possuem, não tenho palavras suficientes para expressar minha gratidão. Obrigada pela companhia nessa longa caminhada, grande parte de vocês desde a graduação, seguiremos assim, sempre torcendo e ajudando uns aos outros por mais algumas décadas. Sem a parceria e amizade de vocês, o caminho teria sido muito mais difícil, muito obrigada!

À professora Dra. Lucilene Amorim Silva pela sua disponibilidade e auxílio nas análises histopatológicas.

À professora Dra. Mayara Cristina Pinto da Silva por sua disponibilidade, paciência, gentileza e conhecimento compartilhado durante tardes de experimentos em bancada.

À Dra. Sullayne Janayna Araujo Guimaraes pelo seu tempo e suporte dedicado às nossas análises de imunofenotipagem.

A todos os pesquisadores do Laboratório de Imunofisiologia (UFMA) que dedicaram seu tempo e suas habilidades para a realização dessa pesquisa.

Ao Laboratório de Imunologia de Helminhos do Grupo Interdepartamental de Estudos sobre a esquistossomose (GIDE/UFMG) pelo material disponibilizado para a realização desta pesquisa.

Ao Biotério da Universidade Federal do Maranhão pela disponibilidade de animais para a fase experimental da pesquisa.

Aos membros das bancas de qualificação e defesa: Profa. Dra Rosane Guerra, Prof. Dr. Aramys Reis, Prof. Dr. Guilherme Miranda, Profa. Dra Lucilene Amorim Silva, Prof. Dr. Hermes Ribeiro Luz e Prof. Dr. João Gustavo Mendes Rodrigues, suas valiosas contribuições e o tempo dedicado foram fundamentais para o aprimoramento e sucesso da minha pesquisa.

À Universidade Federal do Maranhão, em especial ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, pela formação.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior do Ministério da Educação pela bolsa disponibilizada.

À Fundação de Amparo à Pesquisa e ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Maranhão – FAPEMA pelo financiamento da pesquisa e auxílio na publicação do artigo.

À minha família, que nunca duvidou da minha capacidade de conquistar meus objetivos e sempre estiveram na torcida por mim. Em especial, ao meu filho Bernardo Araújo, que nasceu na reta final do curso, seu sorriso ilumina os meus dias e me renova a cada amanhecer. Por fim, a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização desta pesquisa. Muito obrigada!

RESUMO

A esquistossomose mansoni é causada pelo *Schistosoma mansoni* e sua quimioterapia há mais de 40 anos é realizada pelo Praziquantel (PZQ). Embora seu uso esteja estabelecido pela Organização Mundial da Saúde, o fármaco continua a ser investigado na tentativa de compreender melhor e preencher lacunas sobre seus modos de ação no parasito e efeitos na resposta imune dos hospedeiros. Esta tese possui como objetivo compilar mecanismos de ação de PZQ em *Schistosoma* já descritos e novas perspectivas terapêuticas, além de investigar os efeitos na resposta imune após tratamento com o fármaco, durante as fases aguda e crônica da doença. No capítulo I, foi realizada uma revisão narrativa de literatura, na qual abordamos os mecanismos de ação já descritos, onde reforçamos que ainda não há uma justificativa consolidada para a eficácia reduzida de PZQ em estágios imaturos do verme. Além disso, apresentamos um compilado de novas perspectivas terapêuticas em relação ao uso de PZQ, como adjuvante na fabricação de vacinas, potencializando a resposta imune. O capítulo II foi construído a partir de experimentação *in vitro* e *in vivo* em relação ao PZQ e *S. mansoni*. Os ensaios *in vitro* foram realizados com vermes adultos submetidos a diferentes concentrações de PZQ (0,1; 1 e 10 µg/mL) para avaliar sua mobilidade e mortalidade. Todas as concentrações analisadas apresentaram ação na mortalidade dos vermes, entretanto à medida que a concentração diminuía, o tempo de sobrevivência dos vermes aumentava no experimento. Para obtenção dos dados *in vivo*, camundongos machos foram infectados experimentalmente por cercarias de *S. mansoni* e tratados com PZQ, durante sete dias consecutivos (dos dias 45° ao 51°, após a infecção). A eutanásia dos animais foi dividida em dois intervalos da progressão da doença: uma parte dos animais com 60 dias de infecção (fase aguda) e os demais com 90 dias (fase crônica), para realização das análises parasitológicas, histopatológicas e imunológicas. Para os dois períodos da doença foi observado que PZQ reduziu o número de ovos tanto no fígado quanto nas fezes, assim como reduziu também o número de granulomas no fígado. Já para o intestino, foi observada redução em relação a presença de granulomas apenas para a fase crônica. Essas reduções de carga parasitária e na presença de granulomas foram acompanhadas também pela redução do infiltrado celular, lesão tecidual no fígado e intestino e diminuição de eosinófilos e aumento de linfócitos. Em relação ao perfil de resposta gerado durante a infecção, foi observado que PZQ afetou a produção de citocinas dos perfis Th1, Th2 e Treg. Para ambos os períodos analisados (aguda e crônica), foi observada a diminuição nas concentrações de TNF- α , IL-6 e IL-10. Assim, podemos concluir que além do seu reconhecido papel antiparasitário, o fármaco também atua com agente anti-inflamatório em ambas as fases, modula a resposta imune, podendo estar associado a redução da patologia tecidual.

Palavras-chave: esquistossomose, quimioterapia, praziquantel, alvos moleculares, resposta imune

ABSTRACT

Schistosomiasis mansoni is caused by *Schistosoma mansoni* and chemotherapy has been carried out with praziquantel (PZQ) for more than 40 years. Although the World Health Organization prescribes the use of praziquantel, the drug continues to be researched to better understand its mode of action on the parasite and its effects on the host immune response and to fill gaps. The aim of this thesis is to compile previously described mechanisms of action of PZQ in *Schistosoma* and new therapeutic perspectives, as well as to investigate the effects on the immune response following treatment with the drug in the acute and chronic phases of the disease. In Chapter I, we conducted a narrative literature review in which we addressed the previously described mechanisms of action, reiterating that there is still no consolidated rationale for the lower efficacy of PZQ in immature stages of the worm. In addition, we present a compilation of new therapeutic perspectives regarding the use of PZQ as an adjuvant in the production of vaccines to enhance the immune response. Chapter II was prepared from *in vitro* and *in vivo* experiments related to PZQ and *S. mansoni*. *In vitro* experiments were performed with adult worms exposed to different concentrations of PZQ (0.1, 1 and 10 µg/mL) to evaluate their mobility and mortality. All concentrations analyzed showed an effect on worm mortality. However, the survival time of the worms in the experiment increased with decreasing concentration. To obtain *in vivo* data, male mice were experimentally infected with *S. mansoni* cercariae and treated with PZQ for seven consecutive days (from day 45 to 51 post-infection). The euthanasia of the animals was divided into two intervals of disease progression: part of the animals at 60 days of infection (acute phase) and the rest at 90 days (chronic phase) to perform parasitologic, histopathologic and immunologic analyzes. For both phases of the disease, PZQ was found to reduce the number of eggs in the liver and feces as well as the number of granulomas in the liver. In the intestine, a reduction in granulomas was only observed in the chronic phase. This reduction in the parasite load and the presence of granulomas was also accompanied by a reduction in the cellular infiltrate, tissue damage in the liver and intestine as well as a decrease in eosinophils and an increase in lymphocytes. Regarding the response profile generated during infection, it was observed that PZQ affected the production of cytokines from the Th1, Th2 and Treg profiles. For both periods analyzed (acute and chronic), a decrease in the concentrations of TNF- α , IL-6 and IL-10 was observed. From this we can conclude that, in addition to its recognized antiparasitic role, the drug also acts as an anti-inflammatory agent in both phases, modulating the immune response and possibly associated with a reduction in tissue pathology.

Keywords: schistosomiasis, chemotherapy, praziquantel, molecular targets, immune response

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

5-HT2B	Receptor de 5-hidroxitriptamina 2B/serotonina 2B	OMS	Organização Mundial da Saúde
CCl4	Tetracloroeto de carbono	OX	Oxamniquina
DLD-1	Célula de adenocarcinoma de cólon humano	PTX	Paclitaxel
GPCR	Receptor acoplado à proteína G	PZQ	Praziquantel
GSH	Glutaciona	R (-)	Isômero levo-praziquantel
H1299	Células de carcinoma de pulmão	S (+)	Isômero dextro-praziquantel
H5N1	Influenza aviária A	SEA	Antígeno Solúvel de Ovo
HBV	Vírus da hepatite B	Smad7	Gene de codificação de proteínas
HSC	Células estreladas hepáticas	SWAP	Antígeno solúvel de verme adulto
IFN-γ	Interferon-gama	TGF-β	Fator de crescimento transformante beta
Ig	Imunoglobulina	TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
IL	Interleucina	Tr1	Células Regulatórias T tipo 1
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry	Tregs	Células T reguladoras
M1	Macrófago M1	TRP	Canais potenciais de receptores transitórios
M2	Macrófago M2	VOOC	Canais de Ca^{2+} operados por voltagem
miRs	MicroRNAs	XIAP	Inibidor da proteína de apoptose ligado ao X
NLRP3	Domínio pirina da família NLR contendo 3		

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1.	Distribuição mundial das espécies de <i>Schistosoma</i> de importância médica.	15
Figura 2.	Ciclo biológico de <i>Schistosoma mansoni</i> .	17
Figura 3.	Diferentes perfis de resposta imune durante infecção por <i>S. mansoni</i> .	20
Figura 4.	Diferenças na composição do granuloma hepático e intestinal.	22
Figura 5.	Fórmulas estruturais de R-PZQ e S-PZQ.	25
Figura 6.	Delineamento experimental utilizado para avaliação de PZQ na resposta imune de camundongos infectados por <i>S. mansoni</i> .	45
Figura 7.	Viabilidade de vermes machos adultos de <i>S. mansoni</i> (CEPA LE – Belo Horizonte/MG) durante 48 horas de exposição ao fármaco Praziquantel®.	52
Figura 8.	Efeito do tratamento com Praziquantel® sobre o número de ovos presentes nas fezes (A) e retidos no fígado (B) de camundongos infectados por <i>S. mansoni</i> em diferentes períodos da infecção (60 e 90 dias).	53
Figura 9.	Fotomicrografia de cortes histológicos hepáticos de camundongos infectados <i>S. mansoni</i> , durante 60 dias, e tratados com Praziquantel, corados com HE (40x).	55
Figura 10.	Fotomicrografia de cortes histológicos hepáticos de camundongos infectados <i>S. mansoni</i> , durante 90 dias, e tratados com Praziquantel, corados com HE (40x).	55
Figura 11.	Número de granulomas (A) e análise morfométrica da área de granulomas (B) no tecido hepático de camundongos infectados ou não por <i>S. mansoni</i> , e tratados ou não com Praziquantel.	57
Figura 12.	Concentrações séricas de IgE total de camundongos infectados ou não por <i>S. mansoni</i> , e tratados ou não com Praziquantel® em tempos diferentes de infecção.	60
Figura 13.	Celularidade total (A) e peso (B) do baço de camundongos infectados ou não por <i>S. mansoni</i> , e tratados ou não com Praziquantel.	61

- Figura 14.** Celularidade total (A) e caracterização fenotípica dos linfócitos T (B), linfócitos B (C) e macrófagos (D) do baço de camundongos infectados ou não por *S. mansoni*, e tratados ou não com Praziquantel. **63**
- Figura 15.** Caracterização fenotípica dos linfócitos T auxiliares (A e B) e linfócitos T citotóxicos (C e D) do baço de camundongos infectados ou não por *S. mansoni*, e tratados ou não com Praziquantel. **64**
- Figura 16.** Efeito do tratamento de Praziquantel durante a infecção por *S. mansoni* sobre as concentrações de citocinas de perfil Th1 em sobrenadante de cultura do baço de camundongos. **66**
- Figura 17.** Efeito do tratamento de Praziquantel durante a infecção por *S. mansoni* sobre as concentrações de citocinas IL-4 e IL-10 em sobrenadante de cultura do baço de camundongos. **67**

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 REFERENCIAL TEÓRICO	14
2.1 ESQUISTOSSOMOSE	14
2.2 CICLO BIOLÓGICO DE <i>Schistosoma mansoni</i> E SINAIS CLÍNICOS.....	16
2.3 IMUNOPATOLOGIA DA ESQUISTOSSOMOSE	20
2.4 TRATAMENTO DA ESQUISTOSSOMOSE	23
2.5 IMUNOPATOLOGIA DO TRATAMENTO COM PRAZIQUANTEL EM HOSPEDEIROS VERTEBRADOS INFECTADOS POR <i>Schistosoma</i>	28
3 OBJETIVOS	31
3.1 GERAL.....	31
3.2 ESPECÍFICOS.....	31
4 RESULTADOS	32
4.1 CAPÍTULO I: PRAZIQUANTEL: AN UPDATE ON THE MECHANISM OF ITS ACTION AGAINST SCHISTOSOMIASIS AND NEW THERAPEUTIC PERSPECTIVES	32
4.2 CAPÍTULO II: EFEITO DE PRAZIQUANTEL NA REPOSTA IMUNE DE CAMUNDONGOS INFECTADOS EXPERIMENTALMENTE POR <i>Schistosoma mansoni</i> DURANTE AS FASES AGUDA E CRÔNICA	41
5 CONCLUSÕES	78
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	79
APÊNDICES	94
APÊNDICE A – PRODUÇÃO CIENTÍFICA 2019-2024	95
ANEXOS	98
ANEXO A- PROTOCOLO DO COMITÊ DE ÉTICA E EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL DA UFMA	99
ANEXO B- COMPROVAÇÃO DE FINANCIAMENTO DE PESQUISA	100
ANEXO C – LIMITE TEÓRICO DE DETECÇÃO DO KIT CBA PARA CITOCINAS Th1, Th2 E Th17	101

1 INTRODUÇÃO

A esquistossomose mansoni é uma parasitose causada pelo helminto *Schistosoma mansoni* (BERGQUIST et al., 2017). Esta doença possui como característica uma resposta inflamatória granulomatosa e deposição de tecido fibroso em torno dos ovos do parasito que são retidos em órgãos, como o fígado, quando não excretados nas fezes (McMANUS et al., 2018).

O tratamento da esquistossomose baseia-se há mais de 40 anos no uso do medicamento Praziquantel® (PZQ) (CIOLI; PICAMATTOCCIA, 2003; BERGQUIST et al., 2017). A facilidade de administração, o custo baixo e a eficácia contra as três principais espécies de *Schistosoma* tornaram o PZQ a droga de escolha para o tratamento da esquistossomose (CIOLI et al., 2003; DOENHOFF et al., 2008).

O PZQ reduz a carga parasitária do hospedeiro definitivo, como uma forma de prevenir a transmissão da doença, e impede a evolução da doença para as formas graves (PORDEUS et al., 2008; BRASIL, 2014). Essa redução na morbidade da doença, e consequente boa resposta terapêutica, é fortemente associada ao tratamento durante a fase postural da doença (UTZINGER et al., 2003; VIMIEIRO, 2009), na qual os vermes já amadureceram sexualmente, acasalaram e iniciaram a oviposição (ANDERSON; ENABULELE, 2021). O PZQ possui ação direta sob o verme adulto, causando paralisia da musculatura, vacuolização do tegumento e exposição de antígenos da superfície, o que facilita o reconhecimento para o sistema imunológico do hospedeiro definitivo (CIOLI, 1998; CIOLI; PICA-MATTOCCIA, 2003; JIRAUNKOORSKUL et al., 2005; XIAO et al., 2018). Entretanto, na fase pré-postural da doença, período em que são encontrados os vermes imaturos, PZQ não demonstra eficácia (UTZINGER et al., 2003; VIMIEIRO, 2009), que gera grande curiosidade e possibilidades de investigação.

Apesar de ser preconizado para o tratamento da esquistossomose ao longo de décadas, ainda existem questionamentos sobre o papel do PZQ na indução da resposta imune durante a infecção, principalmente sobre sua atividade nos estágios iniciais da infecção (CHAN et al., 2013; CIOLI et al., 2014). A partir das discussões sobre a eficácia ou não de PZQ em diferentes fases de desenvolvimento do parasito e da doença, esta pesquisa buscou compreender melhor os mecanismos imunológicos envolvidos na eficácia de Praziquantel em dois tempos diferentes da infecção: fase aguda (60 dias) e fase crônica (90 dias).

A tese foi dividida em dois capítulos, no capítulo I é apresentado um artigo de revisão, intitulado “Praziquantel: An update on the mechanism of its action against schistosomiasis and new therapeutic perspectives”, publicado na Revista Molecular & Biochemical Parasitology, qualis A4 e fator de impacto: 1.759, que reúne achados sobre os mecanismos de ação de PZQ já descritos, para o tratamento da esquistossomose, incluindo atualizações dos dados e destaca possíveis outras formas de uso do fármaco, que não sejam de cunho parasitológico. No capítulo II foi realizada a caracterização e comparação da ação de PZQ na resposta imune de camundongos infectados experimentalmente por *S. mansoni*, após 60 e 90 dias pós-infecção.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 ESQUISTOSSOMOSE

A esquistossomose é uma doença infecciosa parasitária causada por helmintos do gênero *Schistosoma* Weiland 1858 (GRYSEELS, 2012). Estes vermes pertencem ao filo Platyhelminthes Gegenbauer 1859, classe Trematoda Rudolphi 1808 e família Schistosomatidae Stiles & Hassal 1898 (GRYSEELS et al., 2006). O gênero *Schistosoma* possui 23 espécies descritas (REY et al., 2021), das quais seis destacam-se por serem agentes etiológicos da esquistossomose ou bilharzíase em humanos: *Schistosoma haematobium* Bilhartz, 1852, *Schistosoma japonicum* Katsurada, 1904, *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907, *Schistosoma intercalatum* Fischer, 1934, *Schistosoma mekongi* Voge, Brickner e Bruce 1978 e *Schistosoma guineenses* Pages, Jourdane, Southgate e Tchuem, 2003 (McMANUS et al., 2020).

Em relação a distribuição das principais espécies causadoras da esquistossomose, *S. haematobium* (esquistossomose urogenital) é endêmica na África e Oriente Médio (WEBSTER et al., 2012; BOISSIER et al., 2016; PONPETCH et al., 2021) (Figura 1). Quanto a distribuição das espécies responsáveis pela esquistossomose intestinal, *S. intercalatum* e *S. guineenses* possuem ocorrência em Camarões, Guiné Equatorial, Gabão, Nigéria e República Democrática do Congo (JOURDANE et al., 2001; TCHUEM TCHUENTÉ et al., 2003). Já a espécie *S. mekongi* possui registros em Camboja e na República Democrática Popular do Laos (Ásia) (MUTH et al., 2010) (Figura 1). A espécie *S. japonicum* costumava ser endêmica no Japão, mas os esforços de controle extensivos levaram à sua eliminação no final da década de 1970 (ROLLISON et al., 2013). Atualmente, *S. japonicum* possui ocorrência na China, Filipinas e Indonésia (COLLEY et al., 2014; LI-JUAN et al., 2016). Em relação ao *S. mansoni* sua ocorrência é registrada na África, Oriente Médio, Brasil, Caribe, Porto Rico, Suriname e Venezuela (GRYSEELS, 2012; SCHOLTE et al., 2014; PONPETCH et al., 2021, WHO, 2022). As espécies *S. mansoni*, *S. japonicum* e *S. haematobium* são as três principais espécies de maior importância clínica e socioeconômica (CHUAH et al., 2019).

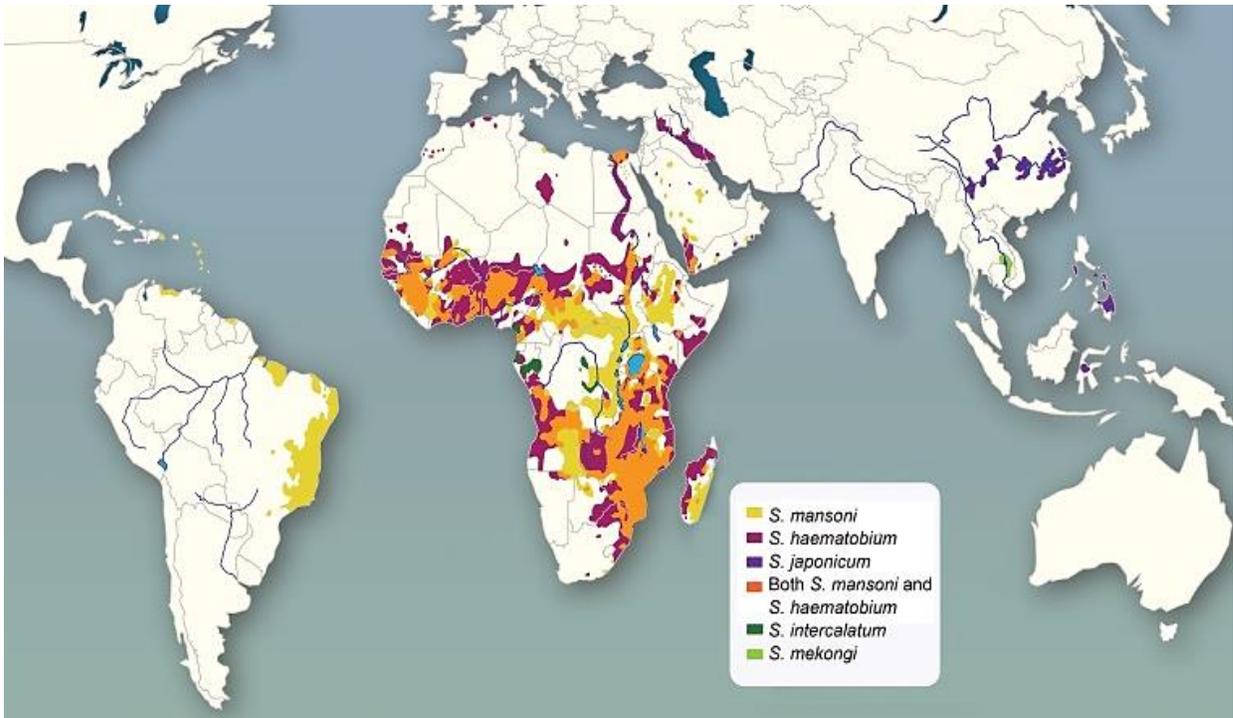


Figura 1. Distribuição mundial das espécies de *Schistosoma* de importância médica. A espécie *S. mansoni* é registrada na África e é o único esquistossomo no hemisfério ocidental (em partes da América do Sul e do Caribe). Já *S. japonicum* e *S. mekongi* ocorrem na Ásia. Em relação ao *S. intercalatum* sua ocorrência é relatada na África Central e Ocidental e *S. haematobium* é amplamente distribuída pelo continente africano e com ocorrência em regiões do Oriente Médio, da Turquia e da Índia. Fonte: Weerakoon et al. (2015)

A esquistossomose é uma doença negligenciada, que ocorre principalmente em áreas tropicais e subtropicais (QUANSAH et al., 2016; DEOL et al., 2019), possui morbidade grave, principalmente em infecções com carga parasitária alta (McMANUS et al., 2018). Quanto ao número de casos de esquistossomose no mundo é difícil mensurar, por isto estima-se que a doença afete mais de 250 milhões de pessoas, com cerca de 280.000 mortes todos os anos (LO VERDE, 2019; LO et al., 2022).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) divulgou que dentre suas estimativas de pessoas infectadas, que pelo menos 251,4 milhões de pessoas necessitaram de tratamento preventivo em 2021. Este tratamento possui como objetivo reduzir e prevenir a morbidade, mas para isso deve ser repetido ao longo de vários anos (WHO, 2023). Apesar da transmissão da esquistossomose ser relatada em 78 países (COLLEY et al., 2014), a quimioterapia preventiva é realizada apenas em 51 países endêmicos (transmissão moderada a elevada) (KOKALIARIS et al., 2022; WHO, 2023).

A esquistossomose é uma doença fortemente associada a pobreza e localidades de características epidemiológicas semelhantes: falta ou dificuldade de acesso à água potável, falta de saneamento básico e higiene em atividades que envolvam contato com água, sejam domésticas ou profissionais (GRIMES et al., 2014). Além da quimioterapia realizada em populações afetadas, melhorias no acesso a água potável, nas condições sanitárias e no controle de caramujos transmissores contribuiriam fortemente na redução dos casos de esquistossomose, e consequentemente na interrupção do ciclo de transmissão da doença (CHITSULO et al., 2000; GRYSEELS et al., 2006; COLLEY et al., 2014, NELWAN, 2019).

2.2 CICLO BIOLÓGICO DE *Schistosoma mansoni* E SINAIS CLÍNICOS

O ciclo de *S. mansoni* (Figura 2) é do tipo heteróximo, composto por hospedeiro intermediário (caramujos do gênero *Biomphalaria*) e hospedeiros vertebrados (humanos e roedores) (ROSS et al., 2002; MIRANDA et al., 2022). O ciclo biológico compreende a realização de uma etapa de reprodução sexuada (vermes adultos dioicos), com produção de ovos no hospedeiro vertebrado, outra de reprodução assexuada (esporocistos) nos hospedeiros intermediários e fases de vida livre (miracídeos e cercárias) (SILVA et al., 2008).

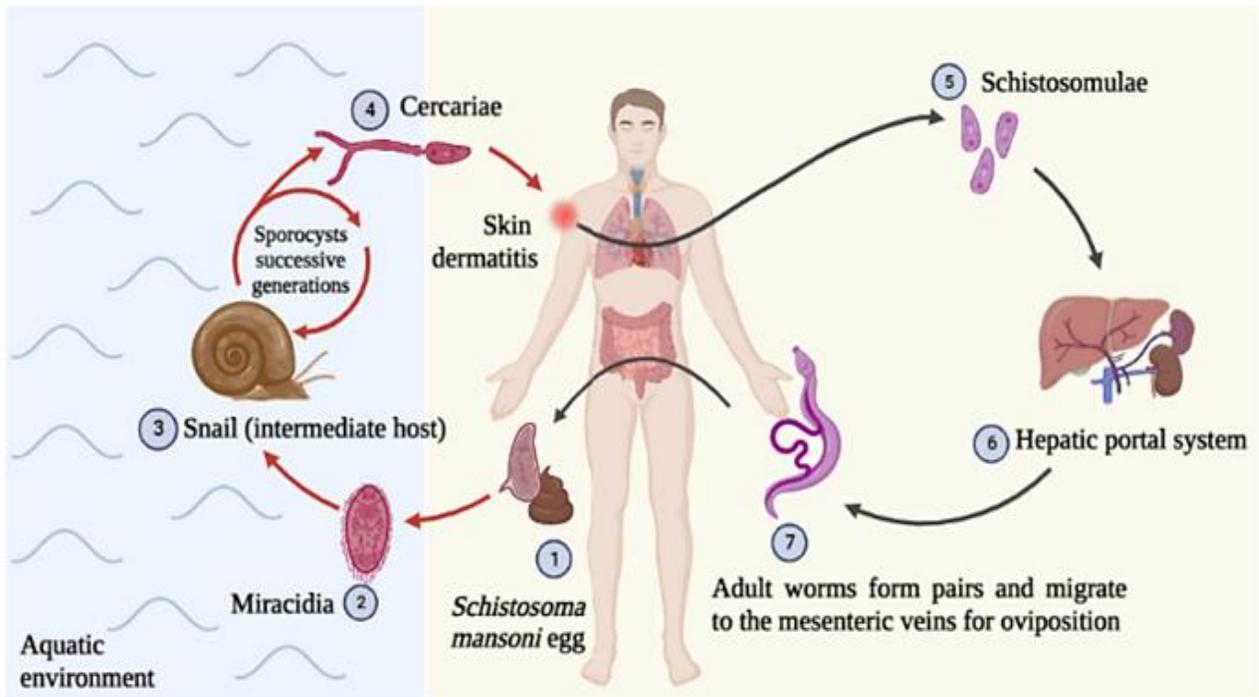


Figura 2. Ciclo biológico de *Schistosoma mansoni*. Ovos viáveis do parasito são eliminados pelas fezes do hospedeiro definitivo (1), que liberam as larvas miracídeos quando em contato com água (2). Os miracídeos infectam os caramujos (*Biomphalaria* spp.) (3). Dentro dos caramujos, os miracídeos transformam-se em esporocistos I, que por poliembrião produzem esporocistos II. Após, aproximadamente, 30 dias os esporocistos II produzem cercárias, que são liberadas pelos caramujos, por estimulação luminosa e térmica (4). A cercária possui cauda bifurcada e nada ativamente para infectar o hospedeiro vertebrado, penetrando pela pele e mucosas, e posteriormente transforma-se em esquistossômulo (5). O esquistossômulo atinge à corrente sanguínea, é conduzido passivamente para o coração e depois para os pulmões. Depois, os vermes migram para o sistema porta hepático e tornam-se adultos (6). Os vermes adultos acasalam e migram para o intestino, onde põem ovos que podem ser excretados nas fezes, completando o ciclo de vida do parasita (7). No entanto, a maioria dos ovos podem ficar retidos no tecido intestinal e/ou transportados para outros órgãos, como fígado e baço, induzindo uma intensa resposta inflamatória, o que constitui a principal patologia da esquistossomose intestinal. Fonte: Lira et al. (2023)

O ciclo de vida de *S. mansoni* inicia quando os ovos do parasito são eliminados nas fezes do hospedeiro vertebrado (COELHO, 1970). Em ambiente límfnico, estes ovos liberam larvas ciliadas, denominadas miracídeos (ROLLINSON; SIMPSON, 1987; JENKINS-HOLICK; KAUL, 2013), que medem em torno de 150 a 170µm de comprimento por 60 a 70µm de largura, com formato oval e são revestidos por placas epidérmicas ciliadas (KATZ & ALMEIDA, 2003; SILVA et al., 2008). Após a eclosão do ovo, o miracídio nada de forma ativa a procura de um hospedeiro planorbídeo específico/compatível (HAAS et al., 1995; SALADIN et al., 1979). O encontro do miracídio ao caramujo *Biomphalaria* está ligado a presença de quimiorreceptores, que são capazes de perceber substâncias existentes no muco produzido pelo molusco (HAAS, 1995; SILVA et al., 2008). O miracídio, ao entrar em contato com *Biomphalaria*, adere-se e penetra-o em qualquer

parte mole de seu tegumento, através de secreções glandulares e movimentos rotatórios (SILVA et al., 2008). No interior do hospedeiro intermediário, o miracídio sofre modificações fisiológicas, transformando-se nas fases seguintes de desenvolvimento – os esporocistos I e II. Os esporocistos passam por ciclos de reprodução assexuada, originando as formas larvárias infectantes para o hospedeiro vertebrado – cercárias (McMANUS et al., 2018).

As cercárias de *S. mansoni* possuem 500µm de comprimento total, com uma ventosa ventral e outra oral, possuem um corpo alongado, cilíndrico e com presença de uma cauda curta e bifurcada, fundamental para seu deslocamento no ambiente (KATZ & ALMEIDA, 2003; NEVES et al., 2016). As cercárias são larvas eliminadas pelos caramujos *Biomphalaria*, por estimulação térmica e luminosa (THÉRON, 1984; BOGÉA et al., 1996). Esta fase larvária é o estágio de desenvolvimento infeccioso para os hospedeiros definitivos, sua penetração ocorre de forma ativa na pele ou mucosa, frequentemente, nos pés e pernas, por serem áreas do corpo mais expostas em áreas contaminadas (McMANUS et al., 2020). A partir do contato com o hospedeiro, a cercária fixa-se, invade e migra para a pele do hospedeiro, em uma série de modificações estruturais, fisiológicas e bioquímicas, originando o esquistossômulo de pele (McKERROW; SALTER, 2002; CURWEN; WILSON 2003; WHITFIELD et al., 2003).

Após a invasão da pele e transformação em esquistossômulo, o parasito desloca-se da epiderme em direção à derme (SILVA et al., 2008). Na derme, os esquistossômulos invadem o sistema circulatório (vasos venosos ou linfáticos) e são carregados passivamente para o coração, e posteriormente para os pulmões (LENZI et al., 2008). Neste processo de migração, os esquistossômulos ficam temporariamente retidos nos pulmões, sendo denominados de esquistossômulos pulmonares (HOCKLEY, MCLAREN, 1973; LENZI et al., 2008). Ao saírem dos pulmões, pelo fluxo sanguíneo, retornam ao coração e são bombeados para a circulação sistêmica, por vários dias antes de ficarem retidos nos sinusóides hepáticos, local que irão se desenvolver e amadurecer sexualmente (WEERAKOON et al., 2015).

O verme adulto de *S. mansoni* apresenta dimorfismo sexual, característica única dos esquistossomos, visto que os demais trematódeos são hermafroditas (PARAENSE et al., 1949; SILVA et al., 2008). Os vermes adultos possuem tempo médio de vida entre 3 e 10 anos nos hospedeiros humanos e vivem grande parte desse tempo em cópula (WARREN et al., 1974). O macho possui cor esbranquiçada, medindo cerca de 1cm, possui canal ginecóforo, no qual pode ser

encontrada a fêmea (COLLEY et al., 2014) medindo entre 1,2 e 1,6 cm de comprimento e coloração mais escura (KATZ; ALMEIDA, 2003; SOUZA et al., 2011). No sistema porta-hepático intestinal, as fêmeas maduras passam a liberar ovos, ainda imaturos, que necessitam desenvolver-se nos tecidos do hospedeiro vertebrado, para então serem eliminados através das fezes, dando continuidade ao ciclo biológico (LENZI et al., 2008).

Em média, após 4-8 semanas após o contato com as cercarias ocorre o início da oviposição (MARTINEZ et al., 2003; COLLEY; SECOR et al., 2014). Os ovos de *S. mansoni* apresentam um espículo lateral, membrana dupla, que em seu interior contém o embrião, medem cerca de 150µm de comprimento por 60µm de largura (KATZ; ALMEIDA, 2003; NEVES et al., 2016). Cada fêmea põe cerca de 400 ovos por dia na parede dos capilares e vênulas (LENZI et al., 2008), esses ovos podem ser excretados nas fezes ou ficarem retidos nos tecidos, ocasionando uma resposta inflamatória granulomatosa e deposição de tecido fibroso em volta destes ovos (SOHBY, 2018).

A esquistossomose apresenta-se clinicamente em doença aguda e formas crônicas, e em todas o fígado está sempre lesado (ANDRADE, 2008). Dentre as manifestações clínicas da forma aguda estão a síndrome toxêmica, com sintomas inespecíficos, e a eosinofilia, que podem surgir alguns dias após a exposição cercariana, ou entre 4-8 semanas, coincidindo com o começo da eliminação de ovos nas fezes, o que pode provocar dores abdominais e diarreia acompanhada de muco e sangue (LAMBERTUCCI, 1993; ANDRADE, 2008). Desta maneira, a forma aguda pode ocorrer tanto no período pré quanto no pós-postural (HIATT et al., 1979). As formas crônicas podem ser divididas em: intestinal, hepatointestinal ou hepatoesplênica (DE JESUS et al., 2002). As formas mais graves ou avançadas da esquistossomose são caracterizadas pela fibrose hepática periportal, resultado da deposição de numerosos ovos de *S. mansoni*, com conseqüente reação inflamatória crônica granulomatosa e destruição vascular (ANDRADE, 2008). A gravidade da doença, a intensidade da infecção e o tipo de resposta imune produzida pelo hospedeiro estão correlacionadas no desenvolver da doença e suas manifestações clínicas (LENZI et al., 1997; HIATT et al., 1979).

2.3 IMUNOPATOLOGIA DA ESQUISTOSSOMOSE

O sistema imunológico dos hospedeiros definitivos depara-se com vários estágios do ciclo de vida do parasito (cercárias, esquistossômulos, vermes adultos e ovos), sendo todos estes estágios responsáveis pela expressão e liberação de várias porções antigênicas, estimulando respostas imunes humorais e celulares (COLLEY; SECOR et al., 2014) (Figura 3). Ao longo da infecção essas respostas continuam a aumentar de acordo com a cronicidade da doença e outras são reguladas (FITZSIMMONS et al., 2012).

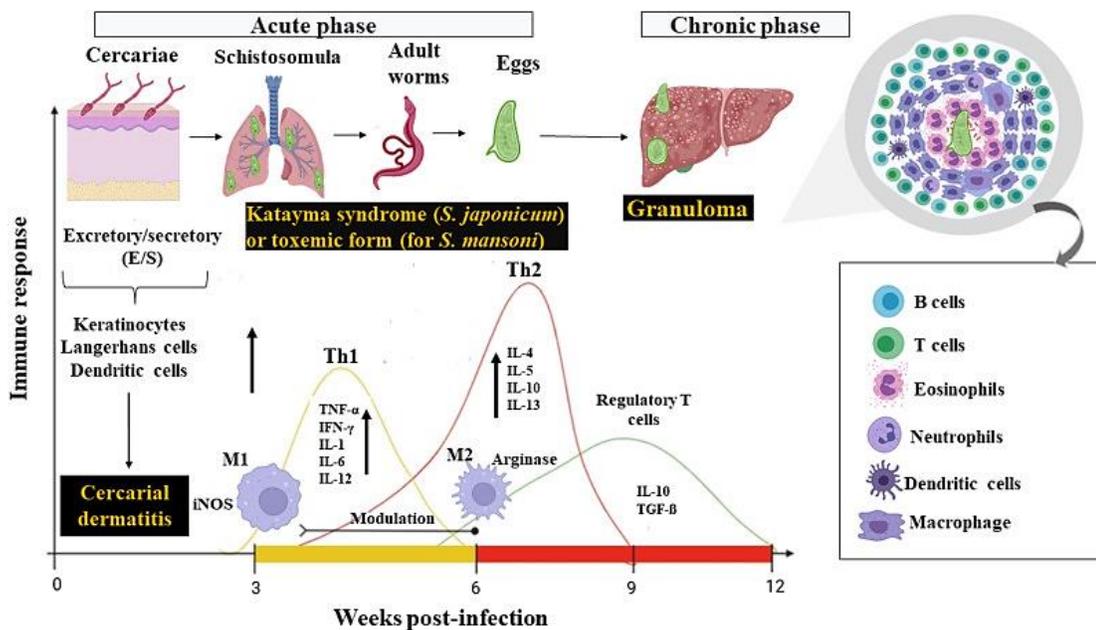


Figura 3. Diferentes perfis de resposta imune durante infecção por *S. mansoni*. Ao penetrar na pele do hospedeiro, as cercárias provocam aumento de células apresentadoras de antígenos no sistema imune inato (células de Langerhans e células dendríticas), que contribuem para uma resposta imune celular tipo 1 (Th1). Após penetrar na pele do hospedeiro, as cercárias sofrem alterações morfológicas e bioquímicas, transformando-se em formas juvenis, conhecidas como esquistossômulos, que atingem os vasos sanguíneos. Na corrente sanguínea, o esquistossômulo é transportado passivamente para os pulmões e coração até finalmente atingir o sistema porta hepático, onde se desenvolve em vermes adultos machos ou fêmeas. Nestes estágios de desenvolvimento anteriores a oviposição, o hospedeiro vertebrado produz uma resposta imune predominantemente do tipo 1. Essa resposta é caracterizada pela produção de citocinas pró-inflamatória. Após a oviposição, ocorre uma alteração no perfil dos mediadores imunológicos produzidos pelo hospedeiro vertebrado e a resposta imune torna-se predominantemente do tipo Th2, que é associada ao aumento na produção de IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13. Essas alterações são respostas aos antígenos solúveis de ovo (SEAs). Os ovos do parasito que não são excretados, são retidos em órgãos e induzem uma resposta imune granulomatosa do hospedeiro, caracterizando um estágio crônico da doença. Em torno de nove semanas pós-infecção, ocorre novamente uma imunomodulação da resposta imune do hospedeiro vertebrado, impulsionada pela IL-10 e TGF- β , induzindo células T reguladoras (Tregs). Essa modulação da resposta imune é essencial para promoção da

sobrevivência do hospedeiro definitivo durante a infecção por *Schistosoma*, pois reduz a resposta inflamatória, o tamanho do granuloma e a formação da fibrose. Fonte: Licá et al. (2023)

Durante as primeiras semanas de infecção, os hospedeiros definitivos exibem, predominantemente, uma resposta imune do tipo T helper 1 (Th1) aos antígenos do parasito (COLLEY; SECOR, 2014). A resposta de perfil Th1 é caracterizada pela produção de citocinas pró-inflamatórias como interferon gama (IFN- γ), interleucinas (IL-1; IL-2, IL-12, IL-6), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e promove a imunidade mediada por células (BURKE et al., 2009; PEARCE; MACDONALD, 2002; WYNN et al., 2004). À medida que os parasitos amadurecem, acasalam e iniciam a oviposição (fase aguda-postural), ocorre a mudança no tipo de resposta imune, os componentes Th1 diminuem e há o surgimento de uma forte resposta do tipo T helper 2 (Th2) (ANDERSON; ENABULELE, 2021). A resposta de perfil Th2 na infecção por *Schistosoma* é induzida, principalmente, por antígenos secretados pelo ovo (WEERAKOON et al., 2015). Essa resposta é caracterizada pela presença de linfócitos T CD4+, aumento de interleucinas (IL-4, IL-5, IL-10, IL-13), eosinófilos, produção de IgE e polarização de macrófagos para o fenótipo M2 (FAIRFAX et al., 2012; McMANUS et al., 2020).

Os ovos de *Schistosoma* que não são excretados, são retidos em órgãos e induzem uma resposta imune granulomatosa do hospedeiro (SCHWARTZ; FALLON, 2018). O granuloma consiste em uma lesão inflamatória, com células imunes organizadas, e é frequentemente produzido em resposta a um agente infeccioso ou substância estranha (CHUAH et al., 2014), sendo os granulomas gastrointestinais e hepáticos as apresentações clínicas mais comuns durante a infecção por *S. mansoni* (ALMADI et al., 2011). Além do fígado e intestino, lesões granulomatosas induzidas pelos ovos de *Schistosoma* também são relatadas no pulmão, cérebro, bexiga, pele, glândulas adrenais, baço, rim e estômago (CHEN, 1993; ROSS et al., 2002).

Na infecção por *S. mansoni* o principal local de formação do granuloma é ao redor dos ovos retidos nas vênulas capilares pré-sinusóides do fígado (GRYSSEELS et al., 2006; ROSS et al., 2002). Embora parte dos ovos depositados no intestino sejam liberados para o lúmen intestinal, estes também podem ficar retidos e induzir a formação de granulomas (HAMS et al., 2013). Os granulomas hepáticos e intestinais, ainda que pareçam semelhantes, possuem diferenças no tamanho, composição celular e na deposição de matriz extracelular (SCHWARTZ; FALLON, 2018; COSTAIN et al., 2018) (Figura 4). No que tange a composição celular, os granulomas

hepáticos possuem mais eosinófilos e células T e B do que os granulomas intestinais, que possuem mais macrófagos na fase aguda da doença. Já na fase crônica, os granulomas assemelham-se em critérios de forma e conteúdo de colágeno (SCHWARTZ; FALLON, 2018).

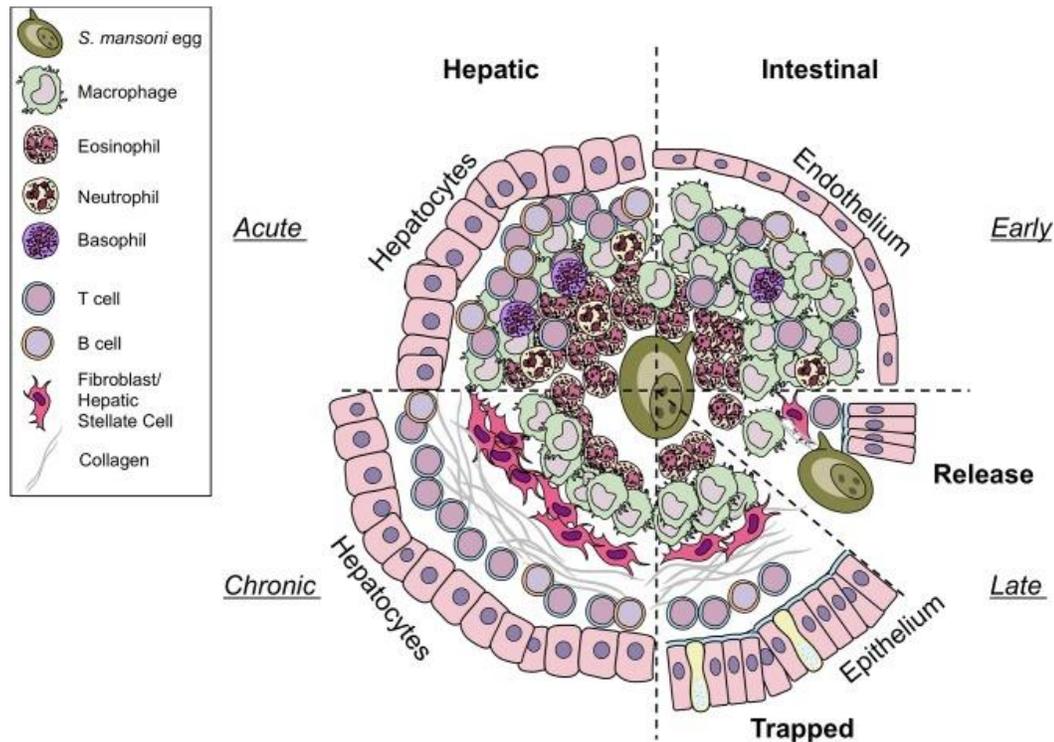


Figura 4. Diferenças na composição do granuloma hepático e intestinal. Composição do granuloma celular no fígado (esquerda) e no intestino (direita). Embora os granulomas iniciais (metade superior) possam parecer semelhantes, os granulomas intestinais abrigam menos eosinófilos, células T e células B do que os granulomas hepáticos, e mais macrófagos estão presentes. Apenas alguns neutrófilos e basófilos podem ser observados em ambos os locais. Durante os estágios posteriores (metade inferior), os ovos no fígado ficam presos e a fibrose se desenvolve. Em contraste, os ovos depositados no intestino devem ser liberados para o lúmen intestinal por mecanismos ainda não definidos. No entanto, eles também podem ficar presos e assemelhar-se a granulomas hepáticos crônicos em forma e conteúdo de colágeno. Autor: SCHWARTZ; FALLON, 2018.

O granuloma possui um comportamento duplo: ao mesmo tempo que é nocivo, pela indução da intensa reação celular, também é benéfico, pois desempenha um importante papel de proteção do hospedeiro (PEARCE; MacDONALD, 2002; SCHWARTZ; FALLON, 2018). Os ovos liberam secreções antigênicas com agentes citotóxicos potentes, logo precisam ser contidas e neutralizadas, sendo assim, diretamente o granuloma restringe esses produtos citotóxicos naquele local e impede o dano a outras células adjacentes (BOROS et al., 1989). Entretanto, caso o granuloma não seja bem modulado pela resposta imune do hospedeiro, poderá evoluir para depósitos de fibrose

(LENZI et al. 1998; SCHWARTZ; FALLON, 2018). A fibrose consiste na deposição excessiva de tecido fibroso para substituição do tecido lesado, interrompendo o fluxo sanguíneo e ocasionando a hipertensão portal (CHUAH et al., 2014). Os sintomas clínicos da esquistossomose durante a fase crônica são atribuídos à fibrose relacionada à intensidade da resposta inflamatória granulomatosa induzida por substâncias liberadas pelos ovos do parasito (LENZI et al., 1998).

Em relação ao papel das citocinas no desenvolvimento da infecção, a IL-4 é responsável por determinar o tamanho do granuloma, induzindo a proliferação de linfócitos produtores de citocinas Th2, e aumenta os efeitos da IL-13 (FALLON et al., 2000). Tanto a IL-4 e IL-13 desempenham um papel importante na formação do granuloma ao redor do ovo (DE JESUS et al., 2004), estimulando os fibroblastos na produção de colágeno (FAIRFAX et al., 2012). No entanto, a IL-13 é relacionada fortemente a fibrose hepática e conseqüentemente a hepatoesplenomegalia (FALLON et al., 2000; CHIARAMONTE et al., 2001; JESUS et al., 2004). Na ausência de IL-13, ou quando a capacidade de IL-13 de se ligar ao seu receptor associado à célula é bloqueada, a fibrose hepática é significativamente reduzida (FAIRFAX et al., 2012).

À medida que a infecção progride para um estágio mais crônico, ocorre a imunomodulação da resposta Th2, que é impulsionada pela IL-10 e TGF- β , que induzem células T reguladoras (Tregs), realizarem um equilíbrio das respostas Th1/Th2 (PEARCE; MacDONALD, 2002; WYNN et al., 2004). Essa modulação da resposta imune é essencial para promoção da sobrevivência do hospedeiro definitivo durante a infecção por *Schistosoma*, pois reduz a resposta inflamatória, o tamanho do granuloma e a formação da fibrose (CHUAH et al., 2014).

2.4 TRATAMENTO DA ESQUISTOSSOMOSE

Uma das formas de controle da esquistossomose consiste na quimioterapia preventiva de pacientes infectados (NEWLMAN, 2019). No entanto, essa quimioterapia preventiva, onde pessoas e comunidades são alvo de tratamento em larga escala, é realizada somente em 51 países endêmicos, com transmissão moderada a alta (WHO, 2022).

O tratamento de pacientes com esquistossomose reduz a carga parasitária do hospedeiro, como uma forma de prevenir a transmissão da doença, e impede a evolução para um estágio crônico (PORDEUS et al., 2008; BRASIL, 2014). Entre as drogas existentes com ações anti-

esquistossomóticas, duas são bastante associadas ao tratamento da doença: Oxamniquina (OX) e Praziquantel (PZQ) (BONESSO-SABADINI et al., 2002; ARAUJO et al., 2008). Na década de 1970, a Oxamniquina foi bastante utilizada no tratamento individual e em massa da esquistossomose mansoni, apresentando resultados satisfatórios quanto à eficácia (KATZ, 1980, SILVEIRA et al., 1989). Em 1977, Praziquantel foi descrito como um fármaco de amplo espectro anti-helmíntico, com boa atividade terapêutica e poucos efeitos colaterais (GÖNNERT; ANDREWS, 1977; DOENHOFF et al. 2002).

O PZQ tornou-se o principal medicamento utilizado no tratamento da esquistossomose, indicado pela Organização Mundial da Saúde (OMS), por sua eficiência contra as três principais espécies de *Schistosoma* que parasitam humanos e custo significativamente mais baixo (SILVA et al., 2017; NEWLMAN, 2019). A Oxamniquina possui eficácia apenas contra infecções por *S. mansoni* (PICA-MATTOCCIA; CIOLI et al., 1997; CHEVALIER et al., 2019) e exige grandes tanques de fermentação para a síntese biológica em seu processo de fabricação, resultando em um custo elevado, quando comparado ao PZQ (ARAUJO et al., 2008).

A preparação comercial de PZQ consiste em uma mistura racêmica, constituída de dois enantiômeros: R (-) levo-praziquantel e do isômero S (+) dextro-praziquantel (Figura 5) (CIOLI et al., 2014; OLLIARO et al., 2014). A maioria dos estudos avaliam a droga racêmica, no entanto, quando avaliados separadamente existe uma grande discussão a respeito do papel de cada enantiômero (WU et al., 1991; MEYER et al., 2009; MEISTER et al., 2014; KOVAC et al., 2017). De maneira geral, o enantiômero R (-) exibe maior atividade anti-esquistossomóticas, tanto em *in vivo* e *in vitro* (ANDREWS et al., 1983; LIU et al., 1986; XIAO et al., 1989; WU et al., 1991; KOVAC et al., 2017).

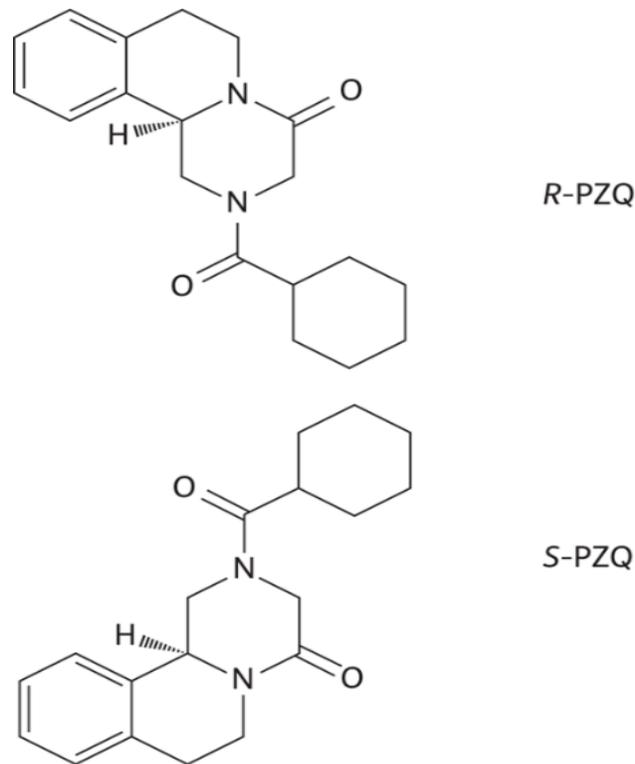


Figura 5. Fórmulas estruturais de R-PZQ e S-PZQ.
 Fonte: Olliario; Delgado-Romero; Keiser, 2014).

De acordo com a nomenclatura IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry), o nome químico do PZQ é *(RS)*-2-(cyclohexylcarbonyl)-1,2,3,6,7,11*b*-hexahydro-4*H*-pyrazino (2,1-*a*) isoquinolin-4-one, uma substância sólida, existindo como um pó cristalino branco, com ponto de fusão entre 136 e 140 °C, estável em condições normais, insolúvel em água e moderadamente solúvel em etanol e solventes orgânicos, como clorofórmio e dimetilsulfóxido (CIOLI; PICA-MATTOCCIA, 2003). O PZQ é apresentado em formato de comprimido, com administração via oral, com dose variável entre 40 e 60 mg/kg (CIOLI et al., 2014). O índice de cura da esquistossomose com o uso do praziquantel variam de 60% a 90%, associada à substancial redução da carga parasitária (GÖNNERT; ANDREWS, 1977; PELLEGRINO et al., 1977).

Os mecanismos de ação de PZQ sobre os vermes adultos podem ser definidos em três: (i) influxo de cálcio, (ii) contração muscular e (iii) modificações na superfície do parasito (CIOLI et al., 2014). A hipótese para a ocorrência desses mecanismos é que o influxo de cálcio é o “evento-chave”, que por sua vez provocará as contrações musculares e alterações tegumentares do parasito

(ANDREW, 1985; GREENBERG, 2005). O Praziquantel atua na permeabilidade de cálcio nos canais iônicos na membrana do tegumento e células musculares do helminto (KOHN et al., 2001; DOENHOFF et al., 2008), aumentando a concentração desse íon nos vermes provocando a vacuolização, o que ocasiona a destruição tegumentar (LAMBERTUCCI et al., 1982). Concentrações mínimas (0,1 µg/mL) de PZQ em estudos *in vitro* demonstram que são suficientes para iniciar a contração imediata da musculatura do verme, constatada pela cessação dos movimentos espontâneos e redução do comprimento (PICA-MATTOCCIA; CIOLI, 2004).

Outro efeito observado consiste em alterações morfológicas observadas microscopicamente no tegumento do verme, representadas pela vacuolização do tegumento, desintegração superficial (BECKER et al., 1980; MEHLHORN et al., 1981; ANDREWS et al., 1983; CHAN et al., 2013); perda de tubérculos; e alterações no intestino (ALVES et al., 2020). Estudos *in vivo* utilizando 200 mg/kg de PZQ, via subcutânea, demonstraram que PZQ pode causar alterações estruturais em vermes maduros de *Schistosoma*, após 15 minutos de tratamento (SHAW; ERASMUS, 1983). As alterações morfológicas ocasionadas por PZQ em *Schistosoma* são acompanhadas por uma exposição aumentada de antígenos do parasito na superfície do verme, tornando-o mais suscetível a ação do sistema imunológico de hospedeiro (HARNETT; KUSEL, 1986; TRAINOR-MOSS; MUTAPI, 2016).

Já em relação aos efeitos bioquímicos do PZQ em *Schistosoma* estão a redução do nível de glutathiona (GSH) (RIBEIRO et al., 1998); inibição do sistema excretor do verme macho (OLIVEIRA et al., 2006); inibição da captação de nucleosídeos (ANGELUCCI et al., 2007); e aumento na atividade de transportadores que podem mediar a resistência a múltiplas drogas (MDR) (MERSELLI et al., 2009; KASINATHAN et al., 2011). Entretanto, a descrição completa dos modos de ação de PZQ ainda não estão esclarecidas (DOENHOFF et al., 2008; GREENBERG, 2005).

O PZQ tem ação esquistossomicida contra ambos os sexos de *S. mansoni* (GÖNNERT; ANDREWS, 1977; PICA-MATTOCCIA; CIOLI, 2004), mas ao comparar o dano tegumentar induzido pelo fármaco entre os sexos, aparentemente, o dano é maior em vermes machos do que em fêmeas (SHAW; ERASMUS et al., 1983; COELI et al., 2013). Dados como a redução no número de vermes machos de *Schistosoma* (COELI et al., 2013; LAMBERTON et al., 2017; ABOU-EL-NAGA et al., 2019) e maior dano tegumentar em machos, após o tratamento com PZQ

em relação as fêmeas, podem ser justificados devido a localização das fêmeas (COELI et al., 2013). As fêmeas de *S. mansoni* quando acasaladas, costumam viver no canal ginecóforo do macho, localização que pode conferir proteção física contra as atividades de PZQ (COLLEY et al., 2014).

O tratamento com PZQ também é associado a redução da fecundidade em vermes adultos (SHAW; ERASMUS et al., 1988; LAMBERTON et al., 2017; ABOU-EL-NAGA et al., 2019). Embora não haja pleno conhecimento se esta redução é temporária ou permanente, esse resultado traz implicações importantes: (I) Em relação a morbidade, visto que uma das características da doença é a formação de granulomas, uma reação inflamatória ao redor dos ovos, que ficam retidos em órgãos do hospedeiro vertebrado (SCHWARTZ; FALLON, 2018), portanto este efeito é desejável que seja permanente, pois quanto menor a produção de ovos, menor a morbidade e transmissão associada (BOROS, 1989); (II) Para os programas de controle e monitoramento da eficácia do tratamento da esquistossomose, visto que o diagnóstico é baseado, principalmente, na contagem dos ovos, portanto se esta redução na produção de ovos for temporária, poderá influenciar nos resultados dos diagnósticos de determinada área/paciente (LAMBERTON et al., 2017).

Apesar de PZQ ser indicado e utilizado há mais de 40 anos pelos programas de controle da esquistossomose no mundo, pela sua segurança, eficácia, custo e facilidade de distribuição, ainda possui algumas limitações em seu uso (CIOLI et al., 2014): (i) PZQ é licenciado apenas para maiores de 4 anos de idade, sabor extremamente amargo e comprimido grande (FAUST et al., 2020); (ii) PZQ não possui eficácia contra as formas jovens do parasito, um fenômeno que ainda não é totalmente esclarecido (CIOLI et al., 2014; CUPIT; CUNNINGHAM, 2015).

Por ser o único fármaco utilizado em massa e em tratamentos recorrentes levanta discussões sobre o surgimento de cepas menos sensíveis ao PZQ (ARAUJO et al., 2008; LIANG et al., 2008; ABOU-EL-NAGA et al., 2019; ABOU-EL-NAGA, 2020; CHEVALIER et al., 2023), levando muitas pesquisas a investigarem novas possibilidades de formulações, novas drogas eficazes, associações ao fármaco já utilizado e até mesmo vacinas (CIOLI, 2000; ARAUJO et al., 2008a; ARAUJO et al; 2008b; TRAINOR-MOSS; MUTAP, 2016; MOLEHIN, 2020). Logo, para que questionamentos ainda em aberto sobre a ação de PZQ e atualizações no tratamento sejam realizados, são necessários estudos para compreender o papel do Praziquantel na resposta imune dos hospedeiros infectados por *Schistosoma*.

2.5 IMUNOPATOLOGIA DO TRATAMENTO COM PRAZIQUANTEL EM HOSPEDEIROS VERTEBRADOS INFECTADOS POR *Schistosoma*

Além do efeito anti-esquistossomótico apresentado por PZQ, pesquisas sugerem também propriedades anti-inflamatórias (ZHANG, 1993; HE et al., 2005; RIBEIRO-DOS-SANTOS et al., 2006; HUANG et al., 2011; EL-LAKKANY et al., 2012). Sua administração tem a capacidade de reduzir a área dos granulomas, o número de fibroblastos e de células inflamatórias dentro dos granulomas (neutrófilos, eosinófilos e macrófagos) (BOTROS et al., 1984; YANG et al., 1984; HUANG et al., 2011; CHUAH et al., 2016).

Na fase aguda da doença, o aumento na contagem de eosinófilos circulantes ocorre entre 3-8 semanas pós-infecção, concomitante as migrações do esquistossômulo, amadurecimento do verme, início da oviposição e o aparecimento destas células no granuloma (WARREN et al., 1967). Os eosinófilos possuem a capacidade de matar o esquistossômulo e de participar como células efetoras contra os ovos do parasito (BUTTERWORTH et al., 1974; JAMES; COLLEY, 1976). Nos achados de Rabello et al. (1977) foi observada redução significativa na contagem destas células em pacientes infectados por *S. mansoni* (esquistossomose aguda), após 2 meses do tratamento com PZQ. Além da diminuição dos eosinófilos, também foi observada a diminuição na quantidade de anticorpos IgM para antígeno solúvel de verme adulto (SWAP) e IgG e IgA para SEA (RABELLO et al., 1977). Na esquistossomose aguda causada por *S. japonicum* esses mesmos resultados também foram encontrados, entretanto seis meses após o tratamento (YUESHENG et al., 1994).

Em relação aos macrófagos, estes são os principais mediadores da resposta imune durante infecções (BENDOLAN et al., 2007) e podem ser classificados em dois principais grupos: (i): macrófagos ativados classicamente (macrófagos M1), que exibem funções pró-inflamatórias e microbicidas e; (ii): macrófagos ativados alternativamente (macrófagos M2), que têm funções imunorreguladoras e reparadoras de tecidos (BENOIT et al., 2008). Nos estágios iniciais da infecção por *Schistosoma*, os macrófagos hepáticos e peritoneais são do tipo M1. Com a mudança da resposta Th1 para Th2, os macrófagos polarizam-se para o tipo M2 (BARRON; WYNN, 2011; LICÁ et al., 2023). Nos estudos de Kong et al. (2017), o tratamento com PZQ (300 mg/kg), após 12 semanas de infecção por *S. japonicum*, reduziu o número de macrófagos (M1), na atividade fagocítica e melhora na função fisiológica do baço em camundongos BABL/c.

Os macrófagos M1 podem promover inflamação, por meio da regulação do inflamassoma (NLRP3) na fase crônica da infecção por *S. japonicum* (KONG et al., 2020). Este inflamassoma é um complexo multiprotéico formado no citoplasma (FRANCHI et al., 2010), que desempenha um papel importante na imunidade inata, pois ativa a caspase-1 e a produção de IL-1 β e IL-18 (LAMKANFI; DIXIT, 2014). Ao realizar o pré-tratamento com diferentes concentrações de PZQ, Kong et al. (2020) observaram que PZQ suprimiu a expressão de IL-1 β e NLRP3 em macrófagos M1. Neste mesmo estudo também foi observado, que na presença de PZQ, a expressão de miR-21 foi consideravelmente diminuída em macrófagos M1 RAW 264.7. MicroRNAs (miRs) são pequenos RNAs endógenos, de fita simples e não codificantes, com a função principal de inibir a expressão gênica no nível transcricional (BARTEL, 2009). O miR-21 está relacionado com a ocorrência e progressão da inflamação hepática e fibrose (ZHANG et al., 2013; HE et al., 2015). Desta forma, os achados de Kong et al. (2020) indicam que PZQ pode regular a resposta inflamatória inibindo a expressão do miR-21, o que possivelmente promoveria uma melhora no quadro clínico da esquistossomose.

Durante a fase crônica da esquistossomose intestinal, granulomas se desenvolvem ao redor dos ovos retidos em órgãos, induzindo o reparo tecidual excessivo, levando a fibrose hepática (SHAKER et al., 2014). Liu et al. (2019) demonstraram que PZQ foi capaz de reduzir a fibrose hepática induzida por tetracloreto de carbono (CCl₄) em camundongos. Essa redução na fibrose ocorreu a partir da expressão de Smad7, em células estreladas hepáticas (HSCs), induzida por PZQ. Smad7 é um antagonista intracelular da sinalização do TGF- β , que é um mecanismo subjacente da proteção mediada por praziquantel contra a fibrose hepática (LIU et al., 2019). As HSCs são as principais células produtoras de colágeno durante a fibrose hepática (FRIEDMAN, 2008), logo quando Smad7 não é expresso, há ativação de HSC, e conseqüentemente a fibrose hepática (DOOLEY et al., 2003; DOOLEY et al., 2008; FENG et al., 2015). Apesar do foco deste trabalho ser a esquistossomose, estudos como o de Liang et al. (2011) e Liu et al. (2019) além de demonstrarem alvos e mecanismos de ação de PZQ na fibrose hepática ocasionada por *Schistosoma*, também apontam uma perspectiva clínica do uso do fármaco no tratamento de outras doenças fibróticas no fígado (LIANG et al., 2011; LIU et al., 2019).

Nos estudos de Brindley e Sher (1987) a eficácia de PZQ foi comparada entre camundongos infectados por *S. mansoni*, com depleção de células B e imunologicamente intactos. Os resultados

observados demonstraram que os camundongos com depleção de células B possuíam a ação esquistossomicida reduzida. Após realizada a transferência de soro imune de camundongos doadores infectados por *S. mansoni* na fase aguda, a eficácia de PZQ foi restaurada (BRINDLEY; SHER, 1987). Dessa forma, observa-se que PZQ possui ação sinérgica com a resposta imune do hospedeiro (BRINDLEY; SHER, 1987; ZOU et al., 2010).

Na infecção experimental murina por *Schistosoma*, as células T reguladoras (T regs) estão associadas a mecanismos imunorreguladoras, controlando as respostas Th1 e Th2, e a morbidade da infecção (BAUMGART et al., 2006; TAYLOR et al., 2006). Estudos desenvolvidos com humanos infectados por *S. mansoni* (WATANABE et al., 2007) e *S. haematobium* (LABUDA et al., 2020) demonstraram que após o tratamento com PZQ, as proporções de células Treg diminuem, possivelmente devido à remoção da exposição constante aos antígenos dos vermes.

Após 40 anos de uso de PZQ como medida de controle e tratamento da esquistossomose, o medicamento continua a ser objeto de estudo de diversas pesquisas. Pesquisas voltadas para as lacunas em seus mecanismos de ação e conseqüentemente aumento da eficácia do tratamento, em associação a outras substâncias, desenvolvimento de vacinas entre outras perspectivas. Entretanto, nota-se que as pesquisas voltadas para os efeitos de PZQ no tratamento da esquistossomose causada por *S. mansoni*, única espécie encontrada na América do Sul, são mais antigas e ainda carecem de estudos a respeito de seu efeito na resposta imune. Baseado na necessidade de entender um pouco mais sobre o efeito de PZQ na resposta imune, este trabalho avaliou o efeito do tratamento em camundongos, infectados experimentalmente por *S. mansoni*, em dois tempos da infecção – fase aguda (60 dias) e fase crônica (90 dias).

3 OBJETIVOS

3.1 GERAL

Revisar os efeitos e modos de ação de Praziquantel em *Schistosoma* e investigar o efeito deste fármaco na resposta imune induzida durante as fases aguda e crônica da infecção experimental por *S. mansoni*.

3.2 ESPECÍFICOS

- Revisar os principais mecanismos de ação de Praziquantel e novas perspectivas terapêuticas já descritos.
- Comparar os efeitos na resposta imune do Praziquantel em animais infectados por *S. mansoni* durante 60 e 90 dias.
- Caracterizar o perfil de citocinas dos padrões Th1, Th2 e Treg nas culturas de células do baço de camundongos infectados por *S. mansoni* e tratados com Praziquantel.
- Caracterizar o perfil imunofenotípico de células de baço de camundongos infectados por *S. mansoni* e tratados com Praziquantel.
- Analisar as alterações histopatológicas nos tecidos hepático e intestinal de camundongos infectados por *S. mansoni* e tratados com Praziquantel.

4 RESULTADOS

4.1 CAPÍTULO I: PRAZIQUANTEL: AN UPDATE ON THE MECHANISM OF ITS ACTION AGAINST SCHISTOSOMIASIS AND NEW THERAPEUTIC PERSPECTIVES

- Artigo de Revisão produzido na disciplina de Seminários II
- Revista Molecular & Biochemical Parasitology
- Qualis CAPES (2017-2020): A4
- Fator de impacto: 1.759.



Contents lists available at ScienceDirect

Molecular & Biochemical Parasitology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/molbiopara

Review

Praziquantel: An update on the mechanism of its action against schistosomiasis and new therapeutic perspectives



Ranielly Araujo Nogueira^a, Maria Gabriela Sampaio Lira^{a,b}, Irla Correia Lima Licá^a, Gleycka Cristine Carvalho Gomes Frazão^a, Vitor Augusto Ferreira dos Santos^a, Antonio Camilo Correia Mendes Filho^c, João Gustavo Mendes Rodrigues^d, Guilherme Silva Miranda^e, Rafael Cardoso Carvalho^a, Flávia Raquel Fernandes Nascimento^{a,f,*}

^a Graduate Program in Health Sciences, Center for Biological and Health Sciences, Federal University of Maranhão, São Luís, MA, Brazil

^b Department of Education, Federal Institute of Education, Science and Technology of Maranhão, Zé Doca, MA, Brazil

^c Undergraduate Medicine Faculty, Center for Biological and Health Sciences, Federal University of Maranhão, São Luís, MA, Brazil

^d Department of Parasitology, Institute of Biological Sciences, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil

^e Department of Education, Federal Institute of Education, Science and Technology of Maranhão, São Raimundo das Mangabeiras, MA, Brazil

^f Department of Pathology, Center for Biological and Health Sciences, Federal University of Maranhão, São Luís, MA, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:
Praziquantel
Mechanisms
Molecular targets
Future prospects

ABSTRACT

Praziquantel (PZQ) is the drug of choice for the treatment of all forms of schistosomiasis, although its mechanisms of action are not completely understood. PZQ acts largely on adult worms. This narrative literature review describes what is known about the mechanisms of action of PZQ against schistosomes from *in vitro* and *in vivo* studies and highlights the molecular targets in parasites and immune responses induced in definitive hosts by this drug. Moreover, new therapeutic uses of PZQ are discussed. Studies have demonstrated that in addition to impacting voltage-operated Ca²⁺ channels, PZQ may interact with other schistosome molecules, such as myosin regulatory light chain, glutathione S-transferase, and transient receptor potential channels. Following PZQ administration, increased T regulatory type 1 (Tr1) cell differentiation and decreased inflammation were observed, indicating that PZQ promotes immunoregulatory pathways. Although PZQ is widely used in mass drug administration schemes, the existence of resistant parasites has not been proven; however, it is a concern that should be constantly investigated in human populations. In addition, we discuss studies that evaluate health applications of PZQ (other than helminth infection), such as its effect in cancer therapy and its adjuvant action in vaccines against viruses.

1. Introduction

Praziquantel (PZQ) is a pyrazino-isoquinolein derivative from the thioxantonic group with a broad anthelmintic spectrum [1] and has been used successfully in most treatments of humans infected with trematodes and cestodes (e.g., schistosomiasis, taeniasis, cysticercosis). However, infections such as fasciolosis (*Fasciola hepatica* and *Fasciola gigantica*) are refractory to PZQ, and Echinococcosis (*Echinococcus granulosus* and *Echinococcus multilocularis*) and sparganosis (*Spirometra erinacei*) are not successfully treated with PZQ [2,3].

PZQ has been strongly associated with the treatment of schistosomiasis since 1970, resulting in significant progress in the control of parasitosis [4–7]. Although it is the only drug used on a large scale by

schistosomiasis control programs worldwide (owing to its effectiveness, low cost, and ease of single-dose administration [8]), the immunopharmacological mechanisms of PZQ remain poorly understood [9].

PZQ is commercially prepared as a racemic mixture of equal parts of the R (–) isomer levo-PZQ and the S (+) isomer dextro-PZQ [10]. The R (–) enantiomer exhibits antischistosomal activity *in vivo* and *in vitro* [11–14]. The S (+) isomer is responsible for side effects and bitter taste [13,15], and its schistosomicidal action is controversial, exhibiting little or no activity [2,12,16–18].

However, the mechanisms involved in the action of PZQ are not fully understood. This review aims to highlight PZQ targets in *Schistosoma*, the mechanisms of action in the adult worm, the characterization of its immunological activity in humans, and possible new therapeutic uses of

* Corresponding author at: Graduate Program in Health Sciences, Center for Biological and Health Sciences, Federal University of Maranhão, São Luís, MA, Brazil.
E-mail address: flavia.nascimento@ufma.br (F.R.F. Nascimento).

PZQ.

2. Methods and criteria for literature selection

This narrative literature review was performed using recognized databases, including PubMed, SciELO, LILACs, and MEDLINE, and covered original and review articles published between 1977 and 2022. Articles involving *in vitro* and/or *in vivo* experiments were included to address the mechanisms of action of PZQ in the treatment of schistosomiasis and to highlight other possible applications of the drug.

To search for these articles, we used the following descriptors: "Praziquantel synergic," "Praziquantel adjuvant use," "Immunology praziquantel *Schistosoma*," and "Immunology praziquantel action *Schistosoma*." This study did not review the research involving coinfections, strict epidemiological studies, or diagnostic methods for schistosomiasis.

3. Molecular targets of praziquantel and mechanisms of action in *Schistosoma*

The molecular targets and modes of action of PZQ remain unclear. However, the most accepted hypothesis is that it disrupts calcium homeostasis in adult worms by interacting with and modulating voltage-operated Ca^{2+} channels (VOOC) [19–22]. In Table 1, we present studies on schistosome macromolecules that interact with PZQ, such as myosin regulatory light chain [23], glutathione *S*-transferase [24–26], adenosine receptor [27], G-protein-coupled receptor ligand [28], transient receptor potential (TRP) channels [3,29], and trypanredoxin peroxidase (C1LV40) [26].

Chienwichai et al. [26] revealed new mechanisms of PZQ related to

protein folding and proteolysis via degradation pathways associated with the endoplasmic reticulum in their research on *Schistosoma mekongi*. This may represent a novel parasitocidal mechanism.

When analyzing possible molecular targets, Chan et al. [28] observed that PZQ and R (-) isomer affect the serotonergic G-protein-coupled receptor (GPCR) ligand and micromolar low-affinity partial agonist of 5-HT_{2B} receptors in humans, respectively. Thus, activity at both parasite and host receptors, with GPCRs as potential targets, likely contributes to the clinical effectiveness of PZQ by favoring a deleterious paralytic effect on the parasite and facilitating its elimination. Thus, although VOOC is the leading target of PZQ, other targets may also be involved in its mechanism of action [30].

As per the World Health Organization (WHO), several factors make PZQ the treatment of choice against the three main species causing schistosomiasis, use in large-scale treatments, effectiveness (even with low activity against the immature stages of the parasite and without full knowledge of its mechanisms of action), low cost, and ease of distribution [8].

The efficacy of PZQ varies according to the developmental stages of *Schistosoma*. Although there is unanimity about PZQ sensitivity being more significant in adult (mature) worms, the same in juvenile stages is not clear yet. The 21-day worms are always identified as the period with the lowest sensitivity to PZQ [31–35]. Some studies have reported that juvenile schistosomes (3–14 days) have a lower sensitivity to PZQ [31, 32, 33, 35]. Other studies have pointed to this reduced effectiveness of PZQ up to the 7th day of development [34,36–38] or 28 days of development [19,28].

The efficacy of PZQ is related to the time of infection, sex of worms, and pairing status. A possible reason for the low sensitivity of unpaired worms to PZQ is that they cannot migrate to the mesenteric veins and liver, which could hypothetically protect them from the effects of drugs [39,40]. PZQ exhibits schistosomicidal action against both sexes; however, it is less effective against unpaired females and, therefore, juveniles but fully effective against individual male worms [1]. Mature male and female worms of *S. mansoni* in bisexual infections are more sensitive to the effects of PZQ than males and females in unisexual infections (*in vitro/in vivo*) [39].

Three effects of PZQ on *S. japonicum* and *S. mansoni* have been highlighted in the literature: stimulation of the worm's motor activity, muscle contraction, and vesicle formation in integuments [41,42]. After exposure to the drug, the initial effects of PZQ on *Schistosoma* include involuntary rapid contractions and paralysis due to membrane depolarization accompanied by a rapid influx of Ca^{2+} inside the parasite [41, 43,44]. Consequently, the worms lose muscle tension. They are released from the mesentery and transported via the hepatic portal circulation to the liver [39]. *In vitro*, the exposure of mature worm cultures of *S. mansoni* to 0.1 µg/mL PZQ induces an almost immediate contraction of the worm musculature, as ascertained by the cessation of spontaneous movements reduced in worm length [39]. This effect is strongly related to ion channels highlighted as molecular targets in Table 1.

Another observed effect consists of microscopically observed morphological changes in the integument of the worm, represented by vacuolization of the integument, vesicle formation, surface disintegration [9,37,45,46], loss of tubercles, and changes in the intestine [47]. Shaw and Erasmus [48] conducted *in vivo* studies using a subcutaneously administered dose (200 mg/kg) and demonstrated that PZQ caused structural changes in both male and female worms after 15 min of treatment.

In female worms, the main structural change is often extensive vacuolization of the subtegumental tissues, followed by varying degrees of structural disruption of the subtegumental and gastroduodenal muscles [48]. In contrast, in male worms, the initial effects were vacuolization of parts of the dorsal tegument and loss of integument cytoplasm due to pinching of the external surface evaginations [48].

Female worms were significantly more resistant to incubation with PZQ than male worms. After incubation with PZQ, male worms exhibit

Table 1
Molecular targets of praziquantel in *Schistosoma*.

Molecular Target	Species	Type of study	PZQ Concentration	Authors
Calcium channel	<i>S. japonicum</i>	<i>In vitro</i>	3, 6, 15 and 120 µM	Pica-Mattoccia et al. [21]
	<i>S. mansoni</i>	<i>In vivo</i>		
Calcium influx/efflux	<i>S. mansoni</i>	<i>In vitro</i>	6 µM	Pica-Mattoccia et al. [22] Kohn et al. [20]
Ca ²⁺ channel β subunit of <i>S. japonicum</i> (SjCavβ) and <i>S. mansoni</i> (SmCa _v βA).	<i>S. japonicum</i>	<i>In vitro</i>	100 µM	
	<i>S. mansoni</i>	<i>In vitro</i>		
Glutathione <i>S</i> -transferase	<i>S. japonicum</i>	<i>In vitro</i>	13 µM	McTigue et al. [24] Sheweita et al. [25]
	<i>S. mansoni</i>	<i>In vivo</i>	60 mg/kg	
Glutathione <i>S</i> -transferase	<i>S. mansoni</i>	<i>In vitro</i>	100 µM	Chan et al. [28]
		<i>In vivo</i>		
G-protein-coupled receptor ligand	<i>S. mansoni</i>	<i>In vitro</i>		
		<i>In vivo</i>		
Kinases	<i>S. mekongi</i>	<i>In vitro</i>	40 µg/mL	Chienwichai et al. [26]
Nucleoside (adenosine and uridine)	<i>S. mansoni</i>	<i>In vitro</i>	Lower concentrations than the LC50 (2.4 µM)	Angelucci et al. [27]
		<i>In vivo</i>		
Regulatory myosin Light Chain	<i>S. mansoni</i>	<i>In vivo</i>	1, 5, 10, and 20 µg/mL	Gnanasekar et al. [23]
		<i>In vitro</i>		
Transient receptor potential melastatin ion channel (<i>Sm</i> . TRPM _{PZQ})	<i>S. mansoni</i>	<i>In vitro</i>	< 1, 1, 10 and > 10 µM	Park et al. [3]
		<i>In vitro</i>		

muscle shrinkage with generalized vacuolization, in addition to integument and sub-integument degeneration [49]. The integument interferes with the interaction of the host's immune system molecules with antigens, allowing the helminth to go undetected and be destroyed by the immune system [44]. Damage to the integument renders the parasite vulnerable to the host immune system. Minimum effective concentrations of PZQ for increasing motor activity and initiating contraction of the development stages in *S. mansoni* and *S. japonicum* *in vitro* are similar, 0.005–0.1 µg/mL and 0.005–0.05 µg/mL, respectively [42]. In *S. mekongi*, 40 µg/mL PZQ eliminated 46.7% of adult worms, which was defined as the IC50 [26].

In vivo studies in mice demonstrated the effects of PZQ on fertility in adult worms; survivors of PZQ treatment exhibited a significant reduction in oviposition [50]. Inhibition of oviposition is of great interest because one of the characteristics of the disease is granuloma formation, an inflammatory reaction around eggs that are retained in organs such as the liver and intestine of the vertebrate host [51]. However, it remains unclear whether the reduction in fertility is permanent. From the perspective of virulence, a permanent effect is desirable: the lower the egg production, the lower the morbidity and associated transmission [52]. However, if this reduction in egg production is temporary, it may increase concerns regarding possible drug resistance and will influence the results of diagnostic methods based on the presence of eggs, such as Kato-Katz [49].

4. Praziquantel and immune response

The chronic phase of schistosomiasis is characterized by the development of granulomas around the eggs retained in the liver, which induces excessive tissue repair [53], leading to liver fibrosis and splenomegaly, which cannot be reversed [54].

Macrophages are essential components of immunity in the spleen [55,56], and the reduction in the number of classically activated macrophages (M1) after 4 weeks of treatment with PZQ demonstrates an anti-inflammatory effect and the improvement of splenic function in mice infected with *S. japonicum*. Long-term treatment, but not the routine dosage of PZQ, can effectively improve splenic complications [53].

The anti-inflammatory action of PZQ was also investigated by Kong [54], who demonstrated that this drug suppresses the expression of interleukin (IL) 1 beta (IL-1β) and the NLRP3 inflammasome in M1 macrophages (Table 2). The NLRP3 inflammasome plays a key role in modulating liver inflammation and fibrosis, and its activation is linked to the pro-inflammatory cytokine IL-1β produced by M1 macrophages, which are involved in infectious diseases [57–59].

Cytokines are essential regulators of immune-inflammatory responses and play an important role in the development of infections [60]. In the granulomatous phase of the infection, increased levels of interferon-gamma (IFN-γ) and IL-17 are observed [61,62], which are pro-inflammatory cytokines that play key roles in the development of hepatic fibrosis [62–66]. Studies by Femoe et al. [61], Okonjo and Ogoyi [67], and Martins-Leite [32] showed a reduction in the levels of these cytokines after treatment with PZQ. Martins-Leite [68] reported a decrease in IFN-γ after treatment, mainly in groups with fibrosis, indicating that the regulatory mechanism of this cytokine is active and that the effectiveness of PZQ in reducing the parasite load is important for altering the immune response.

The efficacy of PZQ against *S. mansoni* is markedly reduced in immunosuppressed mice by T cell deprivation and B cell depletion [32], which indicates a possible association between PZQ and the immune response. Brindley and Sher [69] used two groups of infected C3H/HeN mice: immunologically competent (naive) and B cell depleted. PZQ failed to significantly reduce the adult burden in immunosuppressed mice. However, the regular action of the compound could be restored by passive transfer of immune serum from infected donor mice for 6 weeks and partially restored with purified IgG from the same serum [69] (Table 2), indicating that the efficacy of PZQ is dependent on the host antibody response.

In a study by Brindley and Sher [69], IgG and IgM antibodies were detected by immunofluorescence on the surface of adult worms recovered from naive mice after 1 h of PZQ administration *in vivo*. Thus, antibodies bind to the surfaces of worms in immunologically competent mice immediately after treatment with PZQ [69], which exposes the antigens present on the worm surface to the host immune system, thus inducing parasite-specific immune responses [44,46,70].

The immune response against *Schistosoma* is also associated with the

Table 2
Immune response observed after praziquantel treatment.

	Immune response	Species	Assay	Experimental model	PZQ concentration	Infection time	Number of cercariae	Author
P	B cell depletion and T cell	<i>S. mansoni</i>	<i>In vivo</i>	Mice	250 mg/kg (3 ×)	4 weeks	200	Sabah et al. [32]
R	immunosuppression affects PZQ efficacy	–	<i>In vivo</i>	Human peripheral blood mononuclear cell	1 µg/mL	–	–	Eyoh et al. [44]
E	T cell activation and Tr1 differentiation	–	<i>In vitro</i>					
-								
C								
L	Interior of worms destroyed by eosinophils (host)	<i>S. mansoni</i>	<i>In vivo</i>	Mice	40 mg/kg	–	–	Mehlhorn et al. [46]
N			<i>In vitro</i>					
I			<i>In vitro</i>					
C	Formation of the NLRP3 inflammasome inhibited and phagocytic activity attenuated in M1 macrophages	<i>S. japonicum</i>	<i>In vivo</i>	Mice	250 mg/kg	12 weeks	14 ± 2	Kong et al. [53]
S	miR-21 was involved in the inhibitory effect of PZQ on activation of NLRP3 inflammasome	<i>S. japonicum</i>	<i>In vivo</i>	Mice	30, 60, and 120 nmol/L	12 weeks	14 ± 2	Kong et al. [54]
	Immunosuppression did not reduce the parasite burden	<i>S. mansoni</i>	<i>In vivo</i>	Mice	–	–	–	Brindley and Sher [69]
	Expression of Th1, Th2, and Th17 cytokines was significantly increased	<i>S. mansoni</i>	<i>In vivo</i>	Baboons	60 mg/kg (3 ×)	5 weeks	200	Melkus et al. [71]
C	Decrease in cell frequencies of T CD4 ⁺ , CD25 ⁺ , FOXP3 ⁺ cells	<i>S. haematobium</i>	<i>In vivo</i>	Human	40 mg/kg	–	–	Labuda et al. [74]
L			<i>In vivo</i>					
I	Decrease in Treg frequency	<i>S. haematobium</i>	<i>In vivo</i>	Human	40 mg/kg (2 ×)	–	–	Schmiedel et al. [75]
N			<i>In vivo</i>					
I	Reduction in percentages of CD1 ^{dhi} B cells	<i>S. haematobium</i>	<i>In vitro</i>	Mice/Human	40 mg/kg (3 ×)	14 weeks	40	van der Vlugt et al. [80]
C								
S								

activation of different T cell profiles. Melkus et al. [71] demonstrated that *S. mansoni*-infected baboons showed a decrease in the percentage of natural killer T cells after treatment with three doses of PZQ (60 mg/kg). In the same study, a significant expansion of CD8⁺ over CD4⁺ T cell populations was observed during the chronic stage of infection, which returned to baseline levels after PZQ therapy [71]. The increase in CD8⁺ T cells responds to egg antigens during this stage of infection [72], and its decrease after treatment with PZQ indicates the deactivation of the system due to fewer parasites and less inflammation.

Eyoh et al. [44] showed that PZQ promoted a significant increase in both the percentage and proliferation index of activated human CD4⁺ T cells co-stimulated by anti-CD3/CD28, thus confirming its impact on CD4⁺ T cells. Furthermore, PZQ induced a moderate increase in IL-10 production in T cells co-stimulated with anti-CD46 (after 5 days), suggesting a possible immunomodulatory role for PZQ [44].

Regulatory cells play a crucial role in the modulation of inflammatory responses, tissue damage, and granuloma formation during *Schistosoma* infection [73]. When analyzing the results of PZQ treatment against *S. haematobium* infection in children, Labuda et al. [74] and Schmiedel et al. [75] observed a decrease in the frequency of CD4⁺, CD25⁺, and FOXP3⁺ regulatory T cells after intervention with PZQ. However, these same studies demonstrated an increase in IL-10 levels (regulatory profile), suggesting that PZQ promotes immunoregulation by other cells. Eyoh et al. [44] showed that PZQ increases the percentage of type 1 regulatory T cells (Tr1 cells) *in vitro*. Tr1 cells are a class of regulatory T cells that predominantly produce IL-10 and are primarily associated with the suppression of tissue inflammation [76].

Tr1 cells are crucial for maintaining immunological homeostasis and preventing T-cell-mediated diseases [77]. This decrease in inflammation may also be facilitated by PZQ, directly promoting immune regulatory pathways [78,79]. Despite these studies, many immunological mechanisms that could be stimulated by PZQ remain unknown and constitute promising new strategies for the use of this drug [44].

5. *Schistosoma* resistance to praziquantel

Over the past 40 years, PZQ has been the only drug recommended by the WHO for the treatment of all types of human schistosomiasis. Despite its previously reported efficacy against adult *Schistosoma* worms, its prolonged, repeated, and mass use as "preventive chemotherapy" in endemic areas increases concerns regarding the development of drug resistance in the parasite [22,81,82]. Therefore, alternative medicines for repeated use are increasingly being explored for conditions in which the effectiveness of PZQ against *Schistosoma* is reduced.

Some studies have suggested that *S. mansoni* and *S. japonicum* strains are resistant or insensitive to PZQ because of their low cure rates [81, 83–85]. It has been emphasized that low efficacy is not a sign of resistance. Additionally, *S. mansoni* strains with reduced susceptibility have been identified [86–88]. For *S. haematobium*, there are no studies on the possible development of resistance to PZQ; however, repeated standard treatment with PZQ has been reported to be ineffective in eliminating infection by *S. haematobium* [89].

Another perspective on the emergence of resistance is related to the parasite's genetic code. Some studies have reported that resistance to PZQ in *S. mansoni* pertains to the inheritance and divergence of the dominant or recessive type [90–92]. Through mathematical models, the resistance of genetic origin is found to be more significant with greater impact. Because of inheritance, possible resistance genes can be passed more frequently to the next generation, which may cause greater difficulties in controlling schistosomiasis by chemotherapy in specific geographical locations [83].

Berg et al. [93] examined the genomic impact of repeated mass drug administration on *S. mansoni* populations and documented reduced PZQ efficacy. The authors identified genomic regions with selection signals, indicating gradual adaptation to long-term exposure to PZQ or other selection pressures [93].

A comparison between pre- and post-treatment populations showed that PZQ did not substantially reduce genomic diversity in a single treatment round, thus demonstrating a panmictic and highly diverse population in this study [93]. Nonetheless, further research is being promoted for PZQ derivative identification, new drug discovery, and vaccine development before PZQ becomes ineffective.

6. Praziquantel and other parasites

Since PZQ was considered a broad-spectrum anthelmintic in 1975, several studies have reported its successful use in the treatment of most diseases caused by trematodes and cestodes that affect humans and farm animals [2,94,95]. These infections include schistosomiasis, clonorchiasis, opisthorchiasis, paragonimiasis, heterofidiasis, echinostomiasis, fasciolopsiasis, neodiplostomiasis, gymnophaloidiasis, taeniasis, diphylobotriasis, hyponolepiasis, and cyanolepiasis [2].

Infections caused by *Fasciola hepatica*, *Fasciola gigantica*, and larval cestodes, particularly hydatid disease and sparganosis, are not successfully handled by PZQ and require the use of alternative drugs. [2]. Becker et al. [45] demonstrated that vacuolization occurred in the tegument of *S. mansoni* and *D. dendriticum*; *F. hepatica* did not show any change in response to PZQ treatment (0, 1, 10, and 100 µg/mL). It is possible that *F. hepatica* has an exceptionally thick outer integumental layer (up to 20 µm) with a greater number of mitochondria than that of other trematodes, and its surface is much less elaborate, with only small superficial cavities [45].

The evaluation of the mechanisms of action of PZQ in flatworms showed that the insensitivity of *F. hepatica* to the drug is related to the transient receptor potential melastatin ion channel (TRPM_{PZQ}), which is one of the targets of *Schistosoma*. A single amino acid change in *F. hepatica* TRPM_{PZQ} binding to mimic the TRPM of *Schistosoma* rendered *F. hepatica* sensitive to PZQ [3]. Studies of this type have demonstrated that single-point mutations can eliminate or initiate a response to PZQ. This study demonstrated the natural occurrence of a channel insensitive to PZQ [45], thus aiding studies investigating the effectiveness of drugs.

7. Other uses for the antiparasitic drug praziquantel

The investigation of new possible uses for "old" drugs has become a trend known as "drug repurposing," as it is an efficient approach to rediscovering unique benefits for existing drugs with known pharmacokinetic profiles while reducing the time and cost of developing new drugs [96]. PZQ has been used in studies on cancer therapy and the manufacture of vaccines, which is unusual because it is a well-known antiparasitic. Table 3 summarizes these studies.

Cancer therapy has numerous challenges, including drug resistance and side effects. With the opening of this line of investigation to new possibilities for the use of known drugs, Wu et al. [97] analyzed the efficacy of PZQ in combination with paclitaxel (PTX). A xenograft model of *athymic nude mice* (BALB/c) was used with PTX-resistant DLD-1 cells (a human colon cancer cell line). Preclinical data demonstrated that co-treatment with PZQ and PTX suppressed tumor growth compared to treatment with only PTX or PZQ. This combination resulted in a > 50% reduction in tumor weight compared to that in the control group.

This test also demonstrated that PZQ significantly induced mitotic arrest in the G2 phase caused by PTX and apoptosis in DLD-1 and H1299 cells (non-small cell lung carcinoma cells). A possible mechanism of this synergistic efficacy is the marked decrease in the expression of the X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP), an anti-apoptotic protein [97]. The inhibition of XIAP may reduce tumorigenicity and increase the therapeutic sensitivity of cancer cells, making it a target for tumor treatment [98,99]. Briefly, the combination of these drugs resulted in a more pronounced inhibition of tumor growth than that of other drugs alone, demonstrating that they represent a possible anticancer strategy and are effective, particularly for PTX-resistant tumors [97] (Table 3).

For the vaccine manufacturing process, PZQ as an adjuvant in

Table 3
Possible other uses of the anthelmintic praziquantel (PZQ).

Objective	Used dose	Results	Author
To analyze the effect of PZQ in association with paclitaxel (PTX) in cancer therapy (<i>in vivo</i>).	PZQ (100 mg/kg) and PTX (30 mg/kg).	Co-treatment of PZQ and PTX suppressed tumor growth.	Wu et al. [97]
PZQ may be used as an adjuvant for a hepatitis B surface antigen (HBsAg) DNA vaccine (pCD-S2).	Initially dissolved in ethanol vehicles and subsequently diluted to 1.0%, 0.5% and 0.25% with the saline solution.	PZQ can possibly enhance humoral and cellular responses to HBsAg DNA vaccination through inhibition of TGF-beta/Smad2, -3 signaling.	Zou et al. [100]
PZQ could act as an adjuvant to overcome the lack of potent CTL responses by HBV DNA vaccination in mice.	Initially dissolved in ethanol vehicles and subsequently diluted to 1.0%, 0.5% and 0.25% with the saline solution.	PZQ may be an effective adjuvant to facilitate Tc1 and Tc17 responses to HBV DNA vaccination, inducing broad CD8 (+) T cell-based immunotherapy that breaks tolerance to HBsAg.	Zou et al. [101]
Combination of PZQ with vaccine against avian influenza (H5N1).	0.5 µg PZQ/0.1 µg antigen	Reduced viral loads in lung tissues and prolonged survival.	Zou et al. [102]
Synergistic use of PZQ and cimetidine (CIM) in the manufacture of vaccines against hepatitis virus (HBV).	0.5% CIM + 0.25; 0.5; 1% PZQ	The antigen-specific CTL response was significantly elevated, which is crucial for eradication of HBV-infected cells.	Xie et al. [103]
Test PZQ to treat psoriasis.	PZQ 30 mg/kg; 100 mg/kg	Suggest that PZQ alleviates symptoms in mice by inhibiting STAT3 phosphorylation, thereby suppressing Th17 immune responses.	Hao et al. [104]

vaccines against the hepatitis B virus and influenza A subtype H5N1 [100–103] has been studied. The synergistic effects of PZQ and cimetidine (CIM) demonstrated an increase in T cell proliferation (CD4⁺ and CD8⁺ T cells) and a specific response to hepatitis B virus surface antigen (HBsAg), resulting in a higher ratio of IgG2a/IgG1 and higher production of IFN-γ, IL-17A, and TNF-α in C57/BL6 mice. In an HBsAg transgenic mouse model, the expression of HBsAg in liver cells was significantly reduced after immunization with DNA vaccines from VHB (pCD-S2) in the presence of 0.5% CIM and 0.25% PZQ [103].

When used with a vaccine against avian influenza (H5N1), PZQ demonstrated broad cytotoxic T lymphocyte activity (CD8⁺ T cells) and IL-17 production (Tc17), resulting in better control of viral infection. In a single immunization of C57/BL6 female mice using a vaccine from the killed virus with PZQ, antigen-specific Tc17 cells and IFN-γ secretion were induced [102] (Table 3). This cell induction was impaired in CD8⁺ knockout (KO) or IFN-γ KO mice and was even lower in IL-17 KO mice. Zou et al. [102] observed a significant reduction in viral loads in lung tissues and prolonged survival, indicating that PZQ is a promising chemical adjuvant for vaccines when there is a strong need for CD8⁺ T cell production.

8. Conclusions

PZQ has been the only treatment for a neglected and prevalent disease for a few decades, even without full knowledge of its mechanisms of action. Questions and concerns have arisen over the years, including the low efficacy of PZQ in juvenile states, the inability to reverse tissue

damage, and the possible existence of resistant strains. In search for these answers, new possibilities have emerged, such as using PZQ as a prophylactic agent. Until the development of an alternative treatment for schistosomiasis that is as effective as PZQ, new findings are expected to fill these gaps in the knowledge regarding the mechanisms of action of PZQ. By elucidating new mechanisms, its repositioning in the pharmaceutical industry could be investigated.

Financial support

RAN, ICLL, GCCGF and VAFS were supported by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) doctoral fellowship. JGMR and ACCMF were supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) fellowship. FRFN was supported by a CNPq researcher fellowship. The authors thank Fundação de Amparo à Pesquisa e ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Maranhão (FAPEMA - 01001/19) and CAPES (Finance code 001) for their support.

Ethical standards

Not applicable.

Conflicts of interest

The authors declare there are no conflicts of interest.

Appendix A. Supporting information

Supplementary data associated with this article can be found in the online version at doi:10.1016/j.molbiopara.2022.111531.

References

- [1] R. Gonnert, P. Andrews, Praziquantel, a new broad-spectrum antischistosomal agent, *Z. Parasite* 52 (1977) 129–150, <https://doi.org/10.1007/BF00389899>.
- [2] J.Y. Chai, Praziquantel treatment in trematode and cestode infections: an update, *Infect. Chemother.* 45 (1) (2013) 32–43, <https://doi.org/10.3947/ic.2013.45.1.32>.
- [3] S.K. Park, L. Friedrich, N.A. Yahya, C.M. Rohr, E.G. Chulkov, D. Maillard, F. Rippmann, T. Spangenberg, J.S. Marchant, Mechanism of praziquantel action at a parasitic flatworm ion channel, *Sci. Transl. Med.* 22 (625) (2021) eabj5832, <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.abj5832>.
- [4] Cioli, L. Pica-Mattoccia, S. Archer, Antischistosomal drugs: past, present and future? *Pharmacol. Ther.* 68 (1995) 35–85, [https://doi.org/10.1016/0163-7258\(95\)00026-7](https://doi.org/10.1016/0163-7258(95)00026-7).
- [5] D. Cioli, L. Pica-Mattoccia, Praziquantel, *Parasitol. Res.* 90 (Supp 1) (2003) S3–S9, <https://doi.org/10.1007/s00436-002-0751-z>.
- [6] J. Utzinger, J. Keiser, Schistosomiasis and soil-transmitted helminthiasis: common drugs for treatment and control, *Expert Opin. Pharmacother.* 5 (2004) 263–285, <https://doi.org/10.1517/14656566.5.2.263>.
- [7] C.L. Black, M.L. Steinauer, P.N. Mwinzi, W. Evan Secor, D.M. Karanja, D. G. Colley, Impact of intense, longitudinal retreatment with praziquantel on cure rates of schistosomiasis mansoni in a cohort of occupationally exposed adults in western Kenya, *Trop. Med. Int. Health* 14 (2009) 450–457, <https://doi.org/10.1111/j.1365-3156.2009.02234>.
- [8] D. Cioli, L. Pica-Mattoccia, A. Basso, A. Guidi, Schistosomiasis control: praziquantel forever? *Mol. Biochem. Parasitol.* 195 (1) (2014) 23–29, <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2014.06.002>.
- [9] J.D. Chan, M. Zarowiecki, J.S. Marchant, Ca²⁺ channels and Praziquantel: a view from the free world, *Parasitol. Int.* 62 (6) (2013) 619–628, <https://doi.org/10.1016/j.parint.2012.12.001>.
- [10] P. Andrews, H. Thomas, R. Pohlke, J. Seubert, Praziquantel, *Med. Res. Rev.* 3 (2) (1983) 147–200, <https://doi.org/10.1002/med.2610030204>.
- [11] Y.H. Liu, M.X. Qian, X.G. Wang, J. Jia, Q.N. Wang, Y.F. Jiang, R.Q. Wang, S. W. Yan, B.Y. Chen, S. Li, Z.Y. Qiu, J.K. Shen, Comparative efficacy of praziquantel and its optic isomers in experimental therapy of schistosomiasis japonica in rabbits, *Chin. Med. J.* 99 (1986) 935–940.
- [12] S.H. Xiao, B.A. Catto, Comparative *in vitro* and *in vivo* activity of racemic praziquantel and its levorotated isomer on *Schistosoma mansoni*, *J. Infect. Dis.* 159 (1989) 589–592, <https://doi.org/10.1093/infdis/159.3.589>, 1989.
- [13] M.H. Wu, C.C. Wei, Z.Y. Xu, H.C. Yuan, W.N. Lian, Q.J. Yang, M. Chen, Q. W. Jiang, C.Z. Wang, S.J. Zhang, Comparison of the therapeutic efficacy and side effects of a single dose of levo-praziquantel with mixed isomer praziquantel in 278 cases of schistosomiasis japonica, *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 45 (3) (1991) 345–349, <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1991.45.345>.

- [14] M. Tanaka, H. Ohmae, H. Utsunomiya, T. Nara, Y. Irie, K. Yasuraoka, A comparison of the antischistosomal effect of levo- and dextro-praziquantel on *Schistosoma japonicum* and *S. mansoni* in mice, *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 41 (2) (1989) 198–203, <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1989.41.198>.
- [15] T. Meyer, H. Sekljic, S. Fuchs, H. Bothe, D. Schollmeyer, C. Miculka, Taste, a new incentive to switch to (R)-praziquantel in schistosomiasis treatment, 2009, *PLoS Negl. Trop. Dis.* 3 (1) (2009), e357, <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000357>.
- [16] Meister, K. Ingram-Sieber, N. Cowan, M. Todd, M.N. Robertson, C. Meli, M. Patra, G. Gasser, J. Keiser, Activity of Praziquantel enantiomers and main metabolites against *Schistosoma mansoni*, *Antimicrob. Agents Chemother.* 58 (9) (2014) 5466–5472, <https://doi.org/10.1128/AAC.02741-14>.
- [17] J. Kovac, M. Vargas, J. Keiser, *In vitro* and *in vivo* activity of R- and S- praziquantel enantiomers and the main human metabolite trans-4-hydroxy-praziquantel against *Schistosoma haematobium*, *Parasites Vectors* 10 (2017) 365, <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2293-3>.
- [18] X. Shuhua, S. Bingui, J. Chollet, M. Tanner, Tegumental changes in adult *Schistosoma mansoni* harboured in mice treated with praziquantel enantiomers, *Acta Trop.* 18 (2) (2000) 107–117, [https://doi.org/10.1016/S0001-706X\(00\)00076-0](https://doi.org/10.1016/S0001-706X(00)00076-0).
- [19] V. Salvador-Recatalá, R.M. Greenberg, Calcium channels of schistosomes: unresolved questions and unexpected answers, 2012, *Wiley Interdiscip. Rev. Membr. Transp. Signal.* 1 (2012) 85–93, <https://doi.org/10.1002/wmts.19>.
- [20] A.B. Kohn, J.M. Roberts-Misterly, P.A. Anderson, N. Khan, R.M. Greenberg, Specific sites in the Beta Interaction Domain of a schistosome Ca²⁺ channel beta subunit are key to its role in sensitivity to the anti-schistosomal drug praziquantel, *Parasitology* 127 (2003) 349–356, <https://doi.org/10.1017/S003318200300386x>.
- [21] L. Pica-Mattoccia, A. Ruppel, C.M. Xia, D. Cioli, Praziquantel and the benzodiazepine Ro 11-3128 do not compete for the same binding sites in schistosomes, *Parasitology* 135 (01) (2007), <https://doi.org/10.1017/S0033182007003514>.
- [22] L. Pica-Mattoccia, T. Orsini, A. Basso, A. Festucci, P. Libertini, A. Guidi, A. L. Marcato-Maggi, S. Nobre-Santana, A.R. Troiani, D. Cioli, C. Valle, *Schistosoma mansoni*: lack of correlation between praziquantel-induced intra-worm calcium influx and parasite death, *Exp. Parasitol.* 119 (3) (2008) 332–335, <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2008.03.012>.
- [23] M. Gnanasekar, A.M. Salunkhe, A.K. Mallia, Y. He, R. Kalyanasundaram, Praziquantel affects the regulatory myosin light chain of *Schistosoma mansoni*, *Antimicrob. Agents Chemother.* 53 (2009) 1054–1060, <https://doi.org/10.1128/AAC.01222-08>.
- [24] M.A. McTigue, D.R. Williams, J.A. Tainer, Crystal structures of a schistosomal drug and vaccine target: glutathione S-transferase from *Schistosoma japonica* and its complex with the leading antischistosomal drug praziquantel, *J. Mol. Biol.* 246 (1995) 21–27, <https://doi.org/10.1006/jmbi.1994.0061>.
- [25] S.A. Shewita, M. Hassan, S.A. Bahashwan, *Schistosoma mansoni* changes the activity of glutathione S-transferase and glutathione levels in the liver of male mice: role of praziquantel as anti-schistosomal drug, *Drug Metab. Lett.* (2010), 20550494.
- [26] P. Chienwichai, S. Ampawong, P. Adisakwattana, T. Thiangtronggit, Y. Limpanont, P. Chusongsang, Y. Chusongsang, O. Reamont, Effect of Praziquantel on *Schistosoma mekongi* proteome and phosphoproteome, *9. Pathogens* 27 (6) (2020) 417, <https://doi.org/10.3390/pathogens9060417>.
- [27] F. Angelucci, A. Basso, A. Bellelli, M. Brunori, L. Pica Mattoccia, C. Valle, The anti-schistosomal drug praziquantel is an adenosine antagonist, *Parasitology* 134 (2007) 1215–1221, <https://doi.org/10.1017/S0033182007002600>.
- [28] J.D. Chan, P.M. Cupit, G.S. Gunaratne, J.D. McCorry, Y. Yang, K. Stoltz, T. R. Webb, P.I. Dosa, B.L. Roth, R. Abagyan, C. Cunningham, J. Marchant, The anthelmintic praziquantel is a human serotoninergic G-protein-coupled receptor ligand, *Nat. Commun.* 8 (2017) 1910, <https://doi.org/10.1038/s41467-017-02084-0>.
- [29] S. Bais, R.M. Greenberg, TRP channels as potential targets for antischistosomes, *Int. J. Parasitol. Drugs Drug Resist.* 8 (3) (2018) 511–517, <https://doi.org/10.1016/j.ijddr.2018.08.003>.
- [30] V.B.R. Silva, B. Boucherle, J. El-Methni, B. Hoffmann, A.L. da Silva, A. Fortune, A. M. de Lima, M. do Carmo Alves, A. Thomas, Could we expect new praziquantel derivatives? A meta pharmacometrics/pharmacoinformatics analysis of all antischistosomal praziquantel derivatives found in the literature, *SAR QSAR Environ. Res.* 30 (6) (2019) 383–401, <https://doi.org/10.1080/1062936x.2019.1607898>.
- [31] W.J. Yue, J.Q. You, J.Y. Mei, Prophylactic activity of praziquantel in animals infected with *Schistosoma japonicum*, *Zhongguo Yao Li Xue Bao* 6 (1985) 186–188.
- [32] A.A. Sabah, C. Fletcher, G. Webbe, M.J. Doenhoff, *Schistosoma mansoni*: reduced efficacy of chemotherapy in infected T-cell-deprived mice, *Exp. Parasitol.* 60 (3) (1985) 348–354, [https://doi.org/10.1016/0014-4894\(85\)90041-4](https://doi.org/10.1016/0014-4894(85)90041-4).
- [33] S.H. Xiao, W.J. Yue, Y.Q. Yang, J.Q. You, Susceptibility of *Schistosoma japonicum* to different developmental stages to praziquantel, *Chin. Med. J.* 100 (1987) 759–768.
- [34] V. Buchter, P.H.H. Schneeberger, J. Keiser, Validation of a human-serum-based *in vitro* growth method for drug screening on juvenile developmental stages of *Schistosoma mansoni*, *PLoS Negl. Trop. Dis.* 15 (3) (2021), e0009313, <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0009313>.
- [35] G.N. Gobert, Better understanding of anti-schistosomal strategies through microarray analysis, *Infect. Disord. Drug Targets* 10 (4) (2010) 251–257, <https://doi.org/10.2174/187152610791591601>.
- [36] S. Frahm, A. Anisuzzaman, U.F. Prodjinotho, N. Vejzagic, A. Verschoor, C. Pd Costa, A novel cell-free method to culture *Schistosoma mansoni* from cercariae to juvenile worm stages for *in vitro* drug testing, *PLoS Negl. Trop. Dis.* 13 (1) (2019), e0006590 doi: journal.pntd.0006590.
- [37] P. Andrews, A summary of the efficacy of praziquantel against schistosomes in animal experiments and notes on its mode of action, *Arzneimittelforschung* 31 (3a) (1981) 538–541.
- [38] S.H. Xiao, B.A. Catto, L.T. Jr, Effects of praziquantel on different developmental stages of *Schistosoma mansoni in vitro* and *in vivo*, *J. Infect. Dis.* 151 (6) (1985) 1130–1137, <https://doi.org/10.1093/infdis/151.6.1130>, 1985.
- [39] L. Pica-Mattoccia, D. Cioli, Sex- and stage-related sensitivity of *Schistosoma mansoni* to *in vivo* and *in vitro* praziquantel treatment, *34. Int. J. Parasitol.* 29 (4) (2004) 527–533, <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2003.12.003>.
- [40] P.T. Lo Verde, Presidential address. Sex and schistosomes: an interesting biological interplay with control implications, *J. Parasitol.* 88 (2002) 3–13, [https://doi.org/10.1645/0022-3395\(2002\)088\[0003:PASASA\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1645/0022-3395(2002)088[0003:PASASA]2.0.CO;2).
- [41] R.A. Pax, J.L. Bennet, J.L. Fetterer, A benzodiazepine derivative and praziquantel: effects on musculature of *Schistosoma mansoni* and *Schistosoma japonicum*, *Naunyn-Schmiede's Arch. Pharmacol.* 304 (1978) 309–315, <https://doi.org/10.1007/BF00507974>.
- [42] S.H. Xiao, J. Sun, M.G. Chen, Pharmacological and immunological effects of praziquantel against *Schistosoma japonicum*: a scoping review of experimental studies, *7. Infect. Dis. Poverty* 7 (1) (2018) 9, <https://doi.org/10.1186/s40249-018-0391-x>.
- [43] M.J. Doenhoff, D. Cioli, J. Utzinger, Praziquantel: mechanisms of action, resistance and new derivatives for schistosomiasis, *Curr. Opin. Infect. Dis.* 21 (6) (2008) 659–667, <https://doi.org/10.1186/s40249-018-0391-x>.
- [44] E. Eyob, P. McCallum, J. Killick, S. Amanfo, F. Mutapi, A.L. Astier, The anthelmintic drug Praziquantel promotes human Tr1 differentiation, *Immunol. Cell Biol.* 97 (5) (2019) 512–518, <https://doi.org/10.1111/imb.12229>.
- [45] B. Becker, H. Mehlhorn, P. Andrews, H. Thomas, J. Eckert, Light and electron microscopic studies on the effect of praziquantel on *Schistosoma mansoni*, *Dicrocoelium dendriticum*, and *Fasciola hepatica* (Trematoda) *in vitro*, *Z. Parasitenkd.* 63 (1980) 113–128, <https://doi.org/10.1007/BF00927527>.
- [46] H. Mehlhorn, B. Becker, P. Andrews, H. Thomas, J.K. Frenkel, *In vivo* and *in vitro* experiments on the effects of praziquantel on *Schistosoma mansoni*, *Arzneim. Forsch. Drug Res.* 31 (1981) 544–554.
- [47] R.R.S. Alves, J.G.M. Rodrigues, A. Teles-Reis, R.A. Nogueira, I.C.L. Licá, M.G. S. Lira, R. da Silva Alves, N. Silva-Souza, T.J.A.S. Andrade, G.S. Miranda, Antiparasitic effects of ethanolic extracts of *Piper arboreum* and *Jatropha gossypifolia* leaves on cercariae and adult worms of *Schistosoma mansoni*, *Parasitology* 147 (14) (2020) 1689–1699, <https://doi.org/10.1017/S003318202000181X>.
- [48] M.K. Shaw, D.A. Erasmus, *Schistosoma mansoni*: the effects of a subcurative dose of praziquantel on the ultrastructure of worms *in vivo*, *Z. Parasitenkd.* 69 (1) (1983) 73–90, <https://doi.org/10.1007/bf00934012>.
- [49] P. Lamberton, C.L. Faust, J.P. Webster, Praziquantel decreases fecundity in *Schistosoma mansoni* adult worms that survive treatment: evidence from a laboratory life-history trade-offs selection study, *Infect. Dis. Poverty* 6 (1) (2017) 110, <https://doi.org/10.1186/s40249-017-0324-0>.
- [50] F. Winkelmann, M. Frank, A. Rabes, N. Koslowski, C. Schulz, M. Bischofsberger, E.C. Reisinger, M. Sombetzki, Human serum activates the tegument of female schistosomes and supports recovery from Praziquantel, *Parasitol. Res.* 120 (1) (2021) 209–221, <https://doi.org/10.1007/s00436-020-06968-x>.
- [51] C. Schwartz, P.G. Fallon, *Schistosoma* “Eggs-Itting” the host: granuloma formation and egg excretion, *Front. Immunol.* 29 (9) (2018) 2492, <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02492>.
- [52] D.L. Boros, Immunopathology of *Schistosoma mansoni* infection, *Clin. Microbiol. Rev.* 2 (3) (1989) 250–269, <https://doi.org/10.1128/CMR.2.3.250>.
- [53] D. Kong, C. Zhou, H. Guo, W. Wang, J. Qiu, X. Liu, J. Liu, L. Wang, Y. Wang, Praziquantel targets M1 macrophages and ameliorates splenomegaly in chronic schistosomiasis, *62. Antimicrob. Agents Chemother.* 21 (1) (2017) e00005–e00017, <https://doi.org/10.1128/AAC.00005-17>.
- [54] D. Kong, H. Guo, Z. Lu, J. Cui, MicroRNA-21 mediates the inhibiting effect of Praziquantel on NLRP3 inflammasome in *Schistosoma japonicum* infection, *Front. Vet. Sci.* 6 (2020) 517, <https://doi.org/10.3389/fvets.2019.00517>.
- [55] G. Lugo-Villarino, C. Vérolet, I. Maridonneau-Parini, O. Neyrolles, Macrophage polarization: convergence point targeted by *Mycobacterium tuberculosis* and HIV, *Front. Immunol.* 15 (2) (2011) 43, <https://doi.org/10.3389/fimmu.2011.00043>.
- [56] J.M. den Haan, G. Kraal, Innate immune functions of macrophage subpopulations in the spleen. *Journal of Innate Immunity* 4 (5–6) (2012) 437–445, <https://doi.org/10.1159/000335216>.
- [57] J.E. Sims, D.E. Smith, The IL-1 family: regulators of immunity, *Nat. Rev. Immunol.* 10 (2010) 89–102, <https://doi.org/10.1038/nri2691>.
- [58] C.A. Dinarello, A. Simon, J.W. van der Meer, Treating inflammation by blocking interleukin-1 in a broad spectrum of diseases, *Nat. Rev. Drug Discov.* 11 (2012) 633–652, <https://doi.org/10.1038/nrd3800>.
- [59] A. Wree, M.D. McGeough, M.E. Inzaugarat, A. Eguchi, S. Schuster, C.D. Johnson, C.A. Pena, L.J. Geisler, B.G. Papouchado, H.M. Hoffman, A.E. Feldstein, NLRP3 inflammasome driven liver injury and fibrosis: roles of IL-17 and TNF in mice, *Hepatology* 67 (2017) 736–749, <https://doi.org/10.1002/hep.29523>.
- [60] N.M. El-Sayed, G.M. Fathy, S.A. Abdel-Rahman, M.A. El-Shafei, Cytokine patterns in experimental schistosomiasis *mansoni* infected mice treated with silymarin, *J. Parasitol. Dis.* 40 (3) (2016) 922–929, <https://doi.org/10.1007/s12639-014-0606-4>.

- [61] U.M. Femoe, H.B. Jatsa, V. Greigert, J. Brunet, C. Cannet, M.C. Kenfack, N. G. Feussom, J.B.K. Fassi, E.T. Nkondo, A. Abou-Ba, A.W. Pfaff, T. Dimo, P. Kamtchoung, L.A. Tchuem Tchuenté, Pathological and immunological evaluation of different regimens of praziquantel treatment in a mouse model of *Schistosoma mansoni* infection, *PLoS Negl. Trop. Dis.* 21 (4) (2022), e010382, <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0010382>.
- [62] B. Wang, S. Liang, Y. Wang, X.Q. Zhu, W. Gong, H.Q. Zhang, Y. Li, C.M. Xia, Th17 down-regulation is involved in reduced progression of schistosomiasis fibrosis in ICOSL KO mice, *PLoS Negl. Trop. Dis.* 9 (1) (2015), e0003434, <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003434>.
- [63] M.J. Czaja, F.R. Weiner, S. Takahashi, M.A. Giambrone, P.H. van der Meide, H. Schellekens, L. Biempica, M.A. Zern, γ -Interferon treatment inhibits collagen deposition in murine schistosomiasis, *Hepatology* 10 (1989) 795–800, <https://doi.org/10.1002/hep.1840100508>.
- [64] A. Dessein, B. Kouriba, C. Eboumbou, H. Dessein, L. Argiro, S. Marquet, N.E.M. A. Elwali, V. Rodrigues, Y. Li, O. Doumbo, C. Chevillard, Interleukin-13 in the skin and interferon- γ in the liver are key players in immune protection in human schistosomiasis, *Immunol. Rev.* 201 (2004) 180–190, <https://doi.org/10.1111/j.0105-2896.2004.00195.x>.
- [65] S. Henri, C. Chevillard, A. Mergani, P. Paris, J. Gaudart, C. Camilla, H. Dessein, F. Montero, N.E.M.A. Elwali, O.K. Saeed, M. Magzoub, A.J. Dessein, Cytokine regulation of periportal fibrosis in humans infected with *Schistosoma mansoni*: IFN- γ is associated with protection against fibrosis and TNF- α with aggravation of disease, *J. Immunol.* 169 (2002) 929–936, <https://doi.org/10.4049/jimmunol.169.2.929>.
- [66] M. Booth, J.K. Mwatha, S. Joseph, F.M. Jones, H. Kadzo, E. Ireri, F. Kazibwe, J. Kemijumbi, C. Kariuki, G. Kimani, J.H. Ouma, N.B. Kabateraine, B. J. Vennervald, D.W. Dunne, Periportal fibrosis in human *Schistosoma mansoni* infection is associated with low IL-10, low IFN-gamma, high TNF-alpha, or low RANTES, depending on age and gender, *PLoS One* 15 (2) (2004) 1295–1303, <https://doi.org/10.4049/jimmunol.172.2.1295>.
- [67] E. Okonjo, D. Yole, D. Ogoyi, Cytokine response profiles of school-aged children infected with *Schistosoma mansoni* before and after Praziquantel treatment, *J. Trop. Med.* 17 (2021) (2021), 6678981, <https://doi.org/10.1155/2021/6678981>.
- [68] P. Martins-Leite, G. Gazzinelli, L.F. Alves-Oliveira, A. Gazzinelli, L.C. Malaquias, R. Correa-Oliveira, A. Teixeira-Carvalho, A.M. Silveira, Effect of chemotherapy with praziquantel on the production of cytokines and morbidity associated with schistosomiasis mansoni, *Antimicrob. Agents Chemother.* 52 (8) (2008) 2780–2786, <https://doi.org/10.1128/AAC.00173-08>.
- [69] P.J. Brindley, A. Sher, The chemotherapeutic efficacy of praziquantel against *Schistosoma mansoni* is dependent on host antibody response, *J. Immunol.* 139 (1987) 215–220.
- [70] M.K. Shaw, D.A. Erasmus, *Schistosoma mansoni* structural damage and tegumental repair after in vivo treatment with praziquantel, *Parasitology* 94 (1987) 243–254, <https://doi.org/10.1017/s003118200005392>.
- [71] M.W. Melkus, L. Le, A.J. Siddiqui, A.J. Molehin, W. Zhang, S. Lazarus, A. A. Siddiqui, Elucidation of cellular responses in non-human primates with chronic *Schistosoma mansoni* followed by Praziquantel treatment, *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 24 (10) (2020) 57, <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00057>.
- [72] V. Pancre, M. Delacore, J. Herno, C. Auriault, Schistosomal egg antigen-responsive CD8 T-cell population in *Schistosoma mansoni*-infected BALB/c mice, *Immunology* 98 (1999) 525–534, <https://doi.org/10.1046/j.1365-2567.1999.00887>.
- [73] S.K. Lundly, N.W. Lukacs, Chronic schistosome infection leads to modulation of granuloma formation and systemic immune suppression, *Front. Immunol.* 20 (4) (2013) 39, <https://doi.org/10.3389/fimmu.2013.00039>.
- [74] L.A. Labuda, A.A. Adegnik, B.A. Rosa, J. Martin, U. Ateba-Ngoa, A.S. Amoah, H. W. Lima, L. Meurs, M. Mbaw, M.D. Manurung, J.F. Zinsou, H.H. Smits, P. G. Kreamsner, M. Mitreva, M. Yazdanbakhsh, A Praziquantel treatment study of immune and transcriptome profiles in *Schistosoma haematobium*-infected gabonese schoolchildren, *J. Infect. Dis.* 222 (12, 15) (2020) 2103–2113, <https://doi.org/10.1093/infdis/jiz641>.
- [75] Y. Schmiedel, G. Mombou-Ngoma, L.A. Labuda, J.J. Janse, B. de Gier, A. A. Adegnik, S. Issifou, P.G. Kreamsner, H.H. Smits, M. Yazdanbakhsh, CD4+ CD25hi FOXP3+ regulatory T cells and cytokine responses in human *Schistosoma mansoni* before and after treatment with Praziquantel, *PLoS Negl. Trop. Dis.* 20 (8) (2015), e0003995, <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003995>.
- [76] N. Chihara, A. Madi, K. Karwacz, A. Awasthi, V.K. Kuchroo, Differentiation and characterization of Tr1 cells, *PLoS One* 11 (2016) 1, <https://doi.org/10.1002/0471142735.im0327s113>.
- [77] M.G. Roncarolo, S. Gregori, R. Bacchetta R, M. Battaglia, Tr1 cells and the counter-regulation of immunity: natural mechanisms and therapeutic applications, *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 380 (2014) 39–68, https://doi.org/10.1007/978-3-662-43492-5_3.
- [78] C. Kemper, A.C. Chan, J.M. Green, K.A. Brett, K.M. Murphy, J.P. Atkinson, Activation of human CD4+ cells with CD3 and CD46 induces a T-regulatory cell 1 phenotype, *Nature* 421 (2003) 388–392, <https://doi.org/10.1038/nature01315>.
- [79] J. Cardone, G. Lord, J.P. Atkinson, A. Roberts, A. Fuchs, I. Jackson, T. Suddason, G. Lord, J.P. Atkinson, A. Cope, A. Hayday, C. Kemper, Complement regulator CD46 temporally regulates cytokine production by conventional and unconventional T cells, *Nat. Immunol.* 11 (2010) 862–871, <https://doi.org/10.1038/ni.1917>.
- [80] L.E. van der Vlugt, L.A. Labuda, A. Ozir-Fazalalikhah, E. Lievers, A. K. Gloudemans, K.Y. Liu, T.A. Barr, T. Sparwasser, L. Boon, U.A. Ngoa, E. N. Feugap, A.A. Adegnik, P.G. Kreamsner, D. Gray, M. Yazdanbakhsh, H.H. Smits, Schistosomes induce regulatory features in human and mouse CD11(hi) B cells: inhibition of allergic inflammation by IL-10 and regulatory T cells, *PLoS One* 7 (2) (2012), e30883, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0030883>.
- [81] P.M. Cupit, C. Cunningham, What is the mechanism of action of praziquantel and how might resistance strike? *Future Med. Chem.* 7 (2015) 701–705, <https://doi.org/10.4155/fmc.15.11>.
- [82] X. Wang, D. Yu, C. Li, T. Zhan, T. Zhang, H. Ma, J. Xu, C. Xia, *In vitro* and *in vivo* activities of DW-3-15, a commercial praziquantel derivative, against *Schistosoma japonicum*, *Parasites Vectors* 3 (1) (2019) 199, <https://doi.org/10.1186/s13071-019-3442-7>.
- [83] L. Qi, J. Cui, A schistosomiasis model with praziquantel resistance, *Discret. Dyn. Nat. Soc.* 2013 (2013), 945767, <https://doi.org/10.1155/2013/945767>.
- [84] B. Gryseels, F.F. Stelma, I. Talla, G.J. van Dam, K. Polman, S. Sow, M. Diaw, R. F. Sturrock, E. Doehring-Schwerdtfeger, R. Kardorff, Epidemiology, immunology and chemotherapy of *Schistosoma mansoni* infections in a recently exposed community in Senegal, *Trop. Geogr. Med.* 46 (4) (1994) 209–219.
- [85] F.F. Stelma, I. Talla, S. Sow, A. Kongs, M. Niang, K. Polman, A.M. Deelder, B. Gryseels, Efficacy and side effects of praziquantel in an epidemic focus of *Schistosoma mansoni*, *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 53 (2) (1995) 167–170, <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1995.53.167>.
- [86] S. William, A. Sabra, F. Ramzy, M. Mousa, Z. Demerdash, J.L. Bennett, Stability and reproductive fitness of *Schistosoma mansoni* isolates with decreased sensitivity to praziquantel, *Int. J. Parasitol.* 31 (2001) 1093–1100, [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(01\)00215-6](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(01)00215-6).
- [87] S. Melman, M.L. Steinauer, C. Cunningham, L.S. Kubatko, I.N. Mwangi, N. B. Wynn, M.W. Mutuku, D.M.S. Karanja, D.G. Colley, C.L. Black, W.E. Secor, G. M. Mkoji, E.S. Loker, Reduced susceptibility to praziquantel among naturally occurring Kenyan isolates of *Schistosoma mansoni*, *PLoS Negl. Trop. Dis.* 3 (8) (2009), e504, <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000504>.
- [88] Q. Ke, Q. L. You-Sheng, W. Wei, Q. Guo-Li, L. Hong-Jun, Y. Zhen-Kun, Z. Zheng-Yang, X. Yuntian, D. Jian-Rong, Studies on resistance of *Schistosoma* to praziquantel XVII Biological characteristics of praziquantel-resistant isolates of *Schistosoma japonicum* in mice, *Zhongguo Xue Xi Chong Bing. Fang. Zhi Za Zhi* 26 (6) (2017) 683–688, <https://doi.org/10.16250/j.32.1374.2017102>.
- [89] D. Alonso, J. Muñoz, J. Gascón, M.E. Valls, M. Corachan, Failure of standard treatment with praziquantel in two returned travelers with *Schistosoma haematobium* infection, *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 74 (2) (2006) 342–344.
- [90] Y.S. Liang, J.R. Dai, Y.C. Zhu, G.C. Coles, M.J. Doenhoff, Genetic analysis of praziquantel resistance in *Schistosoma mansoni*, *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health* 34 (2) (2003) 274–280.
- [91] W. Wang, Y.S. Liang, Progress on research of resistance of schistosome to praziquantel, *Int. J. Med. Parasit. Dis.* 34 (2007) 291–296.
- [92] W. Le Clech, F.D. Chevalier, A.C.A. Mattos, A. Strickland, R. Diaz, M. McDew-White, C.M. Rohr, S. Kinung'hi, F. Allan, B.L. Webster, J.P. Webster, A.M. Emery, D. Rollinson, A.G. Djirmay, K.M. Al Mashikhi, S. Al Yafae, M.A. Idris, H. Moné, G. Mouahid, P. LoVerde, J.S. Marchant, T.J.C. Anderson, Genetic analysis of praziquantel response in schistosome parasites implicates a transient receptor potential channel, *Sci. Transl. Med.* 13 (625) (2021), eab9114, <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.abb9114>.
- [93] D.J. Berger, D.J. Berger, T. Crellen, P.H.L. Lamberton, F. Allan, A. Tracey, J. D. Noonan, N.B. Kabateraine, E.M. Tukahewa, M. Adriko, N. Holroyd, J. P. Webster, M. Berriman, J.A. Cotton, Whole-genome sequencing of *Schistosoma mansoni* reveals extensive diversity with limited selection despite mass drug administration, *Nat. Commun.* 12 (2021) 4776, <https://doi.org/10.1038/s41467-021-24958-0>.
- [94] L. Shell, J. Ketzis, R. Hall, G. Rawlins, W. du Plessis, Praziquantel treatment for *Platystrongylus* species infection of a domestic cat on St Kitts, West Indies, *2055116915589834*, *J. Feline Med. Surg. Open Rep.* 16 (1) (2015), <https://doi.org/10.1177/2055116915589834>.
- [95] P.E. Crisi, A. Di Cesare, D. Traversa, M. Vignoli, S. Morelli, M. Di Tommaso, F. De Santis, F. Pampurini, R. Schaper, A. Boari, Controlled field study evaluating the clinical efficacy of a topical formulation containing emodepside and praziquantel in the treatment of natural cat aelurostrongylosis, *Vet. Rec.* 5 (5) (2020), e34, <https://doi.org/10.1136/vr.105528>.
- [96] C.R. Chong, D.J. Sullivan, New uses for old drugs, *Nature* 448 (7154) (2007) 645–646, <https://doi.org/10.1038/448645a>.
- [97] Z.H. Wu, M.K. Lu, L.Y. Hu, X. Li, Praziquantel synergistically enhances paclitaxel efficacy to inhibit cancer cell growth, *PLoS One* 7 (12) (2012), e51721, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0051721>.
- [98] C.L. O'Connor, S. Angussois, H.J. Huber, H. Dussmann, J.H. Prehn, M. Rehm, Intracellular signaling dynamics during apoptosis execution in the presence or absence of X-linked-inhibitor-of-apoptosis-protein, *Biochim. Biophys. Acta* 1783 (10) (2008) 1903–1913, <https://doi.org/10.1016/j.bbamer.2008.05.025>.
- [99] A.D. Schimmer, S. Dalili, R.A. Batey, S.J. Riedl, Targeting XIAP for the treatment of malignancy, *Cell Death Differ.* 13 (2006) 179–188, <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401826>.
- [100] Q. Zou, Y. Zhong, H. Su, Y. Kang, J. Jin, Q. Liu, S. Geng, G. Zhao, B. Wang, Enhancement of humoral and cellular responses to HBSAg DNA vaccination by immunization with praziquantel through inhibition TGF-beta/Smad2,3 signaling, *Vaccine* 28 (8) (2010) 2032–2038, <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2009.10.101>.
- [101] Q. Zou, X. Yao, J. Feng, Z. Yin, R. Flavell, Y. Hu, G. Zheng, J. Jin, Y. Kang, B. Wu, X. Liang, C. Feng, H. Liu, W. Li, X. Wang, Y. Wen, B. Wang, Praziquantel facilitates IFN- γ -producing CD8+ T cells (Tc1) and IL-17-producing CD8+ T cells (Tc17) responses to DNA vaccination in mice, *2011, PLoS One* 6 (10) (2011), e25525, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0025525>.

R.A. Nogueira et al.

Molecular & Biochemical Parasitology 252 (2022) 111531

- [102] Q. Zou, Y. Hu, J. Xue, X. Xiaoxu, Y. Jin, X. Shi, D. Meng, X. Wang, C. Feng, X. Xie, Y. Zhang, Y. Kang, X. Liang, B. Wu, M. Wang, B. Wang, Use of praziquantel as an adjuvant enhances protection and Tc-17 responses to killed H5N1 virus vaccine in mice, *PLoS One* 7 (4) (2012), e34865, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0034865>.
- [103] X. Xie, S. Geng, H. Liu, C. Li, Y. Yang, B. Wang, Cimetidine synergizes with Praziquantel to enhance the immune response of HBV DNA vaccine via activating cytotoxic CD8(+) T cell, *Hum. Vaccin. Immunother.* 10 (6) (2014) 1688–1699, <https://doi.org/10.4161/hv.28517>.
- [104] L. Hao, Y. Mao, J. Park, E.J. Bae, B.H. Park, Repurposing the anthelmintic praziquantel to treat psoriasis, *Br. J. Pharmacol.* 178 (23) (2021) 4726–4740, <https://doi.org/10.1111/bph.15652>.

4.2 CAPÍTULO II: EFEITO DE PRAZIQUANTEL NA REPOSTA IMUNE DE CAMUNDONGOS INFECTADOS EXPERIMENTALMENTE POR *Schistosoma mansoni* DURANTE AS FASES AGUDA E CRÔNICA

- Colaboradores: M.G.S. LIRA; I.C. L LICÁ; G.C.C. G FRAZÃO; V. A. F DOS SANTOS; ARAUJO-GUIMARAES, S. J; J.G.M. RODRIGUES; G.S. MIRANDA; R.N.M GUERRA; L.A SILVA; R.C CAVALHO; F.R.F NASCIMENTO

RESUMO

A esquistossomose mansoni é uma parasitose causada por *Schistosoma mansoni*. O tratamento de paciente infectados é realizado pelo Praziquantel (PZQ), há mais de quatro décadas. Embora o uso do PZQ esteja consolidado como estratégia quimioterápica, seus modos de ação no parasito, principalmente em estágios imaturos e juvenis continuam a ser objetos de investigação, juntamente com seus efeitos na resposta imune do hospedeiro vertebrado. Dessa forma, este estudo investiga os efeitos na resposta imune de camundongos infectados experimentalmente por *S. mansoni* e tratados com PZQ, em diferentes fases da doença – aguda (60 dias) e crônica (90 dias). Para o ensaio *in vitro*, todas as concentrações de PZQ apresentaram atividade esquistossomicida, evidentemente a maior concentração (10µg/mL) apresentou melhor eficácia em menor tempo. Em relação aos dados *in vivo*, PZQ reduziu a carga parasitária em ambos os grupos infectados e tratados de 60 e 90 dias. O tratamento com PZQ reduziu o número de eosinófilos nos camundongos infectados por 60 dias, e induziu aumento de linfócitos para os animais infectados de 90 dias. Em relação as citocinas, notou-se que os grupos tratados com PZQ apresentaram redução em TNF- α e IL-6. Associada a redução das concentrações destas citocinas, observamos também reduções das inflamações e lesões teciduais no fígado (fase aguda e crônica) e no intestino (fase crônica), demonstrando uma ação anti-inflamatória e redução da patologia. Por fim, este trabalho demonstra que PZQ deve continuar a ser investigado no que diz respeito ao seu papel na resposta imune dos seus efeitos ao longo e após o tratamento, para melhor compreensão.

Palavras-chave: imunoparasitologia, resposta imunológica, perfil de citocinas, quimioterapia

ABSTRACT

Schistosomiasis mansoni is a parasite caused by *Schistosoma mansoni*. Infected patients have been treated with praziquantel (PZQ) for more than four decades. Although the use of PZQ has been consolidated as a chemotherapeutic strategy, its non-parasitic modes of action, particularly in the immature and juvenile stages, and its effects on the immune response of the vertebrate host are increasingly being investigated. This study therefore examines the effects on the immune response of mice experimentally infected with *S. mansoni* and treated with PZQ at different stages of the

disease – acute (60 days) and chronic (90 days). In the in vitro test, all concentrations of PZQ showed schistosomicidal activity, with the highest concentration (10µg/mL) apparently showing better efficacy in a shorter time. As for the in vivo data, PZQ impaired parasite burden in both infected and treated groups over 60 and 90 days. Treatment with PZQ decreased the number of eosinophils in mice infected for 60 days and caused an increase in lymphocytes in animals infected for 90 days. In terms of cytokines, it was found that the PZQ-treated groups had a reduction in TNF- α and IL-6. In conjunction with the reduction in the levels of these cytokines, we also observed a reduction in inflammation and tissue damage in the liver (acute and chronic phase) and intestine (chronic phase), indicating an anti-inflammatory effect and a reduction in pathology. Finally, this work shows that PZQ should be further investigated in terms of its role in the immune response and its effects during and after treatment in order to gain a better understanding.

Keywords: immunoparasitology, immunological response, cytokine profile, chemotherapy

1 INTRODUÇÃO

A esquistossomose mansoni é uma doença inflamatória e crônica, causada por helmintos da espécie *Schistosoma mansoni* (BERGQUIST et al., 2017). Esta doença afeta mais de 250 milhões de pessoas, com cerca de 280.000 mortes/ano (LO et al., 2022). O ciclo de vida do parasito é do tipo heteróxico, composto caramujos do gênero *Biomphalaria* e hospedeiros definitivos (humanos e roedores) (ROSS et al., 2002; MIRANDA et al., 2022). Durante as etapas do ciclo evolutivo de *S. mansoni* nos diferentes tecidos, o helminto passa por alterações morfológicas e bioquímicas que servem como “mecanismo de fuga” do sistema imunológico dos hospedeiros, sendo cada etapa desse processo responsável pela ativação de mecanismos imunológicos (SOUZA et al., 2011).

A resposta imunológica do hospedeiro definitivo no decorrer da infecção por *S. mansoni* ocorre desde a penetração das cercarias até a maturação dos vermes adultos, caracterizando a fase aguda pré-postural, onde o hospedeiro produz uma predominante do perfil Th1 (PEARCE et al., 1991). Com o início da ovipostura (fase aguda postural), os antígenos secretados pelos ovos do parasito induzem uma mudança no perfil dos mediadores imunológicos produzidos pelo hospedeiro, e a resposta imune torna-se predominantemente Th2 (CHEEVER et al., 2000; BURKE et al., 2009). Essa resposta Th2 alcança seu pico em torno da 8ª semana após o início da infecção, e é modulada com a progressão da infecção para a fase crônica. Este processo de modulação ocorre principalmente via IL-10 e TGF- β , que regulam o balanço da resposta Th1/Th2 pela ativação de

células T regulatórias (Treg), atingindo seu pico após 11-12 semanas de infecção (ARAÚJO et al., 1996; WYNN et al., 2004).

A principal estratégia de controle da esquistossomose consiste na abordagem quimioterápica com Praziquantel (PZQ) (ARULEBA et al., 2019), que reduz a carga parasitária e impede a evolução da doença para formas graves (SILVA et al., 2017). O uso deste medicamento por longos anos baseia-se na sua eficácia contra as três principais espécies causadoras da doença, seu baixo custo, baixa frequência de efeitos colaterais e facilidade de administração (DOENHOFF et al., 2008; CIOLI et al., 2014). Em vermes maduros de *Schistosoma* (fase aguda pós-postural) (XIAO et al., 1985), PZQ provoca paralisia da musculatura, vacuolização do tegumento e exposição de antígenos da superfície, tornando-o alvo para o sistema imunológico do hospedeiro vertebrado (ANDREW, 1985; DOENHOFF, 2008; XIAO et al., 2018;). Entretanto, estágios imaturos do parasito (fase aguda pré-postural), ainda não há total esclarecimento sobre a baixa eficácia (UTZINGER et al., 2003; VIMIEIRO, 2009; ARULEBA et al., 2019).

No âmbito imunológico da infecção, estudos realizados com *S. japonicum* demonstraram correlação entre o uso do PZQ e ação inibitória direta em macrófagos do tipo M1, culminando em melhora da esplenomegalia a partir da redução da sua capacidade fagocitária e inflamatória (KONG et al., 2017). Em relação as células T, o tratamento com PZQ aumenta a frequência de células T efetoras e diminui na frequência de células T regulatórias (CD4+ CD25+ FOXP3+) na infecção por *S. haematobium* (SCHMIEDEL et al., 2015; LABUDA et al., 2020). Outros estudos apontam que o tratamento com PZQ estimula mudança no perfil de algumas citocinas, induzindo a expressão significativamente mais elevada de IFN- γ , IL-1,-2,-12, -4,-10, -13 e -17 (SCHMIEDEL et al., 2015; MELKUS et al., 2020). Embora existam dados sobre a eficácia de PZQ, estes ainda continuam controversos em relação a sua ação no sistema imune do hospedeiro durante a infecção por *S. mansoni*. Além disso, diversos estudos optam por utilizar o medicamento como forme de controle, devido sua conhecida ação parasitológica, mas pouca se explora sobre seu papel na resposta imune. Dessa forma, é preciso melhor compreender as respostas provocadas por este fármaco, com a finalidade de propor novas abordagens terapêuticas. Assim, este estudo avalia e compara o efeito de PZQ em camundongos experimentalmente infectados por *S. mansoni* durante fases aguda e crônica da infecção, sob as perspectivas parasitológica, imunológica e patológica.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Caramujos *Biomphalaria*

Os caramujos infectados por *S. mansoni* (Cepa LE de Belo Horizonte – MG) foram acondicionados individualmente em recipientes de vidro com água desclorada, expostos à iluminação artificial (lâmpadas incandescentes de 60W) por 4 horas, para estimular a eliminação das cercárias. As cercárias de *S. mansoni* obtidas foram analisadas quanto a sua viabilidade, concentradas e contadas com o auxílio de um microscópio estereomicroscópio (SMITHERS; TERRY, 1965).

2.2 Camundongos

Foram utilizados 36 camundongos *Swiss* machos, entre 3 e 4 meses de idade, fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal do Maranhão (UFMA). Estes animais foram divididos em seis grupos com seis animais (n=6), de acordo com o quadro abaixo (Quadro 1).

Quadro 1. Caracterização dos grupos experimentais utilizados para avaliação de Praziquantel na resposta imune de camundongos infectados com *S. mansoni*.

GRUPOS / CARACTERÍSTICAS
CS60: Controle sadio de 60 dias (animais não infectados por <i>S. mansoni</i> e não tratados, utilizados como parâmetro fisiológico, e eutanasiados no 60º dia do experimento).
CS90: Controle sadio de 90 dias: (animais não infectados por <i>S. mansoni</i> e não tratados, utilizados como parâmetro fisiológico, e eutanasiados no 90º dia do experimento).
INF60: Infectado por <i>S. mansoni</i> durante 60 dias e não tratado (animais infectados e sem tratamento, eutanasiados no 60º dia do experimento).
INF90: Infectado por <i>S. mansoni</i> durante 90 dias e não tratado (animais infectados e sem tratamento, eutanasiados no 90º dia do experimento).

INF+PZQ60: Infectados por *S. mansoni* durante 60 dias e tratados com Praziquantel (animais infectados, tratados no 45º dia de infecção com PZQ, durante sete dias seguidos, e eutanasiados no 60º dia após a infecção).

INF+PZQ90: Infectados por *S. mansoni* durante 90 dias e tratados com Praziquantel (animais infectados, tratados no 45º dia de infecção com PZQ, durante sete dias seguidos, e eutanasiados no 90º dia após a infecção).

Os grupos infectados por *S. mansoni* (INF60, INF90, INF+PZQ60 e INF+PZQ90) receberam por via percutânea 50 cercárias viáveis, obtidas de exemplares de *B. glabrata*. Os grupos tratados por PZQ receberam a dose de 50mg/Kg, por via oral (RODRIGUES et al., 2021) (Figura 6). Para a eutanásia, os animais receberam uma superdosagem anestésica para a realização dos ensaios parasitológicos, imunológicos, histopatológicos e imunohistoquímicos. Este experimento foi aprovado pelo Comitê de Ética para o Uso de Animais (CEUA) da UFMA, sob o nº 23115.002254/2020-18 (Anexo A).

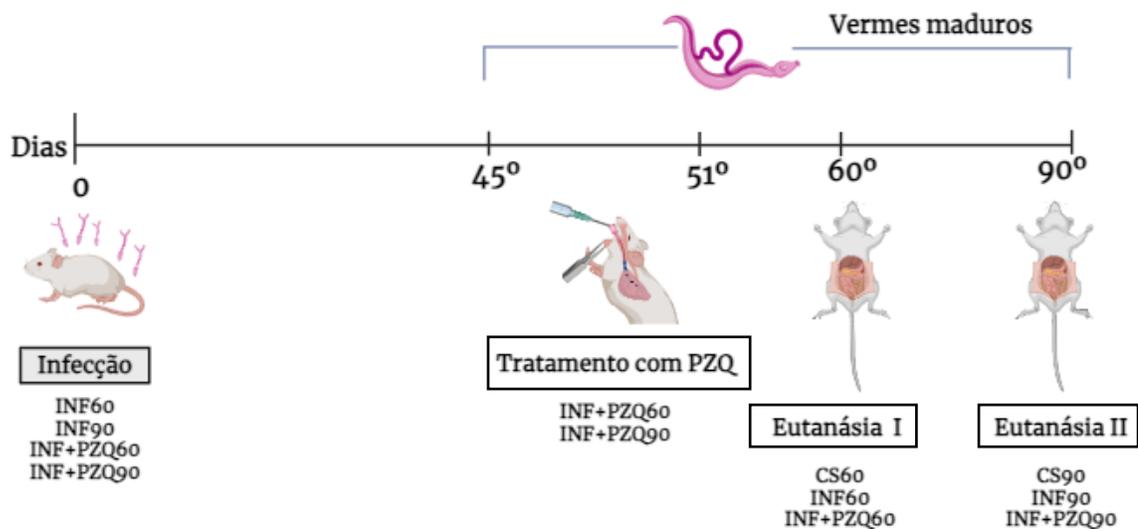


Figura 6. Delineamento experimental utilizado para avaliação de PZQ na resposta imune de camundongos infectados por *S. mansoni*. No dia 0, cada animal dos grupos infectados sem tratamento (INF60 e INF90) e infectados e tratados (INF+PZQ60 e INF+PZQ90) receberam 50 cercárias de *S. mansoni*. No 45º dia pós-infecção, cada animal dos grupos INF+PZQ60 e INF+PZQ90 recebeu a dose de 50mg/Kg, por via oral de PZQ. Após 60 dias de infecção, todos os animais do período de 60 dias foram eutanasiados (CS60, INF60 e INF+PZQ60). Passados 90 dias do início do experimento, todos os animais do grupo de 90 dias foram eutanasiados.

2.3 *In vitro*: atividade esquistossomicida de PZQ

Durante a eutanásia I (Figura 7), nos animais infectados de 60 dias foi realizada a perfusão do sistema portal e veias mesentéricas com solução salina estéril (NaCl a 0,9% w/v) (SMITHERS; TERRY, 1965) para obtenção dos vermes adultos. Após obtenção dos vermes, as fêmeas foram desprezadas e os machos imediatamente transferidos para meio RPMI 1640 suplementado (100µg/mL de penicilina, 100µg/mL de estreptomicina e 10% de soro bovino fetal) e lavados duas vezes com este meio. Os vermes machos foram distribuídos em placas de cultura com 24 poços, contendo meio suplementado (2mL/poço) e as culturas incubadas a 37°C, em estufa de CO₂. Duas horas após incubação, para permitir a adaptação dos vermes ao meio de cultura, o PZQ foi adicionado nas concentrações 10µg/mL (utilizado como dose controle em estudos experimentais), 1µg/mL e 0,1µg/mL. Vermes incubados em meio RPMI suplementado e sem adição de PZQ serviram como grupo controle negativo.

Todos os experimentos foram realizados em triplicata para cada grupo. Um microscópio invertido foi utilizado para avaliar as condições gerais dos vermes, incluindo a motilidade, alterações no tegumento e sobrevivência, nos tempos de 3, 6, 12, 18, 24 e 48 horas de cultura. Os procedimentos citados basearam-se no protocolo de Soares et al. (2017). O tratamento foi considerado letal quando os vermes não exibirem nenhum tipo de movimento após 2 minutos de observação. A motilidade dos vermes foi pontuada após o tratamento com PZQ de acordo com os critérios de viabilidade marcados numa escala de 0-3 proposto por Horiuchi et al. (2005).

2.4 Avaliação parasitológica

Para quantificar a presença de ovos eliminados nas fezes foi utilizada a técnica de ovos por grama de fezes a partir do protocolo padronizado por Negrão-Corrêa et al. (2004). As amostras de fezes foram coletadas, do reto dos animais eutanasiados, pesadas e diluídas em 2mL de solução salina (0,87% NaCl). Após homogeneização, a amostra foi completada com 10mL de solução formol tamponado a 10%, e posteriormente submetidas a contagem.

Para a quantificação, a solução fecal foi homogeneizada, e foram preparadas três lâminas com alíquotas de 100µL de cada amostra e examinadas ao microscópio óptico. Posteriormente,

transformou-se o valor obtido para ovos por grama de fezes acordo com a fórmula abaixo, onde:
 1- Somatório de ovos encontrados em todas as lâminas analisadas; 2- Número de lâminas analisadas; 3- Volume final resultante da solução fecal; 4- Peso do material (fezes).

$$\frac{\left(\begin{array}{l} \boxed{1} \rightarrow \sum \text{Ovos (lâminas)} \\ \boxed{2} \rightarrow \text{N}^\circ \text{ de lâminas} \end{array} \right)}{\boxed{4} \rightarrow \text{Peso (Fezes)}} \times V \text{ (mL)} \times 10$$

Para quantificar o número de ovos de *S. mansoni* retidos no fígado, durante a eutanásia, o lobo direito de todos os animais foi separado, pesado e digerido, individualmente, em solução de hidróxido de potássio (KOH) 5% a 37°C por 4 h, ou até que não fosse mais possível observar a presença de fragmentos de tecidos (CHEEVER, 1968). O material resultante da digestão tecidual foi transferido para tubos de 15mL e centrifugados por 1 min/200G. O sobrenadante foi desprezado, cuidadosamente, e foram adicionados mais 14mL de solução salina (0,87% NaCl). O procedimento de lavagem foi repetido cinco vezes. Ao final das lavagens, o material foi ressuspensionado em 10mL de solução salina e armazenado a 4°C até a contagem dos ovos.

$$\frac{\left(\begin{array}{l} \boxed{1} \rightarrow \sum \text{Ovos (lâminas)} \\ \boxed{2} \rightarrow \text{N}^\circ \text{ de lâminas} \end{array} \right)}{\boxed{4} \rightarrow \text{Peso (Órgão)}} \times V \text{ (mL)} \times 10$$

2.5 Avaliação histopatológica do fígado e intestino

Amostras de fígado (parte central do lobo lateral esquerdo) e do intestino delgado dos camundongos foram retiradas e fixadas em formol a 10% por 48 horas. Após este período, o material foi imerso em sequência de álcool a 70%, 80%, 95%, absoluto 1 e 2, e posteriormente em

xilol 1 e 2 para clarificação e finalmente, embebido em parafina histológica para inclusão. Após a inclusão em parafina os blocos foram seccionados em micrótomo na espessura de 5µm e os cortes corados com hematoxilina-eosina (LUNA, 1968).

A análise histopatológica foi realizada por microscopia óptica de luz comum, avaliando-se parâmetros patológicos (infiltrado inflamatório, lesão tecidual, necrose e presença de granulomas), através do sistema de escore que determina (0) ausente, (1) leve, (2) moderado e (3) intenso (LIBERIO et al., 2011).

2.6 Análise histomorfométrica do fígado

A análise histomorfométrica do fígado foi realizada por software ImageJ, em imagens de 6 campos aleatórios por amostra histológica para a contagem do número e mensuração da área dos granulomas. As imagens foram feitas usando um microscópio óptico invertido (NIKON®, modelo eclipse Ti-U) acoplado a uma câmera digital e sistema de computador (NIS-*Elements advanced research*). Todas as avaliações foram realizadas por observadores “duplo-cegos”.

2.7 In vivo: Avaliação Imunológica

2.7.1 Análise leucométrica

Após a anestesia dos animais, o sangue foi obtido do plexo retro orbital, colocado em tubo cônico (2mL). Para a contagem diferencial dos leucócitos, foram utilizados 10µL de sangue para a confecção do esfregaço sanguíneo, corado com o kit panótico rápido. Em seguida, 20µL foram diluídos em 400µL da Solução de Turk, para contagem dos leucócitos totais (MACIEL et al., 2014). Após cinco minutos de descanso a temperatura ambiente, o tubo com o sangue foi acondicionado em caixa com gelo, até a formação do coágulo. Após centrifugação (290 G /4°C/10 minutos), o soro foi coletado e congelado.

A contagem diferencial dos leucócitos foi realizada em microscópio óptico de luz comum, sob aumento de 100x, sendo estabelecida a quantidade de cada tipo de célula encontrada ao final da contagem de 100 leucócitos. A contagem global de leucócitos foi realizada em câmara

Neubauer, com auxílio de microscópio óptico de luz comum, sob aumento de 40x. Ao total de células contadas (N), foi aplicada a fórmula: Leucócitos/mm³ = N x 50 (MACIEL et al., 2014).

2.7.2 Dosagem de IgE total

A concentração de IgE total no soro foi realizada pelo kit IgE Mouse Uncoated ELISA (invitrogen/ ThermoFisher), seguindo-se as instruções do fabricante. Inicialmente, os poços da placa de ELISA foram revestidos com 100µL de tampão de revestimento (PBS 10x). A placa foi selada e incubada *overnight* a 4°C. Posterior a este passo, os poços foram lavados 2x com 400µL com solução de lavagem (1x PBS, 0.05% Tween), bloqueados com 250µL do tampão de bloqueio (1:10 tampão de ensaio A (20X) em água deionizada) e incubados por 2 horas. Após este período, os poços foram lavados (2x).

Foram adicionados 100µL do tampão de ensaio A (PBS com 1% TweenTM-20 e 10% BSA) em todos os poços da curva padrão. Nos poços A1 e A2 foram colocados 100µL do padrão reconstituído (250ng/mL) fornecido pelo fabricante. Destes poços (A1 e A2) foram transferidos 100µL para os poços B1 e B2, sendo uma curva padrão construída com 250, 125, 62.5, 31.25, 15.62, 7.8 e 3.9ng/mL. Nos poços em branco foram adicionados 100µL do tampão de ensaio.

Foram adicionados 50µL do tampão de ensaio A nos poços de amostra e 50µL das amostras de soro, pré-diluídas também no tampão de ensaio A. A placa foi coberta e incubada em ambiente por 2 horas, com auxílio de um agitador de microplacas ajustado para 400rpm. Após isso, a placa foi lavada (4x). Foram adicionados 100µL/poço do anticorpo de detecção (1:250) e a placa foi incubada por uma hora. Posteriormente a este período, a placa foi lavada (4x). Foram adicionados 100µL de Estreptavidina (HRP) em todos os poços e incubada em temperatura ambiente por 30 minutos. Após a aspiração e lavagem (4x), foram adicionados 100µL de solução substrato (Tetrametilbenzidina) em cada poço e incubados durante 15 minutos. Após este período foram adicionados 100µL da solução de parada (2 N H₂SO₄) em cada poço. A leitura da intensidade da placa foi realizada no leitor de microplacas com filtro de 450nm.

2.7.3 Obtenção e contagem das células dos órgãos linfoides

Para obtenção das células da medula óssea, o fêmur da pata esquerda de cada animal dos grupos experimentais foi perfundido com 1 mL de PBS estéril. O baço foi retirado, pesado e triturado em 3 mL de PBS estéril, e a suspensão celular obtida foi mantida em banho de gelo e diluída 50x em PBS para contagem. Para a contagem, as suspensões celulares foram fixadas e coradas de cristal violeta, na proporção 9:1. As contagens celulares foram realizadas em câmara de Neubauer, com auxílio de um microscópio óptico de luz comum (CRUZ et al., 2007).

2.7.4 Fenotipagem das células do baço

As células do baço (1×10^6 /mL) dos camundongos foram ressuspensas em 100 μ L de PBS estéril e transferidas para uma placa de 96 poços de fundo redondo e centrifugadas (340 G / 4°C / 3 minutos). Após centrifugação o sobrenadante foi descartado e adicionou-se 200 μ L de PBSA 1% (PBS 1x mais BSA 1%) ao pellet formado para ser lavado por duas vezes. Após a lavagem foi adicionado aos poços 50 μ L anticorpo Fc Block (BD Pharmingen) na proporção de 1 μ L do anticorpo:100 μ L de PBSA 1% em todos os poços para incubar por 15 minutos a 4°C. Adicionou-se 150 μ L de PBSA 1% e foi feita centrifugação das células a 340 G; 4°C durante 3 minutos. O sobrenadante foi descartado novamente e o pellet desprendido para ser incubado com o 100 μ L do mix de anticorpos e incubados durante 20 minutos ao abrigo da luz a 4°C. Após o período de incubação foi adicionado mais 200 μ L de PBSA 1% para o pellet ser centrifugado duas vezes (340 G / 4°C / 3 min). Em seguida, as células foram fixadas com paraformaldeído à 4% e incubadas por 15 minutos à 4°C ao abrigo da luz para em seguida serem novamente lavadas por mais duas vezes com PBSA 1%. Após a última lavagem, o pellet foi ressuspensão em 150 μ L de PBSA 1%. As suspensões de células foram transferidas para microtubos de leitura para aquisição de 20000 eventos no citômetro de fluxo FACScalibur (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA). Os dados foram analisados no programa Flow Jow®(TreeStar).

Para a marcação das células do baço foram montados 3 painéis com os seguintes anticorpos monoclonais conjugados com fluorocromos: anti-CD3 conjugado com FITC; anti-CD28 e anti-CD19 conjugados com PE; anti-CD4 e anti-CD8 conjugados com PerCP; e anti-F4/80 conjugado com PerCP-Cy5.5; (BD Biosciences Pharmingen) (Quadro 2). Para cada painel foi realizada a marcação com os respectivos isotipos no pool de células. Para calibração do citômetro, foi realizado

um pool de células, que foram utilizadas no controle branco (sem anticorpo conjugado) e três controles positivos 1, 2 e 3 (marcados com um anticorpo conjugado com fluorocromo da molécula mais expressa para seu canal correspondente).

Quadro 2. Painéis para marcação das células do sobrenadante do baço de camundongos.

FLUOROCROMO	FITC	PerCP	PE	PerCP-Cy5.5
PAINEL 1	CD3	CD4	CD28	-
PAINEL 2	CD3	CD8	CD28	-
PAINEL 3	-	-	CD19	F4/80

2.7.5 Dosagem de citocinas de perfil de resposta Th1 e Th2

A quantificação das citocinas (IFN- γ , TNF α , IL-2, IL-4, IL-6 e IL-10) foi realizada pela técnica de Cytometric Bead Array (CBA), a partir do sobrenadante das culturas de baço dos animais, usando kit disponíveis comercialmente e de acordo com as instruções do fabricante (BD® Cytometric Bead Array (CBA) Mouse Th1/Th2/Th17). O limite de detecção de cada citocina estão listados no Anexo C. A leitura das amostras foi realizada no citômetro de fluxo FACScalibur (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA). Após a leitura, os dados foram analisados no software FCAP Array v3®, onde os valores foram expressos em pg/mL para cada citocina.

2.7.6 Análise Estatística

Os dados foram analisados no software Prism 8 (GraphPad, San Diego, CA, EUA). A normalidade foi avaliada com o teste de Kolmogorov-Smirnov. Os resultados estão apresentados em média \pm desvio padrão (S.D). Para os ensaios *in vitro* foram utilizados a curva de Kaplan Meier e teste de Log-Rank. Os dados obtidos dos ensaios *in vivo* foram analisados pelo teste *t* de Student ou por análise de variância (ANOVA), com o pós-teste de Bonferroni. Para análises de correlação foi utilizado o teste de Pearson. Em todos os casos, os resultados foram considerados significativos quando $p < 0,05$.

3 RESULTADOS

3.1 Eficácia de PZQ e comprovação da cepa

A análise de viabilidade demonstrou que 50% dos machos de *S. mansoni* em contato com 10 μ g/mL de PZQ apresentavam atividade mínima ou estavam imóveis (escore 1) após 3 horas de exposição. Após, 6 horas de cultura (escore 0), os vermes expostos a 10 μ g/mL de PZQ morreram. Os vermes expostos a 1 μ g/mL de PZQ apresentaram 50% de viabilidade após 6h, e morreram em 24h de exposição. Os helmintos expostos a 0.1 μ g/mL apresentaram a redução na viabilidade após 24h de exposição, em 48h a sobrevivência foi reduzida a 50%. O controle negativo (sem adição de PZQ) apresentou o tempo médio de sobrevivência de 48 horas (escore 3) de cultura (Figura 7).

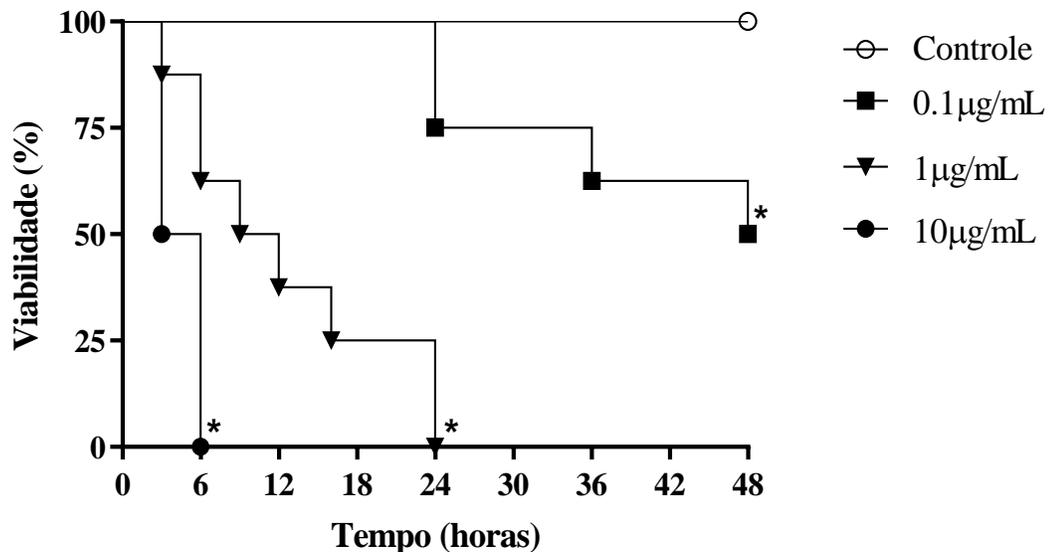


Figura 7. Viabilidade de vermes machos adultos de *Schistosoma mansoni* (CEPA LE – Belo Horizonte/MG) durante 48 horas de exposição ao fármaco Praziquantel®. Foram utilizados dois vermes machos por poço em triplicata em diferentes concentrações (μ g/mL) de PZQ. No controle negativo utilizou-se apenas meio. A viabilidade dos vermes foi monitorada através da escala de viabilidade que varia de 0 a 3 (3=movimento corporal completo; 2 a 1.5= mobilidade lenta e parcial; 1= atividade mínima ou imóvel, mas o verme ainda vivo; 0= verme morto). Para avaliar o percentual de sobrevivência foi utilizada a curva de Kaplan Meier e a análise estatística foi realizada pelo teste de Log-Rank. * $p < 0.05$ em comparação ao controle negativo.

3.2 Redução na carga parasitária

O tratamento com PZQ reduziu o número total de ovos por gramas de fezes e ovos retidos no fígado nas infecções de 60 e 90 dias (INF+PZQ60 e INF+INF+PZQ90), respectivamente. Não foram encontrados ovos nas amostras de fezes coletadas no grupo infectado por 60 dias e tratados com PZQ (Figura 8A). Assim, a partir dos dados expressos na figura 8A e 8B é seguro dizer que PZQ foi eficaz contra o verme adulto, confirmando que a cepa utilizada possui sensibilidade ao fármaco.

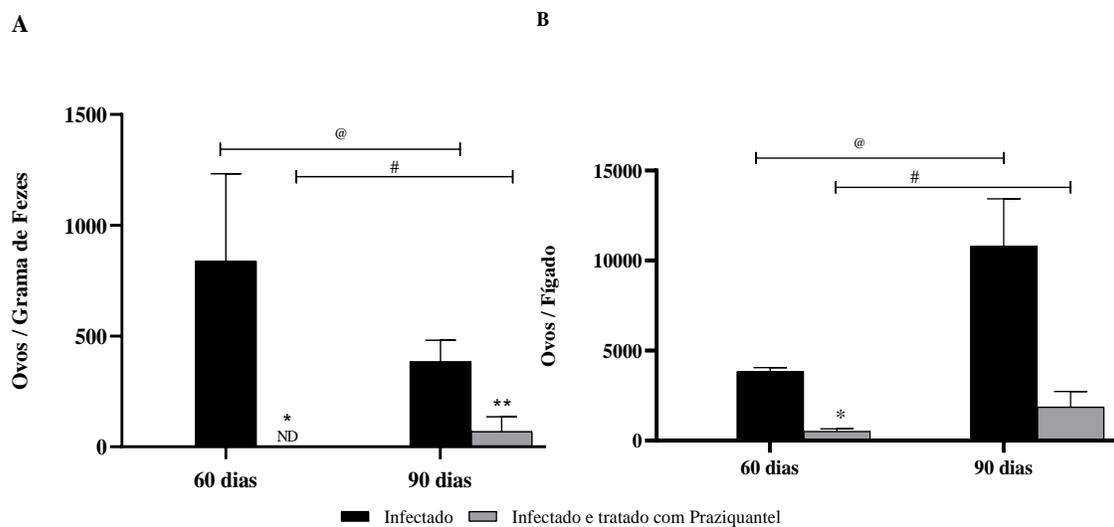


Figura 8. Efeito do tratamento com Praziquantel® sobre o número de ovos presentes nas fezes (A) e retidos no lobo direito do fígado (B) de camundongos infectados por *S. mansoni* em diferentes períodos da infecção (60 e 90 dias). O número total de ovos eliminados por grama de fezes foi estimado a partir do método de diluição com solução salina (0,85% NaCl) e solução de formol tamponado a 10%. O número de ovos retidos no fígado foi quantificado pelo método de digestão completa com KOH 5%. No dia 0, os camundongos foram infectados com 50 cercárias e eutanasiados no 60º e 90º dia. Os grupos sadios (CS60 e CS90) não foram infectados e nem receberam tratamento. Os grupos INF60 e INF90 foram infectados e não receberam tratamento. Os grupos infectados e tratados (INF+PZQ60 e INF+PZQ90) receberam do 45º ao 51º dia, por via oral, Praziquantel® na dose de 50mg/kg. Os valores representam a média \pm desvio de 6 animais por grupo. * $p < 0.05$ em comparação grupo infectado e sem tratamento da fase aguda (INF60); ** $p < 0.05$ em comparação grupo infectado e sem tratamento da fase crônica (INF90); # $p < 0.05$ em comparação aos grupos tratados (INF+PZQ60 e INF+PZQ90) e; @ $p < 0.05$ quando comparados os dois grupos infectados e sem tratamento (INF60 e INF90). Os valores de p foram obtidos pelo teste de T de Student.

3.3 O tratamento com Praziquantel reduz a patologia hepática de camundongos infectados durante a fase aguda da infecção por *S. mansoni*

Em relação a análise histopatológica do fígado (Tabela 1), os camundongos infectados por *S. mansoni* e não tratados (INF60 e INF90) apresentaram aumento em todos os parâmetros analisados, em relação aos seus respectivos controles limpos (CS60 e CS90). Em relação ao tratamento, foi observado que o grupo tratado da fase aguda (INF+PZQ60) diminuiu todos os parâmetros analisados em relação ao seu controle infectado e sem tratamento (INF60).

Na fase crônica, PZQ não demonstrou efeito sob o infiltrado, necrose, lesão tecidual e presença de granulomas em relação seu controle infectado e não tratado (INF90). O grupo tratado na fase crônica (INF+PZQ90) em relação ao grupo da fase aguda (INF+PZQ60), apresentou maior número de lesões e granulomas (Tabela 1).

Tabela 1. Análise histopatológica do tecido hepático de camundongos infectados ou não por *S. mansoni*, e tratados ou não Praziquantel por sistema de escores.

	Grupos					
	CS60	INF60	INF+PZQ60	CS90	INF90	INF+PZQ90
Infiltrado	1 ±0	3 ±0	2 ±0*	0	1±0#	1±0@
Necrose	0	2 ±0	1 ±0*	0	2±0	2±0
Lesão tecidual	1 ±0	3 ±0	2 ±0*	0	3±0	3±0@
Presença de granulomas	0	3 ±0	1 ±0*	0	3±0	3±0@

^aNo dia 0, os camundongos foram infectados com 50 cercárias de *S. mansoni*, metade do grupo foi eutanasiada no 60º dia e os demais no 90º dia após a infecção. Os grupos sadios (CS60 e CS90) não foram infectados e tratados. Os controles negativos (INF60 e INF90) foram infectados por *S. mansoni* e não receberam tratamento. Os grupos tratados por Praziquantel (INF+PZQ60 e INF+PZQ90) foram tratados do 45º ao 51º dia, por via oral, na dose de 50mg/kg.

^b Os valores representam a média ± desvio padrão de 6 animais por grupo. *p<0.05 em comparação aos grupos infectados e sem tratamento da fase aguda (INF60). # p<0.05 quando comparado os dois grupos infectados sem tratamento (INF60 e INF90); @ p<0.05 em comparação ao grupo infectado e tratado por praziquantel (INF+PZQ60). Os valores de p foram obtidos pelo teste de ANOVA (Ordinary One way ANOVA com o pós-teste de Bonferroni).

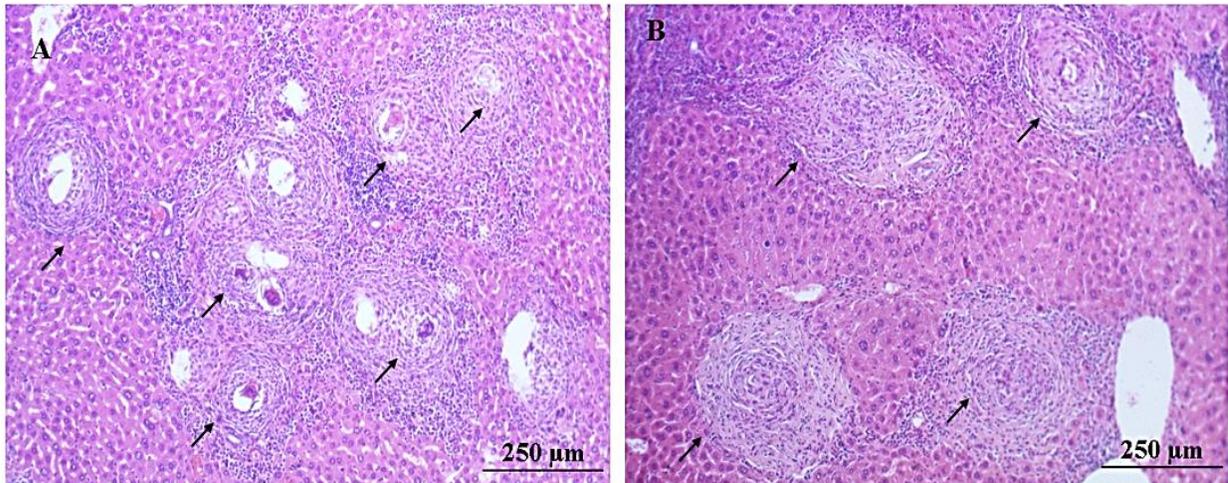


Figura 9. Fotomicrografia de cortes histológicos hepáticos de camundongos infectados *S. mansoni*, durante 60 dias, e tratados com Praziquantel, corados com HE (40x). (A) Animais infectados por *S. mansoni* e não tratados da fase aguda (INF60) e (B) animais infectados e tratados do 45° ao 51° dia, por via oral com Praziquantel na dose de 50mg/kg (INF+PZQ60). As setas indicam áreas de granulomas ocasionadas pela resposta imune ao ovo de *S. mansoni*.

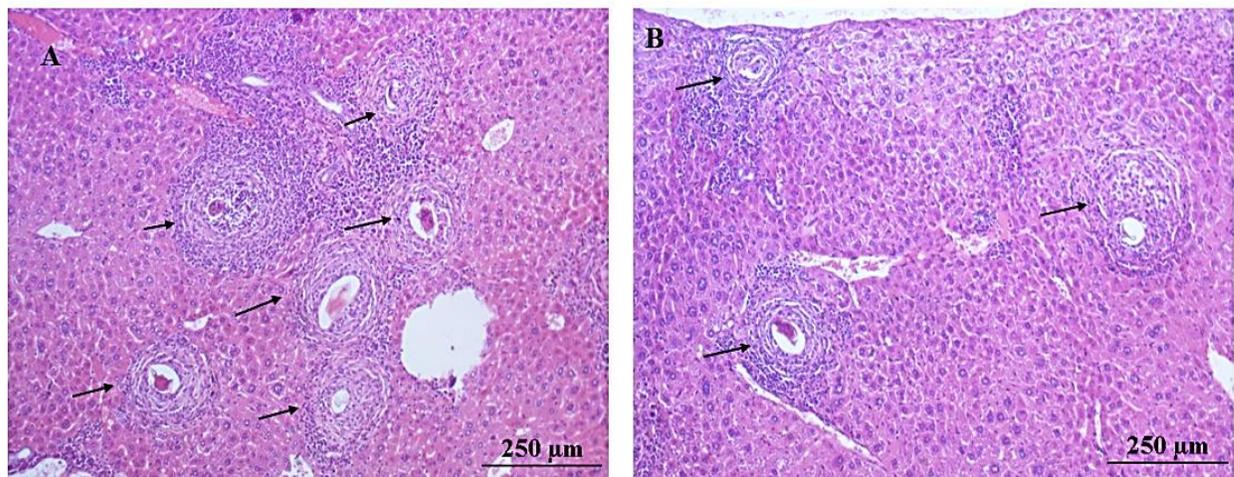
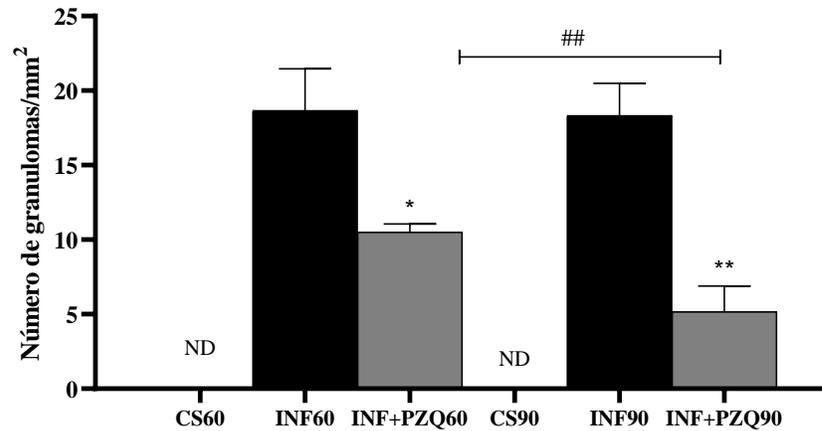


Figura 10. Fotomicrografia de cortes histológicos hepáticos de camundongos infectados *S. mansoni*, durante 90 dias, e tratados com Praziquantel, corados com HE (40x). (A) Animais infectados por *S. mansoni* e não tratados da fase crônica (INF90) e (B) animais infectados e tratados do 45° ao 51° dia, por via oral com Praziquantel na dose de 50mg/kg (INF+PZQ90). As setas indicam áreas de granulomas ocasionadas pela resposta imune ao ovo de *S. mansoni*.

3.4 Praziquantel reduz o número de granulomas em camundongos infectados experimentalmente por *S. mansoni*, nas fases aguda e crônica

Em relação aos granulomas, que são umas das principais características da patologia da doença, foi observado que o tratamento com Praziquantel diminuiu o número de granulomas em 56,25% na fase aguda (INF+PZQ60) e 28,18% na fase crônica (INF+PZQ90) (Figura 11A). Já em relação a área dos granulomas nos animais infectados por *S. mansoni* e tratados por PZQ observamos que apenas na fase aguda houve uma redução significativa em relação aos animais infectados e não tratados (Figura 11B).

A



B

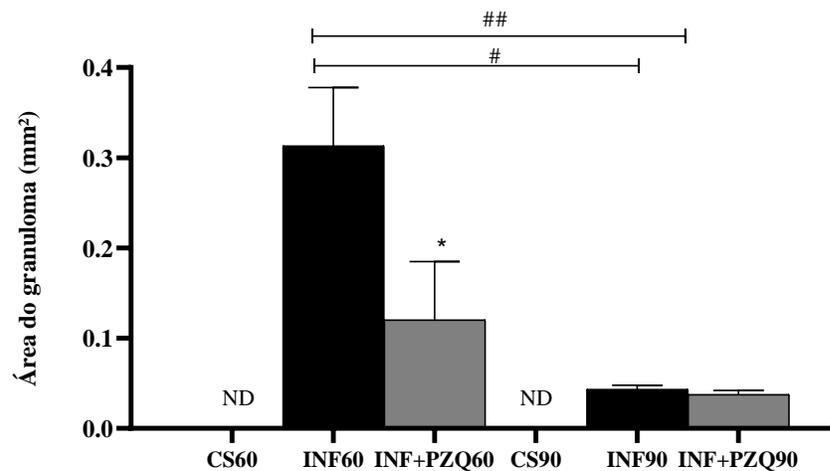


Figura 11. Número de granulomas (A) e análise morfométrica da área de granulomas (B) no tecido hepático de camundongos infectados ou não por *S. mansoni*, e tratados ou não com Praziquantel. A análise foi realizada usando o software ImageJ em imagens de cortes histológicos (corados com HE) da parte central do lobo lateral esquerdo do fígado de animais que no dia 0 foram infectados com 50 cercárias, e após 60 dias de infecção metade do grupo experimental foi eutanasiado e após 90 dias de infecção os demais foram eutanasiados. Os grupos sadios (CS60 e CS90) não foram infectados e nem receberam tratamentos. Os grupos INF60 e INF90 foram infectados por *S. mansoni*, mas não receberam nenhum tipo de tratamento. Os grupos tratados por Praziquantel receberam do 45º ao 51º dia), por via oral o medicamento na dose de 50mg/kg. Os valores representam a média \pm desvio padrão de 6 animais por grupo. * $p < 0.05$ em comparação ao grupo infectado e sem tratamento da fase aguda (INF60); ** $p < 0.05$ em comparação ao grupo infectado e sem tratamento da fase crônica (INF90); # $p < 0.05$ em comparação ao grupo infectado e tratado por PZQ da fase aguda (INF+PZQ60). Os valores de p foram obtidos pelo teste de *T* de Student.

3.5 O tratamento com Praziquantel reduz a inflamação no intestino de camundongos infectados por *S. mansoni* por 90 dias.

A análise histopatológica do intestino dos animais infectados por *S. mansoni* e tratados com PZQ na fase aguda não demonstraram resultados significativos para os parâmetros analisados. (Tabela 2). O tratamento com PZQ na fase crônica reduziu o infiltrado inflamatório, a lesão tecidual e a quantidade de granulomas. Os animais infectados e tratados da fase crônica (INF+PZQ90) apresentaram resultados significativos também quando comparados aos da fase aguda (INF+PZQ60).

Tabela 2. Análise histopatológica do intestino de camundongos infectados ou não por *S. mansoni*, e tratados ou não Praziquantel por sistema de escores.

	Grupos					
	CS60	INF60	INF+PZQ60	CS90	INF90	INF+PZQ90
Infiltrado	1 ± 0	2 ± 0 [#]	1.8 ± 0.8	0	2.5 ± 0.5 ^{##}	0.7 ± 0.5 ^{**@}
Necrose	0	0	0	0	0	0
Lesão tecidual	0	1.8 ± 0.4 [#]	1.5 ± 0.8	0	2.5 ± 0.5 ^{##}	0.6 ± 0.5 ^{**@}
Presença de granulomas	0	1.6 ± 0.5 [#]	1.5 ± 0.5	0	2.5 ± 0.5 ^{###}	0.6 ± 0.5 ^{**@}

^aNo dia 0, os camundongos foram infectados com 50 cercárias de *S. mansoni*, metade do grupo foi eutanasiada no 60º dia e os demais no 90º dia após a infecção. Os grupos sadios (CS60 e CS90) não foram infectados e tratados. Os controles negativos (INF60 e INF90) foram infectados por *S. mansoni* e não receberam tratamento. Os grupos tratados por Praziquantel (PZQ -60 e INF+PZQ90) foram tratados do 45º ao 51º dia, por via oral, na dose de 50mg/kg.

^b Os valores representam a média ± desvio padrão de 6 animais por grupo. # p<0.05 quando comparado ao sadio da fase aguda (CS60); ##p<0.05 quando comparado ao grupo sadio da fase crônica (CS90); *p<0.05 em comparação ao grupo infectado e sem tratamento da fase aguda (INF60). **p<0.05 quando comparado ao grupo infectado e sem tratamento da fase crônica (INF90); @ p<0.05 em comparação ao grupo infectado e tratado por praziquantel (INF+PZQ60). Os valores de p foram obtidos pelo teste de ANOVA (Ordinary One way ANOVA com o pós-teste de Bonferroni).

3.6 Camundongos infectados por *S. mansoni* e tratados por PZQ possuem alteração em parâmetros leucométricos.

Os dados relacionados ao perfil leucométrico de camundongos infectados por *S. mansoni*, na fase aguda e crônica, e tratados por PZQ estão demonstrados na tabela 3, considerando a frequência absoluta.

Animais infectados e tratados por PZQ durante a fase aguda (INF+PZQ60) apresentaram redução de eosinófilos no sangue quando comparados ao grupo INF60 (Tabela 3). Para a fase crônica da infecção (90 dias), foi observado que no grupo INF+PZQ90 ocorreu redução do número de leucócitos totais e aumentou no número de linfócitos em relação ao grupo INF90.

Entre os dois grupos infectados, em diferentes fases da infecção, e tratados por PZQ sempre ocorreu redução em leucócitos totais, neutrófilos, monócitos e eosinófilos, e aumento no número de linfócitos na fase crônica (INF+PZQ90) (Tabela 3).

Tabela 3. Contagem global e diferencial de leucócitos do sangue de camundongos infectados ou não por *S. mansoni*, e tratados ou não por Praziquantel®.

Células (x10 ³ /mm ³)	Grupos					
	CS60	INF60	INF+PZQ60	CS90	INF90	INF+PZQ90
Leucócitos	3.7 ± 0.6	6.5 ± 0.9 [#]	5.8 ± 1.6	3.9 ± 2.6	5.9 ± 0.9	3.4 ± 0.9 ^{**@}
Neutrófilos	2.6 ± 0.5	3.0 ± 0.4	3.4 ± 1.0	2.3 ± 1.9	1.2 ± 0.4 [*]	1.2 ± 0.7 [@]
Linfócitos	1.0 ± 0.3	0.6 ± 0.2	0.6 ± 0.3	1.3 ± 0.6	0.8 ± 0.2	1.8 ± 0.8 ^{**@}
Monócitos	0.1 ± 0.1	1.4 ± 0.6 [#]	1.3 ± 0.6	0.2 ± 0.1	0.4 ± 0.2 [*]	0.3 ± 0.2 [@]
Eosinófilo	0.0 ± 0.0	1.4 ± 0.4 [#]	0.6 ± 0.3 [*]	0.0 ± 0.0	0.3 ± 0.2 [*]	0.0 ± 0.0 [@]

^a No dia 0, os camundongos foram infectados com 50 cercárias de *S. mansoni*, metade do grupo foi eutanasiada no 60º dia (n=6) e os demais no 90º dia após a infecção (n=6). Os grupos sadios (CS60 e CS90) não foram infectados e não tratados. Os controles negativos (INF60 e INF90) foram infectados e não receberam tratamento. Os grupos tratados por Praziquantel (INF+PZQ60 e INF+PZQ90) foram tratados do 45º ao 51º dia, por via oral, na dose de 50mg/kg.

^b Os valores representam a média ± desvio padrão de 6 animais por grupo. # p<0.05 em comparação ao controle sadio da fase aguda (CS60). *p<0.05 em comparação ao grupo infectado e sem tratamento da infecção aguda (INF60). ** p<0.05 em comparação ao grupo infectado e sem tratamento da fase crônica (INF90). @ p<0.05 em comparação ao grupo infectado e tratado por PZQ (INF+PZQ60). Os valores de p foram obtidos pelo teste de T de Student.

3.7 O tratamento com Praziquantel em animais infectados por *Schistosoma* não interfere na concentração sérica de IgE

A infecção por *S. mansoni* resulta em aumento na concentração sérica de IgE total em animais não tratados, independente da fase da doença (INF60 e INF90) quando comparado aos animais não infectados. Na fase crônica sem tratamento (INF90) é observada a diminuição da concentração da IgE nos camundongos em relação a fase aguda (INF60) (Figura 12).

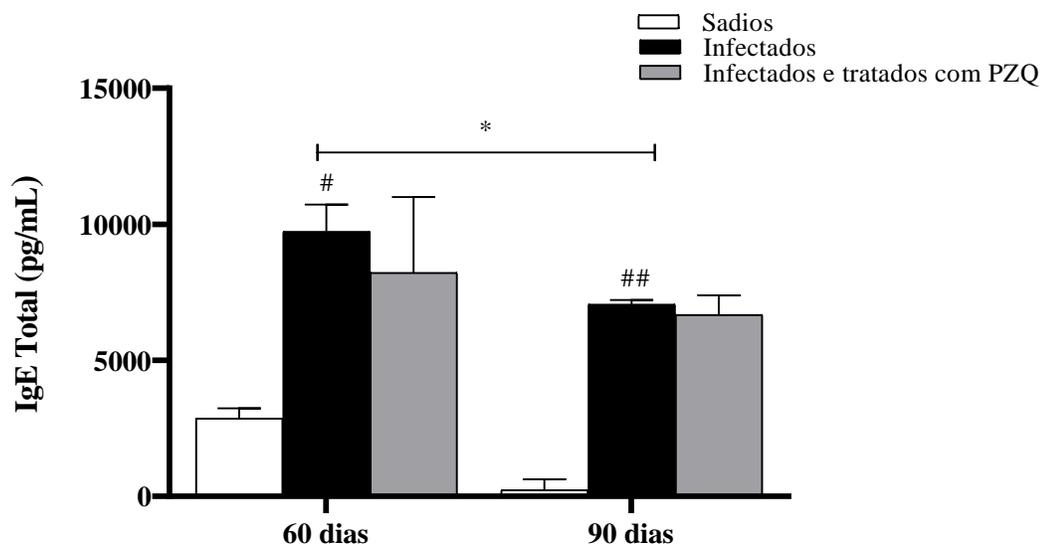


Figura 12. Concentrações séricas de IgE total de camundongos infectados ou não por *S. mansoni*, e tratados ou não com Praziquantel® em tempos diferentes de infecção. O soro foi obtido de animais que, no dia 0 foram infectados com 50 cercárias e eutanasiados nos 60º e 90º dia. Os grupos sadios não foram infectados e tratados (CS60 e CS90). Os controles negativos foram infectados e não receberam tratamento (INF60 e INF90). Os grupos tratados por PZQ (INF+PZQ60 e INF+PZQ90) receberam tratamento entre os dias 45º a 51º dia, por via oral, dose de 50mg/kg. # $p < 0.05$ em comparação ao controle sadio da infecção de fase aguda (CS60); ## $p < 0.05$ em comparação ao controle sadio da infecção de fase crônica (CS90); * $p < 0.05$ em comparação ao grupo infectado por 60 dias e sem tratamento (INF60). Os valores de p foram obtidos pelo teste de *T* de Student.

3.8 O tratamento com Praziquantel não interfere na celularidade total e no peso do baço

Em relação ao baço, foi observado o aumento no número de células (Figura 13A) e peso (Figura 13B) do órgão, tanto na fase aguda quanto crônica, nos grupos de animais infectados e sem tratamento (INF60/INF90) em relação aos grupos sadios (CS60/CS90). Os grupos tratados por PZQ não exibiram alterações em seu número de células para ambas as fases da infecção.

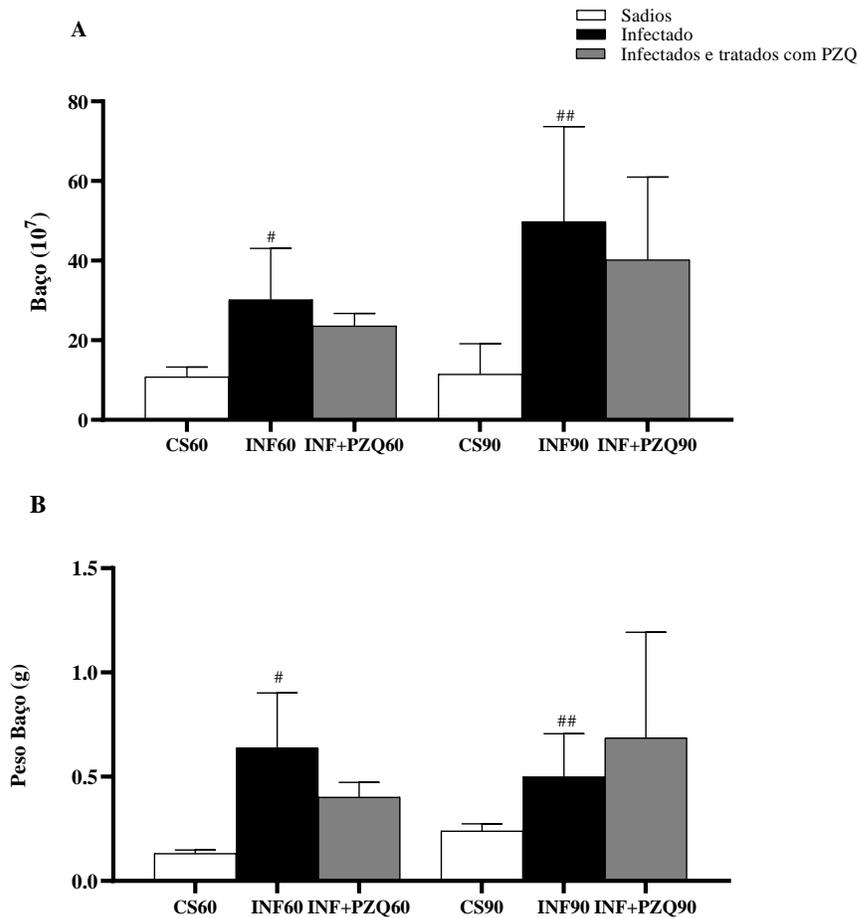


Figura 13. Celularidade total (A) e peso (B) do baço de camundongos infectados ou não por *S. mansoni*, e tratados ou não com Praziquantel. As células do baço foram obtidas dos animais que, no dia 0 foram infectados com 50 cercárias. Metade do grupo foi eutanasiada no 60º dia (n=6) e os demais no 90º dia após a infecção (n=6). Os grupos sadios (CS60 e CS90) não foram infectados e tratados. Os controles negativos (INF60 e INF90) foram infectados e não receberam tratamento. Os grupos tratados por Praziquantel (PZQ -60 e INF+PZQ90) receberam tratamento do dia 45º ao 51º, por via oral, na dose de 50mg/kg. A suspensão celular do baço foi contada em câmara de Neubauer. Os valores representam a média \pm desvio padrão de 6 animais por grupo. # $p < 0.05$ em comparação ao controle sadio de 60 dias (CS60). ## $p < 0.05$ em comparação ao controle sadio de 90 dias (CS90). Os valores de p foram obtidos pelo teste de T de Student.

3.9 O tratamento com Praziquantel reduz o número de linfócitos B na fase crônica da infecção por *S. mansoni*

O tratamento com PZQ alterou somente o número de linfócitos T no grupo infectado e tratado de 90 dias (INF+PZQ90), em relação ao grupo infectado e tratado de 60 dias (Figura 14A). A infecção sempre aumentou o número de linfócitos B (CD19⁺), exceto no grupo infectado e tratado de 90 dias (INF+PZQ90), onde observamos redução dessa população em relação aos demais (Figura 14B). Adicionalmente, a infecção aumentou o número de macrófagos em todos os grupos, embora não tenha sido observado diferença entre os grupos tratados e os não tratados (Figura 14C).

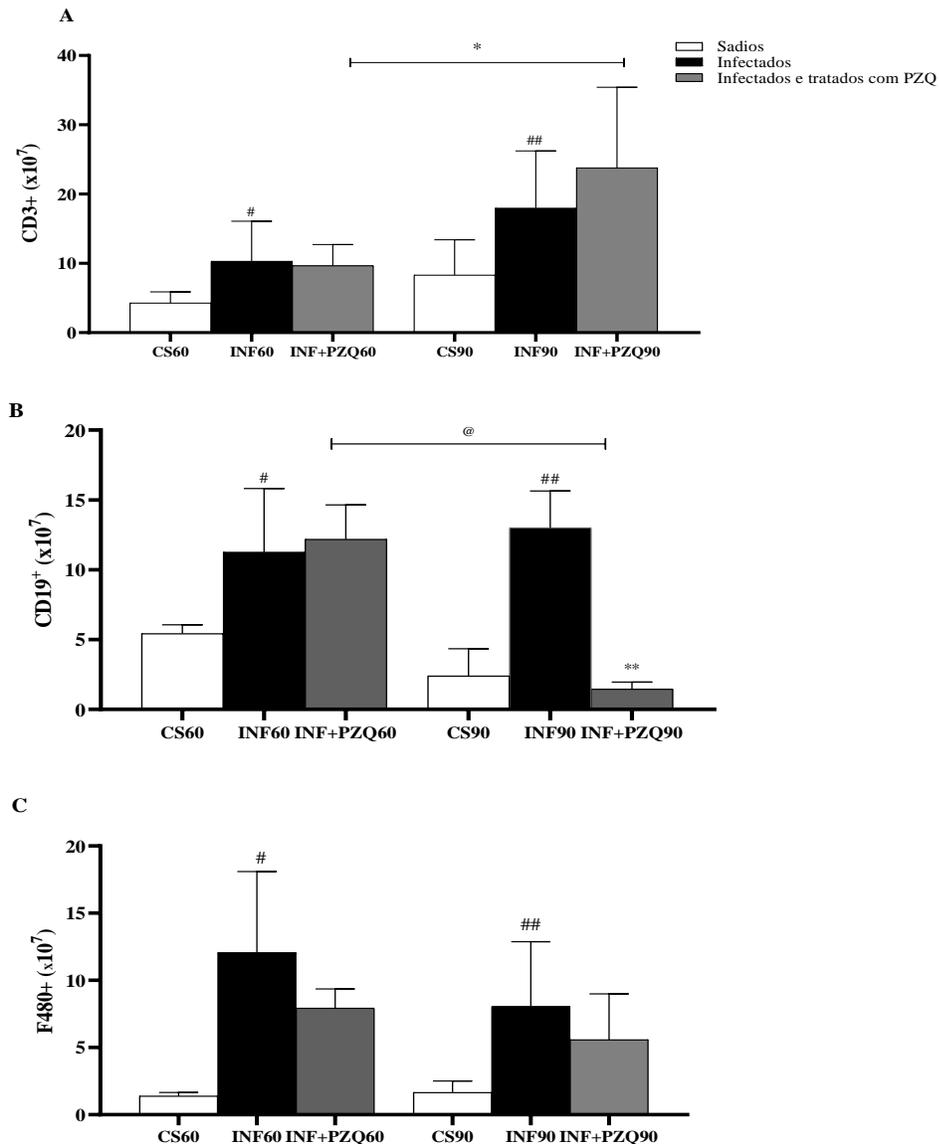


Figura 14. Caracterização fenotípica dos linfócitos T (A), B (B) e macrófagos (B) do baço de camundongos infectados ou não por *S. mansoni*, e tratados ou não com Praziquantel. As células do baço foram obtidas dos animais que, no dia 0 foram infectados com 50 cercárias. Metade do grupo foi eutanasiada no 60º dia (n=6) e os demais no 90º dia após a infecção (n=6). Os grupos sadios (CS60 e CS90) não foram infectados e tratados. Os controles negativos (INF60 e INF90) foram infectados e não receberam tratamento. Os grupos tratados por Praziquantel (PZQ - 60 e INF+PZQ90) receberam tratamento do dia 45º ao 51º, por via oral, na dose de 50mg/kg. Para a marcação das células do baço foram montados 3 painéis com os seguintes anticorpos monoclonais conjugados com fluorocromos: anti-CD3 conjugado com FITC; anti-CD28 e anti-CD19 conjugados com PE; anti-CD4 e anti-CD8 conjugados com PerCP; e anti-F4/80 conjugado com PerCP-Cy5.5; (BD Biosciences Pharmingen). Para cada painel foi realizada a marcação com os respectivos isotipos no pool de células. Os valores representam a média \pm desvio padrão de 6 animais por grupo. # p<0.05 em comparação ao controle sadio de 60 dias (CS60). ## p<0.05 em comparação ao controle sadio de 90 dias (CS90). **p<0.05 em comparação ao grupo infectado e sem tratamento de 90 dias (INF90). @ p<0.05 quando comparado os grupos INF+PZQ60 e INF+PZQ90. Os valores de p foram obtidos pelo teste de *T* de Student.

3.10 O tratamento com Praziquantel não interfere no número de linfócitos T auxiliares e citotóxicos no baço de camundongos infectados por *S. mansoni*

O número de linfócitos T auxiliares (Figura 15A e 15B) e citotóxicos (Figura 15C e 15D) não foi alterado nos animais tratados por PZQ (INF+PZQ60 e INF+PZQ90) em relação aos seus respectivos controles infectados e sem tratamento (INF60 e INF90) para ambas as fases estudadas. Entretanto, quando comparado os grupos tratados entre si (INF+PZQ60 e INF+PZQ90) observou-se que na infecção de 90 dias (crônica) os animais tratados apresentaram maior quantidade de linfócitos T auxiliares e citotóxicos.

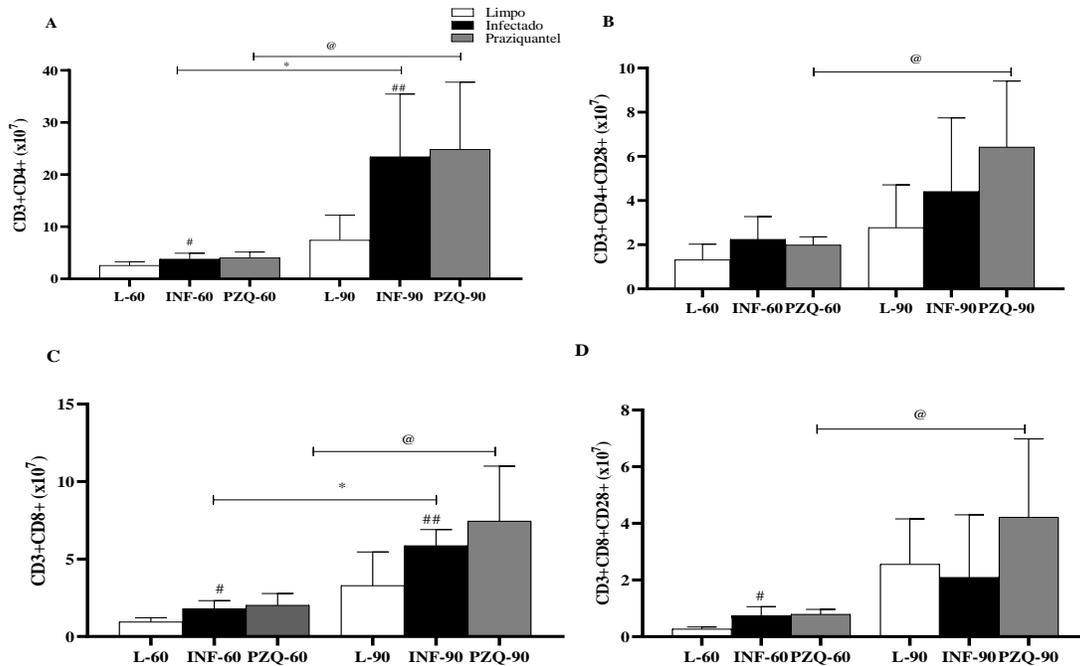


Figura 15. Caracterização fenotípica dos linfócitos T auxiliares (A e B) e linfócitos T citotóxicos (C e D) do baço de camundongos infectados ou não por *S. mansoni*, e tratados ou não com Praziquantel. As células do baço foram obtidas dos animais que, no dia 0 foram infectados com 50 cercárias. Metade do grupo foi eutanasiada no 60º dia (n=6) e os demais no 90º dia após a infecção (n=6). Os grupos sadios (CS60 e CS90) não foram infectados e tratados. Os controles negativos (INF60 e INF90) foram infectados e não receberam tratamento. Os grupos tratados por Praziquantel (PZQ -60 e INF+PZQ90) receberam tratamento do dia 45º ao 51º, por via oral, na dose de 50mg/kg. Para a marcação das células do baço foram montados 3 painéis com os seguintes anticorpos monoclonais conjugados com fluorocromos: anti-CD3 conjugado com FITC; anti-CD28 e anti-CD19 conjugados com PE; anti-CD4 e anti-CD8 conjugados com PerCP; e anti-F4/80 conjugado com PerCP-Cy5.5; (BD Biosciences Pharmingen). Para cada painel foi realizada a marcação com os respectivos isotipos no pool de células. Os valores representam a média \pm desvio padrão de 6 animais por grupo. # $p < 0.05$ em comparação ao controle sadio de 60 dias (CS60). ## $p < 0.05$ em comparação ao controle sadio de 90 dias (CS90). @ $p < 0.05$ em comparação ao grupo infectado e tratado por Praziquantel na fase aguda (INF+PZQ60). Os valores de p foram obtidos pelo teste de T de Student.

3.11 O tratamento com PZQ diminui as concentrações de citocinas de perfil Th1

Na fase aguda não foram observadas detecções significativas de IL-2 e IFN- γ nos grupos tratados por PZQ (Figura 16A e 16B). Para as citocinas TNF- α (Figura 16C) e IL-6 (Figura 16D) foi observada a diminuição nas concentrações no grupo infectado e tratado por PZQ (INF+PZQ60) quando comparado ao grupo infectado não tratado (INF60).

Para a fase crônica não foram observados dados significativos para IL-2 (Figura 16A). Em relação as citocinas IFN- γ (Figura 16B), TNF- α (Figura 16C) e IL-6 (Figura 16D), os grupos infectados e tratados por PZQ (INF+PZQ90) apresentaram diminuição em suas concentrações, em relação aos grupos infectados e sem tratamento (INF90).

3.12 O tratamento com PZQ diminui a concentração de citocinas anti-inflamatória e regulatória na infecção de 90 dias

Nos animais da fase aguda (60 dias), as concentrações de IL-4 e IL-10 não foram detectadas (Figuras 17A e 17B). Para a fase crônica, observamos que o grupo infectado e tratado com PZQ (INF+PZQ90) diminuiu as concentrações de IL-4 e IL-10 após o tratamento, quando comparado ao grupo infectado e não tratado da mesma fase da infecção (INF90) (Figuras 17A e 17B). Entre os grupos infectados e tratados por PZQ (INF+PZQ60 e INF+PZQ90), nas diferentes fases da infecção, não foram encontrados resultados significativos.

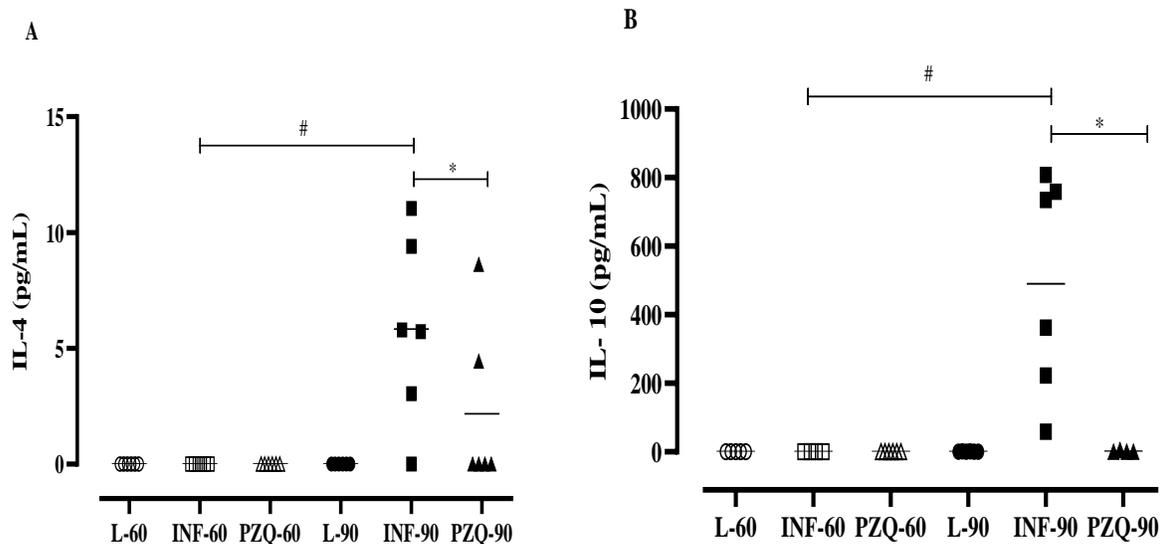


Figura 17. Efeito do tratamento de Praziquantel durante a infecção por *S. mansoni* sobre as concentrações de citocinas IL-4 e IL-10 em sobrenadante de cultura do baço de camundongos. No dia 0, os camundongos foram infectados com 50 cercárias de *S. mansoni*, metade do grupo foi eutanasiada no 60º dia (n=6) e os demais no 90º dia após a infecção (n=6). Os grupos sadios (CS60 e CS90) não foram infectados e tratados. Os controles negativos (INF60 e INF90) foram infectados e não receberam tratamento. Os grupos tratados por Praziquantel (PZQ -60 e INF+PZQ90) foram tratados do 45º ao 51º dia, por via oral, na dose de 50mg/kg. A quantificação das citocinas foi realizada pela técnica de Cytometric Bead Array (CBA), a partir do sobrenadante das culturas de baço dos animais, usando kit disponíveis comercialmente e de acordo com as instruções do fabricante (BD® Cytometric Bead Array (CBA) Mouse Th1/Th2/Th17). A leitura das amostras foi realizada no citômetro de fluxo FACScalibur (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA), sendo os dados analisados no software FCAP Array v3®, onde os valores foram expressos em pg/mL para cada citocina. Os valores representam a média \pm desvio padrão de 6 animais por grupo. * $p < 0.05$ em comparação ao grupo infectado por *S. mansoni* e não tratado na fase crônica (INF90) e # $p < 0.05$ quando comparado os grupos infectados por *S. mansoni* e não tratados (INF60 e INF90). Os valores de p foram obtidos pelo teste de *T* de Student.

4 DISCUSSÃO

O presente trabalho avaliou os efeitos do tratamento de PZQ na resposta imune de camundongos infectados por *S. mansoni* em diferentes fases da doença: aguda (60 dias) e crônica (90 dias), demonstrado pela redução na concentração de citocinas anti-inflamatórias e lesões teciduais.

O ensaio *in vitro* demonstrou que o PZQ foi eficaz contra os vermes adultos de *S. mansoni*. A maior concentração de PZQ utilizada neste estudo (10µg/mL) apresentou melhor resultado em menor período (6h), entretanto as concentrações menores também foram capazes de matar o parasito, porém em maior tempo, assim como em Pica-mattocia e Cioli (2004).

Em nossas análises parasitológicas observamos a redução na quantidade ovos tanto nas fezes quanto no fígado, em ambas as fases da infecção (aguda e crônica). Além disso, também observamos a diminuição no número de granulomas no fígado em ambas as fases. Os efeitos de PZQ sobre a oviposição implicam na eficácia do tratamento, na manutenção do ciclo (LAMBERTON et al., 2017) e na morbidade da doença (BOROS, 1989). A diminuição na quantidade de ovos pode ser relacionada a possível redução da patologia, assim como nos achados de Bakeri et al. (2022). Adicionalmente, também foi observada redução na inflamação e lesão tecidual dos animais infectados e tratados por PZQ na fase aguda (INF+PZQ60).

Em relação a análise leucométrica, observamos que após o tratamento, os animais da fase aguda (INF+PZQ60) reduziram o número de eosinófilos, possivelmente pela redução da carga parasitária e pela modulação da resposta imune. A eosinofilia é uma característica da infecção por *S. mansoni*, com aumentos exponenciais em número de eosinófilos no sangue periférico, que se correlacionam com a progressão da doença e desenvolvimento de granulomas (WYN et al., 2004; COAKLEY et al., 2019). Os eosinófilos são recrutados especificamente para os granulomas em resposta a estímulos Th2 e formam um componente significativo desta estrutura (SWARTZ et al., 2006).

De maneira geral, o perfil leucométrico dos camundongos infectados e tratados da fase crônica (INF+PZQ90) apresentou redução no número de leucócitos totais dos animais, onde pode-se notar que os valores obtidos das células, com exceção dos linfócitos, estão próximos aos do grupo dos animais sadios (CS90). Essa restauração do perfil leucométrico pode ser atribuída à

capacidade do PZQ de eliminar os parasitas e limitar as propriedades imunogênicas dos vermes e dos ovos intratissulares (FEMOE et al., 2022). Embora nossos dados tenham demonstrado uma redução de leucócitos e eosinófilos, observamos também um aumento de linfócitos, que pode estar sendo recrutado e controlando as lesões teciduais. Nos estudos de Femoe et al. (2022), com camundongos tratados na dose de 18 mg/kg por 28 dias consecutivos, na fase granulomatosa da doença, achados semelhantes também foram observados.

Embora tenhamos encontrado um aumento de linfócitos, não observamos um aumento de IgE que está associado aos linfócitos B, o que indica que os mecanismos de proteção de PZQ podem estar associado com outros perfis de linfócitos. Entretanto, são dados controversos pois pacientes infectados por *Schistosoma* de áreas endêmicas (DUNNE et al., 1992; FITZSIMMONS et al., 2004) e outros modelos experimentais com camundongos demonstraram que o tratamento com PZQ está relacionado à manutenção de uma resposta IgE elevada e potencialmente protetora (NONO et al., 2021).

Para compreender melhor uma possível ação de PZQ em células efetoras, avaliamos a composição celular do baço. Assim, não foram observados aumento ou redução nas populações de CD3+ nos animais infectados e sem tratamento das fases aguda e crônica (INF60 e INF90, respectivamente). Desta forma para avaliar se PZQ poderia estar atuando somente em populações específicas de linfócitos T, avaliamos os linfócitos auxiliares e citotóxicos, que também não apresentaram aumento ou redução após a quimioterapia.

Apesar de não termos encontrado diferenças na quantidade dos diferentes tipos de linfócitos, observamos que o tratamento com PZQ induziu uma mudança no perfil de citocinas avaliadas. Em nossa investigação, foi observado o aumento nas concentrações de IFN- γ (ativador de macrófagos) e TNF- α (pró-inflamatórios e pró-fibrogênicos) nos animais infectados e não tratados na fase crônica (INF90), que após submetidos ao tratamento com PZQ apresentaram diminuição nas concentrações destas citocinas, assim como em Femoe et al. (2022).

Ainda em relação a resposta Th1, também foi analisada a concentração de IL-6 após o tratamento com PZQ, na qual ambas as fases de infecção (aguda e crônica) apresentaram concentrações menores quando comparados aos seus respectivos grupos infectados sem tratamento. Essa citocina pode ser produzida por linfócitos B e T, fibroblastos macrófagos, e influência nas respostas imune antígeno específicas e reação inflamatórias (VARELLA; FORTE,

2001; DIEHL et al., 2022). Além de estimular a inflamação, a IL-6 tem ação importante na atração de eosinófilos para o local de inflamação (VARELLA; FORTE, 2001) e sua inibição por PZQ é apontada como um mecanismo anti-fibrótico (NIU et al., 2022). A diminuição nas concentrações destas citocinas impacta na patologia da esquistossomose, confirmado pelos dados histopatológicos.

Na fase aguda não foram detectadas concentrações de IL-4 nos grupos infectados com e sem tratamento (INF+PZQ60 e INF60). Camundongos sem produção de IL-4 desenvolvem uma forma grave da doença e morrem (BRUNET et al., 1997; NDLOVU; BROMBACHER, 2014). Logo, a IL-4 desempenha um papel protetor durante a infecção (LA FLAMME et al., 2001; HERBERT et al., 2008), que nos causou questionamentos, visto que foi observada a presença de granulomas no fígado desses camundongos, assim como sua sobrevivência por 60 dias, sendo. Desta forma, estudos adicionais que avaliem as citocinas devem ser realizados. Já para a fase crônica, observamos que a IL-4 reduziu sua concentração nos animais infectados e tratados por PZQ (INF+PZQ90) em relação ao seu grupo infectado e sem tratamento (INF90). Altas concentrações de IL-4, assim como de outras citocinas do perfil Th2 (IL-5 e IL-13) estão associadas ao agravamento da fibrose hepática em humanos infectados pelo *S. mansoni* (DE JESUS et al., 2002, KAVIRATNE et al., 2004).

Ao avaliarmos as concentrações de IL-10, notamos a diminuição em sua concentração após o tratamento com PZQ nos camundongos em fase crônica da infecção (INF+PZQ90), que pode/poderia estar interferindo na morbidade desses animais, observado pela não alteração nos parâmetros histopatológicos observados no fígado destes animais. Neste grupo de animais houve uma diminuição no número de granulomas, assim supomos que a ação de IL-10 não foi estimulada como deveria, mas não descartamos a ação da citocina localmente em outros órgãos afetados tais como fígado e intestino.

Em conclusão, nossos dados reforçam os principais efeitos esquistossomicida de PZQ *in vitro* e *in vivo* já descritos na literatura: redução da carga parasitária, neste caso em ambos os períodos de infecção analisados. O tratamento com PZQ demonstrou ação anti-inflamatória, observada pelas reduções das inflamações e lesões teciduais no fígado (fase aguda e crônica) e no intestino (fase crônica), juntamente com a redução na presença de granulomas, eosinófilos, TNF- α e IL-6 e aumento de linfócitos. Além disso, este trabalho demonstra que PZQ deve continuar a

ser investigado no que diz respeito ao seu papel na resposta imune para melhor compreensão dos seus efeitos ao longo e após o tratamento.

REFERENCIAS

- ANDREW P. Praziquantel: Mechanism of anti-*Schistosomal* activity. *Pharmacology*, 29 (1) 129–56; 1985.
- ARAÚJO MI, DE JESUS AR, BACELLAR O. Evidence of a T helper type 2 activation in human schistosomiasis. *European Journal of Immunology*, 26: 1399-1403; 1996.
- ARULEBA RT, ADEKIYA TA, OYINLOYE BE, MASAMBA P, MBATHA LS, PRETORIUS A, KAPPO AP. PZQ Therapy: How Close are we in the Development of Effective Alternative Anti-schistosomal Drugs? *Infectious Disorders - Drug Targets*, 19(4):337-349; 2019. doi: 10.2174/1871526519666181231153139. PMID: 30599112; PMCID: PMC7046992.
- BAKERY HH, ALLAM GA, ABUELSAAD ASA, ABDEL-LATIF M, ELKENAWY AE, KHALIL RG. Anti-inflammatory, antioxidant, anti-fibrotic and schistosomicidal properties of plumbagin in murine schistosomiasis. *Parasite Immunology*, 44:e12945; 2022. doi:10.1111/pim.12945
- BARTLEY PB, RAMM GA, JONES MK, RUDDLE RG, LI Y, MCMANUS DPA. Contributory role for activated hepatic stellate cells in the dynamics of *Schistosoma japonicum* egg-induced fibrosis. *International Journal for Parasitology*, 36 (9): 993-1001; 2006.
- BERGQUIST R, UTZINGER J, KEISER J. Controlling schistosomiasis with praziquantel: how much longer without a viable alternative? *Infectious Diseases of Poverty*, 28(6):74; 2017. DOI: 10.1186/s40249-017-0286-2
- BOROS DL. Imunopatologia da infecção por *Schistosoma mansoni*. *Clinical Microbiology Reviews*, 2 (3):250–269; 1989. doi: 10.1128/CMR.2.3.250.
- BRUNET LR, FINKELMAN FD, CHEEVER AW, KOPF MA. PEARCE EJ. A IL-4 protege contra a caquexia mediada pelo TNF-alfa e a morte durante a esquistossomose aguda. *The Journal of Immunology*, 159 :777–785; 1977.
- BURKE ML, JONES MK, GOBERT GN, LI YS, ELLIS MK, MCMANUS DP. Immunopathogenesis of human schistosomiasis. *Parasite Immunology*, 31 (4): 163-176; 2009.
- CHEEVER AW. Conditions affecting the accuracy of potassium hydroxide Digestion techniques for counting *Schistosoma mansoni* eggs in tissues. *Bulletin of the World Health Organization*, 39 (2): 328-31; 1968.
- CHEEVER AW, HOFFMANN KF, WYNN TA. Immunopathology of schistosomiasis mansoni in mice and men. *Immunology Today*, 21 (9): 465-466; 2000.

CIOLI D, PICA-MATTOCCIA L, BASSO A, GUIDI A. Schistosomiasis control: praziquantel forever? *Molecular and Biochemical Parasitology*, 195(1): 23-9; 2014. doi: 10.1016/j.molbiopara.2014.06.002.

COAKLEY G, WRIGHT MD, BORGER JG. *Schistosoma mansoni*-Derived Lipids in Extracellular Vesicles: Potential Agonists for Eosinophilic Tissue Repair. *Frontiers in Immunology*, 7;10:1010; 2019. doi: 10.3389/fimmu.2019.01010.

CRUZ GVB, PEREIRA PVS, PATRICIO FJ, COSTA GC, SOUSA SM, FRAZÃO JB, ARAGÃO-FILHO WC, MACIEL MCG, SILVA LA, AMARAL FMM, BARROQUEIRO ESB, GUERRA RNM, NASCIMENTO FRF. Increase of cellular recruitment, phagocytosis ability and nitric oxide production induced by hydroalcoholic extract from *Chenopodium ambrosioides* leaves. *Journal of Ethnopharmacology*, 111: 148–154; 2007. Doi: 10.1016/j.jep.2006.11.006

DE JESUS AR, SILVA A, SANTANA LB, MAGALHAES A, DE JESUS AA, DE ALMEIDA RP, REGO MA, BURATTINI MN, PEARCE EJ, CARVALHO EM. Clinical and immunologic evaluation of 31 patients with acute schistosomiasis mansoni. *The Journal of Infectious Diseases*. 185:98; 2002. DOI: 10.1086/324668

DIEHL S, RINCÓN M. The two faces of IL-6 on Th1/Th2 differentiation. *Molecular Immunology*, 39(9):531-6; 2002. doi: 10.1016/s0161-5890(02)00210-9. PMID: 12431386.

DOENHOFF MJ, CIOLI D, UTZINGER J. Praziquantel: mechanisms of action, resistance and new derivatives for schistosomiasis. *Current Opinion in Infectious Diseases*, 21(6): 659-667; 2008.

DUNNE DW, BUTTERWORTH AE, FULFORD AJC, KARIUKI HC, LANGLEY JG, OUMA JH, CAPRON A, PIERCE RJ, STURROCK RF. 1992. Immunity after treatment of human schistosomiasis: association between IgE antibodies to adult worm antigens and resistance to reinfection. *European Journal of Immunology*, 22:1483-1494; 1992. DOI: 10.1002/eji.1830220622

FEMOE UM, JATSA HB, VG, BRUNET J, CANNET C, KENFACK MC, GIPWE FEUSSOM N, KADJI FASSI JB, TIENGA NKONDO E, ABOU-BACAR A, PFAFF AW, DIMO T, KAMTCHOUING P, TCHUEM TCHUENTÉ LA. Pathological and immunological evaluation of different regimens of praziquantel treatment in a mouse model of *Schistosoma mansoni* infection. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 21;16(4):e0010382; 2022. doi: 10.1371/journal.pntd.0010382.

FITZSIMMONS CM, JOSEPH S, JONES FM, REIMERT CM, HOFFMANN KF, KAZIBWE F, KIMANI G, MWATHA JK, OUMA JH, TUKAHEBWA EM, KARIUKI HC, VENNERVALD BJ, KABATEREINE NB, DUNNE DW. Chemotherapy for schistosomiasis in Ugandan fishermen: treatment can cause a rapid increase in interleukin-5 levels in plasma but decreased levels of eosinophilia and worm-specific immunoglobulin. *Infection and Immunity*, 72(7):4023-30; 2004. doi: 10.1128/IAI.72.7.4023-4030.2004.

GRZYCH JM, PEARCE E, CHEEVER A, CAULADA ZA, CASPAR P, HEINY S, LEWIS F, SHER A. Egg deposition is the major stimulus for the production of Th2 cytokines in murine schistosomiasis mansoni. *The Journal of Immunology*, 146 (4): 1322-1327; 1991.

HERBERT DR, OREKOV T, PERKINS C, ROTHENBERG ME, FINKELMAN FD. IL-4R alpha expression by bone marrow-derived cells is necessary and sufficient for host protection against acute schistosomiasis. *Journal of Immunology*, 1;180(7):4948-55; 2008. doi: 10.4049/jimmunol.180.7.4948. PMID: 18354220; PMCID: PMC2921971.

HORIUCHI A, SATOU T, AKAO N, KOIKE K, FUJITA K, NIKAIDO T. The effect of free and polyethylene glycol liposome-entrapped albendazole on larval mobility and number in *Toxocara canis* infected mice. *Veterinary Parasitology*, 129: 83–87; 2005 DOI: 10.1016/j.vetpar.2004.12.017

KAVIRATNE M, HESSE M, LEUSINK M, CHEEVER AW, DAVIES SJ, MCKERROW JH, WAKEFIELD LM, LETTERIO JJ, WYNN TA. IL-13 activates a mechanism of tissue fibrosis that is completely TGF-beta independent. *Journal of Immunology*, 15;173(6):4020-9; 2004. doi: 10.4049/jimmunol.173.6.4020.

KONG D, ZHOU C, GUO H, WANG W, QIU J, LIU X, LIU J, WANG L, WANG Y. 2017. Praziquantel Targets M1 Macrophages and Ameliorates Splenomegaly in Chronic Schistosomiasis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 21;62(1):e00005-17; 2017. doi: 10.1128/AAC.00005-17. PMID: 29061758; PMCID: PMC5740360.

LA FLAMME AC, PATTON EA, BAUMAN B, PEARCE EJ. IL-4 plays a crucial role in regulating oxidative damage in the liver during schistosomiasis. *The Journal of Immunology*, 1;166(3):1903-11; 2001. doi: 10.4049/jimmunol.166.3.1903. PMID: 11160238.

LABUDA LA, ADEGNIKA AA, ROSA BA, MARTIN J, ATEBA-NGOA U, AMOAH AS, LIMA HW, MEURS L, MBOW M, MANURUNG MD, ZINSOU, JF SMITS HH, KREMSNER PG, MITREVA M, YAZDANBAKSH MA Praziquantel Treatment Study of Immune and Transcriptome Profiles in *Schistosoma haematobium*-Infected Gabonese Schoolchildren, *The Journal of Infectious Diseases*, 222: (12, 15): 2103–2113; 2020. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiz641>

LAMBERTON PHL, FAUST CL, WEBSTER JP. Praziquantel decreases fecundity in *Schistosoma mansoni* adult worms that survive treatment: evidence from a laboratory life-history trade-offs selection study. *Infectious Diseases of Poverty*, 16;6(1):110; 2017. doi: 10.1186/s40249-017-0324-0.

LIBERIO SA, PEREIRA AL, DUTRA RP, REIS AS, ARAÚJO MJ, MATTAR NS, SILVA LA, RIBEIRO MN, NASCIMENTO FR, GUERRA RN, MONTEIRO-NETO V. Antimicrobial activity against oral pathogens and immunomodulatory effects and toxicity of geopropolis produced by the stingless bee *Melipona fasciculata* Smith. *BMC Complementary Medicine and Therapies*, 11 (1), 108; 2011. <https://doi.org/10.1186/1472-6882-11-108>.

LO NC, BEZERRA FSM, COLLEY DG, FLEMING FM, HOMEIDA M, KABATEREINE N, KABOLE FM, KING CH, MAFE MA, MIDZI N, MUTAPI F, MWANGA JR, RAMZY RMR, SATRIJA F, STOTHARD JR, TRAORÉ MS, WEBSTER JP, UTZINGER J, ZHOU XN, DANSO-APPIAH A, EUSEBI P, LOKER ES, OBONYO CO, QUANSAH R, LIANG S, VAILLANT M, MURAD MH, HAGAN P, GARBA A. Review of 2022 WHO guidelines on the control and elimination of schistosomiasis. *The Lancet Infectious Diseases*, 11:e327-e335; 2022. doi: 10.1016/S1473-3099(22)00221-3.

LUNA LG. Manual of the histologic staining methods of the armed forces institute of pathology. 3. ed. New York: McGraw Hill, 1968. 258p.

MACIEL MCG, FIALHO EMS, GUERRA, RNM, BORGES VM, KWASNIEWSKI FH, NASCIMENTO FRF. *Tityus serrulatus* scorpion venom improves survival and lung inflammation in lethal sepsis induced by CLP in mice. *Toxicon* 89, 1–8; 2014. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2014.06.018>.

MALEK EA. Snail Hosts of Schistosomiasis and other Snail Transmitted Diseases in Tropical América. In: BARBOSA, F. S. Tópicos de Malacologia Médica – Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 300-310; 1985.

MELKUS MW, LE L, SIDDIQUI AJ, MOLEHIN AJ, ZHANG W, LAZARUS S, SIDDIQUI AA. 2020. Elucidation of Cellular Responses in Non-human Primates With Chronic Schistosomiasis Followed by Praziquantel Treatment. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 24;10:57; 2020. doi: 10.3389/fcimb.2020.00057..

MIRANDA GS, RODRIGUES JGM, SILVA JKAO, CAMELO GMA, SILVA-SOUZA N, NEVES RH, MACHADO-SILVA JR, NEGRÃO-CORRÊA DA. New challenges for the control of human schistosomiasis: The possible impact of wild rodents in *Schistosoma mansoni* transmission. *Acta Tropica*, 236:106677; 2022. doi: 10.1016/j.actatropica.2022.106677.

NEGRÃO-CORRÊA D, SOUZA DG, PINHO V, BARSANTE MM, SOUZA AL, TEIXEIRA MM. Platelet-activating factor receptor deficiency delays elimination of adult worms but reduces fecundity in *Strongyloides venezuelensis*-infected mice. *Infection and Immunity*, 72(2):1135-42; 2004. doi: 10.1128/IAI.72.2.1135-1142.2004.

NDLOVU H, BROMBACHER F. Role of IL-4R α during acute schistosomiasis in mice. *Parasite Immunology*. 2014 Sep;36(9):421-7. doi: 10.1111/pim.12080. PMID: 24127774; PMCID: PMC4286023.

NIU X, HU T, HONG Y, LI X, SHEN Y. The Role of Praziquantel in the Prevention and Treatment of Fibrosis Associated with Schistosomiasis: A Review. *Journal of Tropical Medicine*, 2022:1413711; 2022. doi:10.1155/2022/1413711

NONO JK, MPOTJE T, MOSALA P, AZIZ NA, MUSAIGWA F, HLAKA L, SPANGENBERG T, BROMBACHER F. Praziquantel Treatment of *Schistosoma mansoni* Infected Mice Renders

Them Less Susceptible to Reinfection. *Frontiers in Immunology*, 12:748387; 2021. doi:10.3389/fimmu.2021.748387

PEARCE EJ, CASPAR P, GRZYCH JM, LEWIS FA, SHER A. Downregulation of Th1 Cytokine production accompanies induction of Th2 responses by a parasitic helminth, *Schistosoma mansoni*. *The Journal of Experimental Medicine*, 173: 159-166; 1991.

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

RODRIGUES JGM, ALBUQUERQUE PSV, NASCIMENTO JR, CAMPOS JAV, GODINHO ASS, ARAÚJO SJ, BRITO JM, JESUS CM, MIRANDA GS, REZENDE MC, NEGRÃO-CORRÊA DA, ROCHA CQ, SILVA LA, GUERRA RNM, NASCIMENTO FRF. The immunomodulatory activity of *Chenopodium ambrosioides* reduces the parasite burden and hepatic granulomatous inflammation in *Schistosoma mansoni*-infection. *Journal of Ethnopharmacology*, 10;264:113287; 2021. doi: 10.1016/j.jep.2020.113287.

ROSS AG, BARTLEY PB, SLEIGH AC, OLDS GR, LI Y, WILLIAMS GM, MCMANUS DP. Schistosomiasis. *The New England Journal of Medicine*, 18;346(16):1212-20; 2002. doi: 10.1056/NEJMra012396.

SCHMIEDEL Y, MOMBO-NGOMA G, LABUDA LA, JANSE JJ, DE GIER B, ADEGNIKA AA, ISSIFOU S, KREMSNER PG, SMITS HH, YAZDANBAKHS M. CD4+ CD25hi FOXP3+ Regulatory T Cells and Cytokine Responses in Human Schistosomiasis before and after Treatment with Praziquantel. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 20;9(8):e0003995; 2015. doi: 10.1371/journal.pntd.0003995.

SCHOENBORN JR, WILSON CB. Regulation of interferon-gamma during innate and adaptive immune responses. *Advances in Immunology*, 96:41–101; 2007. doi: 10.1016/S0065-2776(07)96002-2.

SILVA VBR, CAMPOS BRKL, DE OLIVEIRA JF, DECOU JL, DO CARMO ALVES DE LIMA M. Medicinal chemistry of antischistosomal drugs: Praziquantel and oxamniquine. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 25: 3259–327; 2017.

SMITHERS SR, TERRY RJ. The infection of laboratory hosts with cercariae of *Schistosoma mansoni* and the recovery of adult worm. *Parasitology* 55: 695-700; 1965.

SOARES MH, DIAS HJ, VIEIRA TM, SOUZA MGM, CRUZ AFF, BADO CO FR, NICOLELLA HD, CUNHA WR, GROppo M, MARTINS CHG, TAVARES DC, MAGALHÃES LG, CROTTI AEM. Chemical Composition, Antibacterial, Schistosomicidal, and Cytotoxic Activities of the Essential Oil of *Dysphania ambrosioides* (L.) MOSYAKIN & CLEMANTS (Chenopodiaceae). *Chemistry & Biodiversity*, 14: 8; 2017 DOI: 10.1002/cbdv.201700149

SOUZA FPC, VITORINO RR, COSTA AP, FARIA JUNIR FC, SANTANA LA, GOMES AP. Esquistossomose mansônica: aspectos gerais, imunologia, patogênese e história natural. *Revista da Sociedade Brasileira de Clínica Médica*, 9(4): 300-307; 2011.

SWARTZ JM, DYER KD, CHEEVER AW, RAMALINGAM T, PESNICAK L, DOMACHOWSKIE JB, LEE JJ, LEE NA, FOSTER PS, WYNN TA, ROSENBERG HF. *Schistosoma mansoni* infection in eosinophil lineage-ablated mice. *Blood*, 1, 108(7):2420-7; 2006. doi: 10.1182/blood-2006-04-015933.

UTZINGER J, KEISER J, SHUHUA X, TANNER M, SINGER BH. Combination chemotherapy of schistosomiasis in laboratory studies and clinical trials. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47: 1487-1495; 2003.

VARELLA PPV, NEVES FORTE VC. Citokines: a review. *Revista brasileira de alergia e imunopatologia* 24(4):146-154; 2001.

VIMIEIRO ACS. Ação de esquistossomicidas na fase inicial da esquistossomose experimental. 2009. 106f. Dissertação (Mestrado em Ciências pelo Programa de Pós-Graduação do em Ciências da Saúde). Fundação Oswaldo Cruz. Centro de Pesquisas René Rachou. Belo Horizonte, MG, Brasil.

WYNN TA, THOMPSON RW, CHEEVER AW, MENTINK-KANE MM. Immunopathogenesis of schistosomiasis. *Immunological Reviews*, 201:156-67; 2004. doi: 10.1111/j.0105-2896.2004.00176.x.

XIAO SH, CATTO BA, WEBSTER LT JR. Effects of praziquantel on different developmental stages of *Schistosoma mansoni* *in vitro* and *in vivo*. *The Journal of Infectious Diseases*, 151(6):1130-7, 1985. doi: 10.1093/infdis/151.6.1130.

XIAO SH, SUN J, CHEN MG. Pharmacological and immunological effects of praziquantel against *Schistosoma japonicum*: a scoping review of experimental studies. *Infectious Disease Poverty*, 7;7(1):9; 2018. doi: 10.1186/s40249-018-0391-x.

5 CONCLUSÕES

Diante dos resultados obtidos e apresentados, podemos concluir que:

- Capítulo I:
 - Após 50 anos de uso, o PZQ ainda possui lacunas em seus mecanismos de ação e continua sendo objeto de investigação;
 - Novos alvos moleculares foram descobertos, além dos canais de cálcio;
 - O PZQ pode ser utilizado em vacinas e potencializar a resposta imunológica.

- Capítulo II:
 - O tratamento com PZQ não interferiu na IgE e na celularidade do baço para ambos os períodos analisados.
 - O tratamento com PZQ reduziu a quantidade de ovos de *S. mansoni* nos tecidos hepáticos e nas fezes nas fases aguda e crônica.
 - O PZQ reduziu o número de granulomas no fígado e a inflamação no tecido em ambos os períodos analisados.
 - O tratamento com PZQ nos camundongos de fase crônica apresentou redução no número de granulomas e inflamação no intestino.
 - Os animais tratados da fase crônica apresentaram redução no número de leucócitos totais e aumento de linfócitos, enquanto para a fase aguda, PZQ reduziu o número de eosinófilos.
 - O PZQ diminuiu a produção de citocinas, principalmente das pró-inflamatórias TNF- α e IL-6 para ambos os períodos estudados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABOU-EL-NAGA IF, AMER EI, BOULOS LM, EL-FAHAM MH, ABOU SEADA NM, YOUNIS SS. Biological and proteomic studies of *Schistosoma mansoni* with decreased sensitivity to praziquantel. *Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases*, 66:101341; 2019. doi: 10.1016/j.cimid.2019.101341.
- ALMADI MA, ALJEBREEN AM, SANAI FM, MARCUS V, ALMEGHAISEEB ES, GHOSH S. New insights into gastrointestinal and hepatic granulomatous disorders. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 8: 455-466; 2011. DOI: 10.1038/nrgastro.2011.115
- ALVES RRS, RODRIGUES JGM, TELES-REIS A, NOGUEIRA RA, LICÁ ICLL, LIRA M GS, ALVES RS, SILVA-SOUZA N, ANDRADE TJAS, MIRANDA GS. Antiparasitic effects of ethanolic extracts of *Piper arboreum* and *Jatropha gossypifolia* leaves on cercariae and adult worms of *Schistosoma mansoni*. *Parasitology*, 1–41; 2020. doi:10.1017/S003118202000181X
- ANDERSON TJC, ENABULELE EE. *Schistosoma mansoni*. *Trends in Parasitology*, 37(2):176-177; 2021. doi:10.1016/j.pt.2020.06.003
- ANDRADE ZA. A patologia da Esquistossomose humana. In: CARVALHO OS, COELHO PMZ, LENZI HL. orgs. *Schistosoma mansoni* e esquistossomose: uma visão multidisciplinar [online]. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2008, pp. 546-568. ISBN 978-85-7541-370-8.
- ANDREWS P, THOMAS H, POHLKE R, SEUBERT J. Praziquantel. *Medicinal Research Reviews*, 3(2): 147-200; 1983.
- ANGELUCCI F, BASSO A, BELLELLI A, BRUNORI M, PICA MATTOCCIA L, VALLE C. The anti-schistosomal drug praziquantel is an adenosine antagonist. *Parasitology*, 134:1215-21; 2007. doi: 10.1017/S0031182007002600.
- BARRON L, WYNN TA. Macrophage activation governs schistosomiasis-induced inflammation and fibrosis. *European Journal of Immunology* 41:2509–14; 2011. 10.1002/eji.201141869
- BARTEL DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell Press*, 136:215–33; 2009. 10.1016/j.cell.2009.01.002
- BAUMGART M, TOMPKINS F, LENG J, HESSE M. Naturally occurring CD4⁺Foxp3⁺ regulatory T cells are an essential, IL-10-independent part of the immunoregulatory network in *Schistosoma mansoni* egg-induced inflammation. *Journal of Immunology*, 176:5374–5387; 2006.
- BECKER B, MEHLHORN H, ANDREWS P, THOMAS H, ECKERT J. Light and electron microscopic studies on the effect of praziquantel on *Schistosoma mansoni*, *Dicrocoelium dendriticum*, and *Fasciola hepatica* (Trematoda) *in vitro*. *Zeitschrift für Parasitenkunde* 63:113–128; 1980.

BENOIT M, DESNUES B, MEGE JL. Macrophage polarization in bacterial infections. *Journal of Immunology*, 181:3733–3739; 2008. doi: 10.4049/jimmunol.181.6.3733.

BERGQUIST R, UTZINGER J, KEISER J. Controlling schistosomiasis with praziquantel: how much longer without a viable alternative? *Infectious Diseases of Poverty*, 28(6):74; 2017. DOI: 10.1186/s40249-017-0286-2

BOISSIER J, GRECH-ANGELINI S, WEBSTER BL, ALLIENNE JF, HUYSE T, MAS-COMA S, TOULZA E, BARRÉ-CARDI H, ROLLINSON D, KINCAID-SMITH J, OLEAGA A, GALINIER R, FOATA J, ROGNON A, BERRY A, MOUAHID G, HENNERON R, MONÉ H, NOEL H, MITTA G. Outbreak of urogenital schistosomiasis in Corsica (France): an epidemiological case study. *The Lancet Infectious Diseases*, 16(8):971-9; 2016. doi: 10.1016/S1473-3099(16)00175-4.

BOGÉA T, FAVRE TC, ROTENBERG L, SILVA HS, PIERI OS. Circadian pattern of cercarial emergence in *Schistosoma mansoni* (Platyhelminthes: Digenea) from isolated *Biomphalaria glabrata*. *Chronobiology International*, 13: 93-101, 1996.

BONESSO-SABADINI PIP, DIAS LCS. Altered Response of Strain of *Schistosoma mansoni* to Oxamniquine and Praziquantel. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 97(3): 381-385; 2002. DOI: 10.1590/S0074-02762002000300019

BOROS DL. Imunopatologia da infecção por *Schistosoma mansoni*. *Clinical Microbiology Reviews* 2 (3):250–269; 1989. doi: 10.1128/CMR.2.3.250.

BOTROS SS, METWALLY AA, KHAYYAL MT. The immunological aspects of praziquantel in unsensitized mice with experimentally induced schistosome pulmonary granuloma. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 78:569–572; 1984.

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 de Vigilância das Doenças Transmissíveis. – 4. ed. – Brasília: Ministério da Saúde, 2014. 144 p.

BRENDOLAN A, ROSADO MM, CARSETTI R, SELLERI L, DEAR TN. Development and function of the mammalian spleen. *Bioessays*, 29:166–177; 2007. doi: 10.1002/bies.20528.

BRINDLEY PJ, SHER A. The chemotherapeutic effect of praziquantel against *Schistosoma mansoni* is dependent on host antibody response. *Journal of Immunology*, 139: 215-220, 1987.

BURKE ML, JONES MK, GOBERT GN, LI YS, ELLIS MK, MCMANUS DP. Immunopathogenesis of human schistosomiasis. *Parasite Immunology*, 31(4):163-76; 2009. doi: 10.1111/j.1365-3024.2009.01098.x.

BUTTERWORTH AE, STURROCK RF, HOUBA V, REES PH. Antibody dependent cellmediated damage to schistosomula *in vitro*. *Nature* 1974;252:503-5.

CHEN MG. *Schistosoma japonicum* and *S. japonicum*-like infections: epidemiology, clinical and pathological aspects. in: Jordan P. Human Schistosomiasis. CAB International, 237-270; 1993.

CHEN D, LUO X, XIE H, GAO Z, FANG H, HUANG J. Characteristics of IL-17 induction by *Schistosoma japonicum* infection in C57BL/6 mouse liver. *Immunology*, 139: 523-532; 2013. DOI: 10.1111/imm.12105

CHEVALIER FD, LE CLECH W, MCDEW-WHITE M, MENON V, GUZMAN MA, HOLLOWAY SP, CAO X, TAYLOR AB, KINUNG'HI S, GOUVRAS AN, WEBSTER BL, WEBSTER JP, EMERY AM, ROLLINSON D, GARBA DJIRMAY A, AL MASHIKHI KM, AL YAFAE S, IDRIS MA, MONÉ H, MOUAHID G, HART PJ, LOVERDE PT, ANDERSON TJC. Oxamniquine resistance alleles are widespread in Old World *Schistosoma mansoni* and predate drug deployment. *PLoS Pathogens*, 25;15(10):e1007881; 2019. doi: 10.1371/journal.ppat.1007881.

CHEVALIER FD, CLECH WL, BERRIMAN M, ANDERSON TJC. A single locus determines praziquantel response in *Schistosoma mansoni*. *bioRxiv* [Preprint]. 2023 Nov 4:2023.11.01.565202. doi: 10.1101/2023.11.01.565202. Update in: *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2024 Jan 30;:e0143223.

CHIARAMONTE MG, CHEEVER AW, MALLEY JD, DONALDSON DD, WYNN TA. Studies of murine schistosomiasis reveal interleukin-13 blockade as a treatment for established and progressive liver fibrosis. *Hepatology*, 34:273–282; 2001. DOI: 10.1053/jhep.2001.26376

CHITSULO L, ENGELS D, MONTRESOR A, SAVIOLI L. The global status of schistosomiasis and its control. *Acta Tropica*, 77 (1):41–51; 2000. DOI: 10.1016/s0001-706x(00)00122-4

CHUAH C, JONES MK, BURKE ML, MCMANUS DP, GOBERT GN. Cellular and chemokine-mediated regulation in schistosome-induced hepatic pathology. *Trends Parasitology*, 30(3):141-50; 2014. doi: 10.1016/j.pt.2013.12.009.

CHUAH C, JONES MK, MCMANUS DP, NAWARATNA SK, BURKE ML, OWEN HC, RAMM GA, GOBERT GN (2016). Characterising granuloma regression and liver recovery in a murine model of schistosomiasis japonica. *International Journal for Parasitology*, 46(4):239-52, 2016. doi:10.1016/j.ijpara.2015.12.004

CHUAH C, GOBERT GN, LATIF B, HEO CC, LEOW CY. Schistosomiasis in Malaysia: A review. *Acta Tropica*. 190:137-143; 2019. doi: 10.1016/j.actatropica.2018.11.012.

CIOLI D. Chemotherapy of Schistosomiasis: An Update. *Parasitology Today*, 14(10): 418-22; 1998. DOI: 10.1016/s0169-4758(98)01323-4

- CIOLI D. Praziquantel: is there real resistance and are there alternatives? *Current Opinion in Infectious Diseases* 13: 659–663; 2000.
- CIOLI D, PICA-MATTOCCIA L. Praziquantel. *Parasitology Research*, 90: 3-9; 2003. DOI: 10.1007/s00436-002-0751-z
- CIOLI D, PICA-MATTOCCIA L, BASSO A, GUIDI A. Schistosomiasis control: praziquantel forever? *Molecular and Biochemical Parasitology*, 195(1): 23-9; 2014. doi: 10.1016/j.molbiopara.2014.06.002.
- COELI R, BABA EH, ARAUJO N, COELHO PM, OLIVEIRA G. Praziquantel treatment decreases *Schistosoma mansoni* genetic diversity in experimental infections. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 19;7(12): e2596; 2013. doi: 10.1371/journal.pntd.0002596.
- COELHO MV. O parasito *Schistosoma mansoni*. In: CUNHA, AS. *Esquistossomose mansoni*. São Paulo: Sarvier, 1:1-12; 1970.
- COLLEY DG, BUSTINDUY AL, SECOR WE, KING CH. Human schistosomiasis. *Lancet*, 28;383(9936):2253-64; 2014. doi: 10.1016/S0140-6736(13)61949-2.
- COLLEY DG, SECOR WE. Immunology of human schistosomiasis. *Parasite Immunology*, 36(8):347-57; 2014. doi: 10.1111/pim.12087.
- COSTAIN AH, MACDONALD AS, SMITS HH. Schistosome Egg Migration: Mechanisms, Pathogenesis and Host Immune Responses. *Frontiers in Immunology*, 20;9:3042; 2018. doi: 10.3389/fimmu.2018.03042.
- CUPIT PM, CUNNINGHAM C. What is the mechanism of action of praziquantel and how might resistance strike? *Future Science Chemistry*, 7(6); 2015. DOI: 10.4155/fmc.15.11
- CURWEN RS, WILSON RA. Invasion of skin by schistosome cercariae: some neglected facts. *Trends Parasitology*, 19(2):63-66; 2003. DOI: 10.1016/s1471-4922(02)00019-3
- DA SILVA VBR, CAMPOS BRKL, DE OLIVEIRA JF, DECOUT JL, DO CARMO ALVES DE LIMA M. Medicinal chemistry of antischistosomal drugs: Praziquantel and oxamniquine. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 1;25(13):3259-3277; 2017. doi: 10.1016/j.bmc.2017.04.031.
- DE JESUS AR, SILVA A, SANTANA LB, MAGALHÃES A, DE JESUS AA, DE ALMEIDA RP, RÊGO MA, BURATTINI MN, PEARCE EJ, CARVALHO EM. Clinical and immunologic evaluation of 31 patients with acute schistosomiasis mansoni. *The Journal of Infectious Disease*, 185: 98–105; 2002. doi: 10.1086/324668
- DE JESUS AR, MAGALHÃES A, MIRANDA DG, MIRANDA RG, ARAÚJO MI, DE JESUS AA, SILVA A, SANTANA LB, PEARCE E, CARVALHO EM. Association of type 2 cytokines

with hepatic fibrosis in human *Schistosoma mansoni* infection. *Infection and Immunity* 72:3391–3397; 2004. doi: 10.1128/IAI.72.6.3391-3397.2004.

DEOL AK, FLEMING FM, CALVO-URBANO B, WALKER M, BUCUMI V, GNANDOU I, TUKAHEBWA EM, JEMU S, MWINGIRA UJ, ALKOHLANI A, TRAORÉ M, RUBERANZIZA E, TOURÉ S, BASÁÑEZ MG, FRENCH MD, WEBSTER JP. Schistosomiasis - Assessing Progress toward the 2020 and 2025 Global Goals. *The New England Journal of Medicine*, 26;381(26):2519-2528; 2019. doi: 10.1056/NEJMoa1812165.

DOENHOFF MJ, KUSEL JR, COLES GC, CIOLI D. Resistance of *Schistosoma mansoni* to praziquantel: is there a problem? *Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 96(5):465-9; 2002. doi: 10.1016/s0035-9203(02)90405-0.

DOENHOFF MJ, CIOLI D, UTZINGER J. Praziquantel: mechanisms of action, resistance and new derivatives for schistosomiasis. *Current Opinion in Infectious Diseases*, 21 (6) 659–67; 2008. doi: 10.1097/QCO.0b013e328318978f.

DOOLEY S, HAMZAVI J, BREITKOPF K, WIERCINSKA E, SAID HM, LORENZEN J, GRESSNER AM. Smad7 prevents activation of hepatic stellate cells and liver fibrosis in rats. *Gastroenterology*, 125(1), 178–191; 2003. DOI: 10.1016/S0016-5085(03)00666-8

DOOLEY S, HAMZAVI J, CIUCLAN L, GODOY P, ILKAVETS I, EHNERT S, UEBERHAM E, GEBHARDT R, KANZLER S, GEIER A, BREITKOPF K, WENG H, MERTENS PR. Hepatocyte-specific Smad7 expression attenuates TGF- β -mediated fibrogenesis and protects against liver damage. *Gastroenterology*, 135(2), 642–659; 2008. DOI: 10.1053/j.gastro.2008.04.038

EL-LAKKANY NM, HAMMAM OA, EL-MAADAWY WH, BADAWY AA, AIN-SHOKA AA, EBEID FA. Anti-inflammatory/anti-fibrotic effects of the hepatoprotective silymarin and the schistosomicide praziquantel against *Schistosoma mansoni*-induced liver fibrosis *Parasites & Vectors*, 11;5:9; 2012. doi: 10.1186/1756-3305-5-9.

FAIRFAX K, NASCIMENTO M, HUANG SC, EVERTS B, PEARCE EJ. Th2 responses in schistosomiasis. *Seminars in Immunopathology*, 34(6):863-71; 2012. doi: 10.1007/s00281-012-0354-4.

FALLON PG, RICHARDSON EJ, MCKENZIE GJ & MCKENZIE AN. Schistosome infection of transgenic mice defines distinct and contrasting pathogenic roles for IL-4 and IL-13: IL-13 is a profibrotic agent. *Journal of Immunology*, 164: 2585–2591; 2000. DOI: 10.4049/jimmunol.164.5.2585

FAUST CL, OSAKUNOR DNM, DOWNS JA, KAYUNI S, STOTHARD JR, LAMBERTON PHL, REINHARD-RUPP J, ROLLINSON D. Schistosomiasis Control: Leave No Age Group Behind. *Trends Parasitology*, 36(7):582-591; 2020. doi: 10.1016/j.pt.2020.04.012

FENG T, DZIERAN J, GU X, MARHENKE S, VOGEL A, MACHIDA K, WEISS TS, RUEMMELE P, KOLLMAR O, HOFFMANN P, GRÄSSER F, ALLGAYER H, FABIAN J, WENG HL, TEUFEL A, MAASS T, MEYER C, LEHMANN U, ZHU C, MERTENS PR, GAO CF, DOOLEY S, MEINDL-BEINKER NM. Smad7 regulates compensatory hepatocyte proliferation in damaged mouse liver and positively relates to better clinical outcome in human hepatocellular carcinoma *Clinical Science*, 128(11), 761–774; 2015. DOI: 10.1042/CS20140606

FITZSIMMONS CM, JONES FM, PINOT DE MOIRA A, PROTASIO AV, KHALIFE J, DICKINSON HA, TUKAHEBWA EM, DUNNE DW. Progressive cross-reactivity in IgE responses: an explanation for the slow development of human immunity to schistosomiasis? *Infection and Immunity*, 80:4264–4270; 2012. DOI: 10.1128/IAI.00641-12

FRANCHI L, MUNOZ-PLANILLO R, REIMER T, EIGENBROD T, NUNEZ G. Inflammasomes as microbial sensors. *European Journal of Immunology*, 40:611–5; 2010. Doi: 10.1002/eji.200940180

FRIEDMAN SL. Hepatic stellate cells: protean, multifunctional, and enigmatic cells of the liver. *Physiological Reviews*, 88:125–172; 2008. DOI: 10.1152/physrev.00013.2007

GREENBERG RM. Are Ca²⁺ channels targets of praziquantel action? *International Journal for Parasitology*, 35(1):1-9; 2005. doi: 10.1016/j.ijpara.2004.09.004.

GRIMES JE, CROLL D, HARRISON WE, UTZINGER J, FREEMAN MC, TEMPLETON MR. The relationship between water, sanitation and schistosomiasis: a systematic review and meta-analysis. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 8(12): e3296; 2014. doi:10.1371/journal.pntd.0003296

GRYSEELS B, POLMAN K, CLERINX J, KESTENS L. Human schistosomiasis. *Lancet*, 368 (9541):1106–1118; 2006. Doi:10.1016/S0140-6736(06)69440-3

HAAS W, HABERL B, KALBE M, KÖMER M. Snail-host-finding by miracidia and cercariae: chemical hst cues. *Parasitology Today*, 11(12):468–72; 1995. doi: 10.1016/0169-4758(95)80066-2

HAMS E, AVIELLO G, FALLON PG. The schistosoma granuloma: friend or foe? *Frontiers in Immunology*, 15:4:89; 2013. doi: 10.3389/fimmu.2013.00089.

HARNETT W, KUSEL JR. Increased exposure of parasite antigens at the surface of adult male *Schistosoma mansoni* exposed to praziquantel in vitro. *Parasitology*, 93 (Pt 2):401-5; 1986. doi: 10.1017/s0031182000051568.

HE LC, HU GC, SU W, WU GX. Clinical observation on treatment of brain schistosomiasis with praziquantel: a report of 21 cases. *Chinese Journal of Schistosomiasis Control*, 17:160; 2005.

HE X, XIE J, ZHANG D, SU Q, SAI X, BAI R, CHEN C, LUO X, GAO G, PAN W. Recombinant adeno-associated virus-mediated inhibition of microRNA-21 protects mice against the lethal schistosome infection by repressing both IL-13 and transforming growth factor beta 1 pathways. *Hepatology*, 61(6):2008-2017; 2015. doi: 10.1002/hep.27671.

HIATT RA, SOTOMAYOR ZR, SANCHEZ G, ZAMBRANA M, KNIGHT WB. Factors in the pathogenesis of acute schistosomiasis mansoni. *The Journal of Infectious Diseases* 139:659–66; 1979.

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

HUANG YX, XU YL, YU CX, LI HJ, YIN XR, WANG TS, WANG W, LIANG YS. Effect of praziquantel prolonged administration on granuloma formation around *Schistosoma japonicum* eggs in lung of sensitized mice. *Parasitology Research*, 109(5):1453-9; 2011. doi: 10.1007/s00436-011-2485-2.

JENKINS-HOLICK DS, KAUL TL. Schistosomiasis. *Urologic Nursing Journal*, 33(4):163–170; 2013.

JAMES SL, COLLEY DG. Eosinophil-mediated destruction of *Schistosoma mansoni* eggs. *Journal of the Reticuloendothelial Society*, 20:359-74; 1976.

JIRAUNGKOORSKUL W, SAHAPHONG S, SOBHON P, RIENGROJPITAK S, KANGWANRANGSAN N. Effects of praziquantel and artesunate on the tegument of adult *Schistosoma mekongi* harboured in mice. *Parasitology International*, 54(3): 177-83; 2005. DOI: 10.1016/j.parint.2005.04.001

JOURDANE J, SOUTHGATE VR, PAGÈS JR, DURAND P, TCHUEM TCHUENTÉ LA. Recent studies on *Schistosoma intercalatum*: taxonomic status, puzzling distribution and transmission foci revisited. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 96:45-8; 2001. doi: 10.1590/s0074-02762001000900006. PMID: 11586425.

KASINATHAN RS, MORGAN WM, GREENBERG RM. Genetic Knockdown and Pharmacological Inhibition of Parasite Multidrug Resistance Transporters Disrupts Egg Production in *Schistosoma mansoni*. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 5(12): e1425; 2011. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001425>

KATZ N. Experiência com quimioterapia em grande escala no controle da esquistossomose no Brasil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 22: 40-51; 1980.

KATZ N, ALMEIDA K. Esquistossomose, xistosa, barriga d'água. *Ciência e Cultura*, 55(1):38-43; 2003.

KOHN AB, ANDERSON PA, ROBERTS-MISTERLY JM, GREENBERG RM. Schistosome calcium channel beta subunits. Unusual modulatory effects and potential role in the action of the antischistosomal drug praziquantel. *Journal of Biological Chemistry*, 5;276(40):36873-6; 2001. doi: 10.1074/jbc.C100273200.

KOKALIARIS C, GARBA A, MATUSKA M, BRONZAN RN, COLLEY DG, DORKENOO AM, EKPO UF, FLEMING FM, FRENCH MD, KABORE A, MBONIGABA JB, MIDZI N, MWINZI PNM, N'GORAN EK, POLO MR, SACKO M, TCHUEM TCHUENTÉ LA, TUKAHEBWA EM, UVON PA, YANG G, WIESNER L, ZHANG Y, UTZINGER J, VOUNATSOU P. Effect of preventive chemotherapy with praziquantel on schistosomiasis among school-aged children in sub-Saharan Africa: a spatiotemporal modelling study. *The Lancet Infectious Diseases*, 22(1):136-149; 2022. doi: 10.1016/S1473-3099(21)00090-6.

KONG D, ZHOU C, GUO H, WANG W, QIU J, LIU X, LIU J, WANG L, WANG Y. Praziquantel Targets M1 Macrophages and Ameliorates Splenomegaly in Chronic Schistosomiasis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 21;62(1):e00005-17; 2017. doi: 10.1128/AAC.00005-17.

KONG D, GUO H, LU Z, CUI J. MicroRNA-21 Mediates the Inhibiting Effect of Praziquantel on NLRP3 Inflammasome in *Schistosoma japonicum* Infection. *Frontiers in Veterinary Science*, 6:517; 2020. doi:10.3389/fvets.2019.00517

KOVAČ J, VARGAS M, KEISER J. In vitro and in vivo activity of R- and S- praziquantel enantiomers and the main human metabolite trans-4-hydroxy-praziquantel against *Schistosoma haematobium*. *Parasites & Vectors*, 10(1):365; 2017. doi:10.1186/s13071-017-2293-3

LA FLAMME AC, PATTON EA, BAUMAN B, PEARCE EJ. IL-4 plays a crucial role in regulating oxidative damage in the liver during schistosomiasis. *Journal of Immunology*, 166:1903–1911; 2001. doi: 10.4049/jimmunol.166.3.1903.

LABUDA LA, ADEGNIKA AA, ROSA BA, MARTIN J, ATEBA-NGOA U, AMOAH AS, LIMA HM, MEURS L, MBOW M, MANURUNG MD, ZINSOU JF, SMITS HH, KREMSNER PG, MITREVA M, YAZDANBAKHS M. A Praziquantel Treatment Study of Immune and Transcriptome Profiles in *Schistosoma haematobium*-Infected Gabonese Schoolchildren. *The Journal of Infectious Diseases*, 13;222(12):2103-2113; 2020. doi: 10.1093/infdis/jiz641.

LAMBERTON PHL, FAUST CL, WEBSTER JP. Praziquantel decreases fecundity in *Schistosoma mansoni* adult worms that survive treatment: evidence from a laboratory life-history trade-offs selection study. *Infectious Diseases of Poverty*, 16;6(1):110; 2017. doi: 10.1186/s40249-017-0324-0.

LAMBERTUCCI JR, GRECO DB, PEDROSO ERP, ROCHA MOC, SALAZAR HM, LIMA DP. A double-blind trial with oxamniquine in chronic schistosomiasis mansoni. *Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 76(6):751-5; 1982.

LAMBERTUCCI JR. Acute schistosomiasis: clinical, diagnostic and therapeutic features. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*; 35:399–40; 1993.

LAMKANFI M, DIXIT VM. Mechanisms and functions of inflammasomes. *Cell Press*, 157:1013–22; 2014. doi: 10.1016/j.cell.2014.04.007

LENZI HL; PACHECO RG; PELAJO-MACHADO M, PANASCO MS; ROMANHA WS; LENZI JA. Immunological system and *Schistosoma mansoni*: co-evolutionary immunobiology. What is the eosinophil role in parasite-host relationship? *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 92: 19-32, 1997.

LENZI HL, EITAN KIMMEL E, SCHECHTMAN H, PELAJO-MACHADO M, ROMANHA WS, PACHECO RG, MARIANO M, LENZI JA. Histoarchitecture of schistosomal granuloma development and involution: morphogenetic and biomechanical approaches. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 93: 141-151; 1998.

LENZI HL. Migração e Desenvolvimento de *Schistosoma mansoni* no hospedeiro definitivo. In: Carvalho OS, COELHO PMZ, LENZI HL. *Schistosoma mansoni* & Esquistossomose. Uma visão Multidisciplinar. 1ª edição. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2008. pp. 85-145.

LIANG YS, WANG W, DAI JR, LI HJ, TAO YH, ZHANG JF, LI W, ZHU YC, COLES GC, DOENHOFF MJ. Susceptibility to praziquantel of male and female cercariae of praziquantel-resistant and susceptible isolates of *Schistosoma mansoni*. *Journal of Helminthology*, 4(2):202-7; 2010. doi: 10.1017/S0022149X0999054X.

LICÁ ICL, FRAZÃO GCCG, NOGUEIRA RA, LIRA MGS, DOS SANTOS VAF, RODRIGUES JGM, MIRANDA GS, CARVALHO RC, SILVA LA, GUERRA RNM, NASCIMENTO FRF. Immunological mechanisms involved in macrophage activation and polarization in schistosomiasis. *Parasitology*, 5:1-66.; 2023. doi: 10.1017/S0031182023000021.

LI-JUAN Z, ZHI-MIN X, YING-JUN Q, HUI D, SHAN L, JING X, SHI-ZHU L, XIAO-NONG Z. Endemic status of schistosomiasis in People's Republic of China in 2016. *ZHONGGUO XUE XI CHONG BING FANG ZHI ZA ZHI*, 28;29(6):669-677; 2017. Chinese. doi: 10.16250/j.32.1374.2017204.

LIRA MGS, NOGUEIRA RA, LICÁ ICL, FRAZÃO GCCG, DOS SANTOS VAF, MENDES ACC, RODRIGUES JGM, MIRANDA GS, SILVA LA, GUERRA RNM, CARVALHO RCC, NASCIMENTO FRF. Immunomodulating and Anti-parasitary Mechanisms of Plant Products in the Treatment of Schistosomiasis. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 33, 1110–1125; 2023. <https://doi.org/10.1007/s43450-023-00442-2>

LIU YH, QIAN MX, WANG XG, JIA J, WANG QN, JIANG YF, WANG RQ, YAN SW, CHEN BY, LI S, QIU ZY, SHEN JK. Comparative efficacy of praziquantel and its optic isomers in experimental therapy of schistosomiasis japonica in rabbits. *Chinese Medical Journal* 99:935–940; 1986.

LIU J, KONG D, QIU J, XIE Y, LU Z, ZHOU C, LIU X, ZHANG R, WANG Y. Praziquantel ameliorates CCl₄ -induced liver fibrosis in mice by inhibiting TGF- β /Smad signalling via up-regulating Smad7 in hepatic stellate cells. *British journal of pharmacology*, 176(24), 4666–4680; 2019. doi:10.1111/bph.14831

LO NC, BEZERRA FSM, COLLEY DG, FLEMING FM, HOMEIDA M, KABATEREINE N, KABOLE FM, KING CH, MAFE MA, MIDZI N, MUTAPI F, MWANGA JR, RAMZY RMR, SATRIJA F, STOTHARD JR, TRAORÉ MS, WEBSTER JP, UTZINGER J, ZHOU XN, DANSO-APPIAH A, EUSEBI P, LOKER ES, OBONYO CO, QUANSAH R, LIANG S, VAILLANT M, MURAD MH, HAGAN P, GARBA A. Review of 2022 WHO guidelines on the control and elimination of schistosomiasis. *The Lancet Infectious Diseases*, 11:e327-e335; 2022. doi: 10.1016/S1473-3099(22)00221-3.

LO VERDE PT. Schistosomiasis. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1154:45-70; 2019. doi: 10.1007/978-3-030-18616-6_3.

MARTINEZ EM, NEVES RH, DE OLIVEIRA RM, MACHADO-SILVA JR, REY L. Parasitological and morphological characteristics of Brazilian strains of *Schistosoma mansoni* in *Mus musculus*. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 36(5):557-64; 2003. doi: 10.1590/s0037-86822003000500003.

McKERRROW J, JASON SALTER J. Invasion of skin by *Schistosoma cercariae*. *Trends in Parasitology*, 18(5): 2002.

McMANUS DP, DUNNE DW, SACKO M, UTZINGER J, VENNERVALD BJ, ZHOU XN. Schistosomiasis *Nature Reviews Disease Primers*, 4, 13; 2018. <https://doi.org/10.1038/s41572-018-0013-8>

McMANUS DP, BERGQUIST R, CAI P, RANASINGHE S, TEBEJE BM, YOU H. Schistosomiasis-from immunopathology to vaccines. *Seminars in Immunopathology*, 42(3):355-371; 2020. doi: 10.1007/s00281-020-00789-x.

MEISTER K, INGRAM-SIEBER N, COWAN M, TODD MN, ROBERTSON C, MELI M. PATRA, GASSER G, KEISER J. Activity of Praziquantel Enantiomers and Main Metabolites against *Schistosoma mansoni*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 58; 9: 5466-5472; 2014. doi.org/10.1128/AAC.02741-14

MEHLHORN H, B. BECKER, P. ANDREWS, H. THOMAS, J.K FRENKEL. *In vivo* and *in vitro* experiments on the effects of praziquantel on *Schistosoma mansoni*. *Arzneimittel-Forschung/Drug Research* 31,544-554; 1981.

MEYER T, SEKLJIC H, FUCHS S, BOTHE H, SCHOLLMAYER D, MICULKA C. Taste, a new incentive to switch to (R)-praziquantel in schistosomiasis treatment. *PLOS Neglected Tropical Diseases* 3(1): e357; 2009. doi:10.1371/journal.pntd.0000357

- MIRANDA GS, RODRIGUES JGM, SILVA JKAO, CAMELO GMA, SILVA-SOUZA N, NEVES RH, MACHADO-SILVA JR, NEGRÃO-CORRÊA DA. New challenges for the control of human schistosomiasis: The possible impact of wild rodents in *Schistosoma mansoni* transmission. *Acta Tropica*, 236:106677; 2022. doi: 10.1016/j.actatropica.2022.106677.
- MOLEHIN AJ. Schistosomiasis vaccine development: update on human clinical trials. *Journal of Biomedical Science*, 22;27(1):28; 2020. doi: 10.1186/s12929-020-0621-y.
- MUTH S, SAYASONE S, ODERMATT-BIAYS S, PHOMPIDA S, DUONG S, ODERMATT P. *Schistosoma mekongi* in Cambodia and Lao People's Democratic Republic. *Advances in Parasitology*, 72:179-203; 2010. doi: 10.1016/S0065-308X(10)72007-8.
- NELWAN ML. Schistosomiasis: Life Cycle, Diagnosis, and Control. *Current Therapeutic Research, Clinical and Experimental*, 22;91:5-9; 2019. doi: 10.1016/j.curtheres.2019.06.001.
- NEVES DP, MELO AL, LINARDI PM, VITOR RW. *Parasitologia Humana*. 13^a ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 2016. 616 p.
- OLIVEIRA FA, KUSEL JR, RIBEIRO F, COELHO PM. Responses of the surface membrane and excretory system of *Schistosoma mansoni* to damage and to treatment with praziquantel and other biomolecules. *Parasitology*, 132(Pt 3):321-30; 2006. doi: 10.1017/S0031182005009169.
- 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*, 69:863–870; 2014. doi: 10.1093/jac/dkt491.
- PARAENSE WL. Observações adicionais sobre o sexo do *Schistosoma mansoni* nas infestações por cercarias de um único molusco. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 47(3-4):535–46; 1949
- PEARCE EJ, MACDONALD AS. The immunobiology of schistosomiasis. *Nature Reviews Immunology*, 2(7):499-511; 2002. doi: 10.1038/nri843.
- PELLEGRINO H, LIMA-COSTA FF, CARLOS MA, MELLO RT. Experimental chemotherapy of schistosomiasis mansoni. XIII. Activity of praziquantel, an isoquinoline-pyrazino derivative, on mice, hamsters and Cebus monkeys. *Z Parasitenk*, 52, 151-168; 1977.
- PICA-MATTOCCIA L, NOVI A, CIOLI D. Enzymatic basis for the lack of oxamniquine activity in *Schistosoma haematobium* infections. *Parasitology Research*, 83(7):687-9; 1997. doi: 10.1007/s004360050320. PMID: 9272559.
- PICA-MATTOCCIA L, CIOLI D. Sex- and stage-related sensitivity of *Schistosoma mansoni* to in vivo and in vitro praziquantel treatment. *International Journal for Parasitology* 34: 527–533; 2004.

PONPETCH K, ERKO B, BEKANA T, RICHARDS L, LIANG S. Biogeographical characteristics of *Schistosoma mansoni* endemic areas in Ethiopia: a systematic review and meta analysis. *Infectious Diseases of Poverty*, 7;10(1):83; 2021. doi: 10.1186/s40249-021-00864-x.

PORDEUS LC, AGUIAR LR, QUININO LRM, BARBOSA CS. 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*, 17(3): 163-75; 2008. doi.org/10.5123/S1679-49742008000300002

QUANSAH E, SARPONG E, KARIKARI TK. Disregard of neurological impairments associated with neglected tropical diseases in Africa. *eNeurological Science*, 7(3):11-14; 2016. doi: 10.1016/j.ensci.2015.11.002

RABELLO ALT, GARCIA MMA, PINTO DA SILVA RA, ROCHA RS, KATZ N. Humoral Immune Responses in Patients with Acute *Schistosoma mansoni* Infection Who Were Followed Up for Two Years After Treatment. *Clinical Infectious Diseases*, 24(3), 304–308; 1997. doi:10.1093/clinids/24.3.304

REY O, WEBSTER BL, HUYSE T, ROLLINSON D, VAN DEN BROECK F, KINCAID-SMITH J, ONYEKWERE A, BOISSIER J. Population genetics of African *Schistosoma* species. *Infection, Genetics and Evolution*, 89:104727; 2021. doi: 10.1016/j.meegid.2021.104727.

RIBEIRO F, COELHO PM, VIEIRA LQ, WATSON DG, KUSEL JR. The effect of praziquantel treatment on glutathione concentration in *Schistosoma mansoni*. *Parasitology*, 116 (Pt 3):229-36; 1998. doi: 10.1017/s0031182097002291.

RIBEIRO-DOS-SANTOS G, VERJOVSKI-ALMEIDA S, LEITE LCC (2006). Schistosomiasis—a century searching for chemotherapeutic drugs. *Parasitology Research*, 99(5), 505–521. doi:10.1007/s00436-006-0175-2

ROLLINSON D, SIMPSON A. *The Biology of Schistosomes - From genes to Latrines*. London: Academic Press, Harcourt Brace Jovanovich Publication, 1987.

ROLLINSON D, KNOPP S, LEVITZ S, STOTHARD JR, TCHUEM TCHUENTÉ LA, GARBA A, MOHAMMED KA, SCHUR N, PERSON B, COLLEY DG, UTZINGER J. Time to set the agenda for schistosomiasis elimination. *Acta Tropica*, 128(2):423-40; 2013. doi: 10.1016/j.actatropica.2012.04.013.

ROSS AG, BARTLEY PB, SLEIGH AC, OLDS GR, LI Y, WILLIAMS GM, MCMANUS DP. Schistosomiasis. *The New England Journal of Medicine*, 18;346(16):1212-20; 2002. doi: 10.1056/NEJMra012396.

SALADIN KS. Behavioral parasitology and perspectives on miracidial host-finding. *Z für Parasitenkunde*: 60(3):197–210; 1979. doi: 10.1007/BF00929167

SCHWARTZ C, FALLON PG. *Schistosoma* "Eggs-Iting" the Host: Granuloma Formation and Egg Excretion. *Frontiers in Immunology*, 29;9:2492; 2018. doi: 10.3389/fimmu.2018.02492.

SCHOLTE RG, GOSONI L, MALONE JB, CHAMMARTIN F, UTZINGER J, VOUNATSOU P. Predictive risk mapping of schistosomiasis in Brazil using Bayesian geostatistical models. *Acta Tropica*, 132:57-63; 2014. doi: 10.1016/j.actatropica.2013.12.007.

SHAKER Y, SAMY N, ASHOUR E. Hepatobiliary schistosomiasis. *Journal of Clinical and Translational Hepatology*, 2:212–216; 2014. doi: 10.14218/JCTH.2014.00018

SHAW MK, ERASMUS DA. *Schistosoma mansoni*: the effects of a subcurative dose of praziquantel on the ultrastructure of worms *in vivo*. *Zeitschrift fur Parasitenkunde* 69(1):73–90; 1983. doi: 10.1007/bf00934012.

SILVA JRM, NEVES RH, GOMES DC. Filogenia, co-evolução, aspectos morfológicos e biológicos das diferentes fases de desenvolvimento do *Schistosoma mansoni*. In: CARVALHO OS, COELHO PMZ, LENZI HL, orgs. *Schistosoma mansoni* e esquistossomose: uma visão multidisciplinar [online]. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2008, pp. 43-84. ISBN 978-85-7541-370-8.

SILVA VBR, CAMPOS BRKL, DE OLIVEIRA JF, DECOU JL, DO CARMO ALVES DE LIMA M. Medicinal chemistry of antischistosomal drugs: Praziquantel and oxamniquine. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 25: 3259–327; 2017. DOI: 10.1016/j.bmc.2017.04.031

SILVEIRA AC. Controle da esquistossomose no Brasil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 84 (Suppl. I): 91-104; 1989.

SOUZA FPC, VITORINO RG, COSTA AP, FARIA JUNIR FC, SANTANA LA, GOMES AP. Esquistossomose mansônica: aspectos gerais, imunologia, patogênese e história natural. *Revista da Sociedade Brasileira de Clínica Médica*, 9(4): 300-307; 2011.

TAYLOR JJ, MOHRS M, PEARCE EJ. Regulatory T cell responses develop in parallel to Th responses and control the magnitude and phenotype of the Th effector population. *Journal of Immunology*, 176:5839–5847; 2006.

TCHUEM TCHUENTÉ LA, SOUTHGATE VR, JOURDANE J, WEBSTER BL, VERCRUYSSSE J. *Schistosoma intercalatum*: an endangered species in Cameroon? *Trends Parasitology*, 19(9):389-93; 2003. doi: 10.1016/s1471-4922(03)00193-4.

THÉRON A. Early and late shedding patterns of *Schistosoma mansoni* cercariae: ecological significance in transmission to human and murine hosts. *The Journal of Parasitology*, 70(5): 652-655, 1984.

TRAINOR-MOSS S, MUTAPI F. Schistosomiasis therapeutics: whats in the pipeline?, *Expert Review of Clinical Pharmacology*, 9:2, 157-160; 2016. DOI: 10.1586/17512433.2015.1102051

UTZINGER J, KEISER J, SHUHUA X, TANNER M, SINGER BH. Combination chemotherapy of schistosomiasis in laboratory studies and clinical trials. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47: 1487-1495; 2003. DOI: 10.1128/AAC.47.5.1487-1495.2003

VIMIEIRO ACS. Ação de esquistossomicidas na fase inicial da esquistossomose experimental. 2009. 106f. Dissertação (Mestrado em Ciências pelo Programa de Pós-Graduação do em Ciências da Saúde). Fundação Oswaldo Cruz. Centro de Pesquisas René Rachou. Belo Horizonte, MG, Brasil.

WARREN KS, DOMINGO EO, COWAN RBT. Granuloma formation around schistosome eggs as a manifestation of delayed hypersensitivity. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 51:735-56; 1967.

WARREN KS, MAHMOUD AA, CUMMINGS P, MURPHY DJ, HOUSER HB. Schistosomiasis mansoni in Yemeni in California: duration of infection, presence of disease, therapeutic management. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 23(5):902-9; 1974. doi: 10.4269/ajtmh.1974.23.902.

WATANABE K, MWINZI PN, BLACK CL, MUOK EM, KARANJA DM, SECOR WE, COLLEY DG. T regulatory cell levels decrease in people infected with *Schistosoma mansoni* on effective treatment. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 77(4):676-82; 2007.

WEBSTER BL, EMERY AM, WEBSTER JP, GOUVRAS A, GARBA A, DIAW O, SEYE MM, TCHUENTE LA, SIMOONGA C, MWANGA J, LANGE C, KARIUKI C, MOHAMMED KA, STOTHARD JR, ROLLINSON D. Genetic diversity within *Schistosoma haematobium*: DNA barcoding reveals two distinct groups. *PLOS Neglected Tropical Diseases*; 6(10):e1882; 2012. doi: 10.1371/journal.pntd.0001882.

WEERAKOON KG, GOBERT GN, CAI P, MCMANUS DP. Advances in the Diagnosis of Human Schistosomiasis. *Clinical Microbiology Reviews*, 28(4):939-67; 2015. doi: 10.1128/CMR.00137-14.

WHITFIELD PJ, BARTLETT A, KHAMMO N, BRAIN AP, BROWN MB, MARRIOTT C, CLOTHIER R. Delayed tail loss during the invasion of human skin by schistosome cercariae. *Parasitology*, 126(Pt 2):135-40; 2003. doi: 10.1017/s0031182002002676..

WHO. Schistosomiasis (Bilharzia). Disponível em: https://www.who.int/health-topics/schistosomiasis#tab=tab_1. 01.03.2023. Acesso em: 19.02.2024

WYNN TA, THOMPSON RW, CHEEVER AW, MENTINK-KANE MM. Immunopathogenesis of schistosomiasis. *Immunological Reviews*, 201:156-67; 2004. doi: 10.1111/j.0105-2896.2004.00176.x.

XIAO SH, B.A CATTO. Comparative *in vitro* and *in vivo* activity of racemic praziquantel and its levorotated isomer on *Schistosoma mansoni*. The Journal of Infectious Diseases 159:589–592; 1989.

XIAO SH, SUN J, CHEN MG. Pharmacological and immunological effects of praziquantel against *Schistosoma japonicum*: a scoping review of experimental studies. Infectious Diseases of Poverty, 7;7(1):9; 2018. doi: 10.1186/s40249-018-0391-x.

YUESHENG L, RABELLO ALT, SIMPSON AJG, KATZ N. The serological differentiation of acute and chronic *Shistosoma japonicum* infection by ELISA using keyhole limpet haemocyanin as antigen. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 88:249-51; 1994.

ZHANG TY. Therapeutic effect of praziquantel in treatment of cerebral schistosomiasis: 14 cases. Chin J Schisto Control 5:252; 1993.

ZOU Q, YAO X, FENG J, YIN Z, FLAVELL R, HU Y, ZHENG G, JIN J, KANG Y, WU B, LIANG X, FENG C, LIU H, LI W, WANG X, WEN Y, WANG B. Praziquantel facilitates IFN- γ -producing CD8⁺ T cells (Tc1) and IL-17-producing CD8⁺ T cells (Tc17) responses to DNA vaccination in mice. PLoS One. 2011;6(10):e25525. doi: 10.1371/journal.pone.0025525. Epub 2011 Oct 5. PMID: 21998665; PMCID: PMC3187796.

APÊNDICES

APÊNDICE A – PRODUÇÃO CIENTÍFICA 2019-2024

▪ **Autoria**

1. **NOGUEIRA, RANIELLY ARAUJO**; LIRA, MARIA GABRIELA SAMPAIO; LICÁ, IRLLA CORREIA LIMA ; FRAZÃO, GLEYCKA CRISTINE CARVALHO GOMES ; DOS SANTOS, VITOR AUGUSTO FERREIRA ; FILHO, ANTONIO CAMILO CORREIA MENDES ; RODRIGUES, JOÃO GUSTAVO MENDES ; MIRANDA, GUILHERME SILVA ; CARVALHO, RAFAEL CARDOSO ; NASCIMENTO, FLÁVIA RAQUEL FERNANDES . Praziquantel: An update on the mechanism of its action against schistosomiasis and new therapeutic perspectives. MOLECULAR AND BIOCHEMICAL PARASITOLOGY, v. 252, p. 111531, 2022.
2. **NOGUEIRA, RANIELLY ARAUJO**; LIRA, MARIA GABRIELA SAMPAIO; SANTOS, SARAH INGRID PINTO ; MONDÊGO-OLIVEIRA, RENATA ; ANDRADE, FÁBIO HENRIQUE EVANGELISTA DE ; SOUSA, EDUARDO MARTINS DE ; BARBOSA, DAVID SOEIRO ; ABREU-SILVA, ANA LUCIA ; CARVALHO, RAFAEL CARDOSO . Intense transmission of visceral leishmaniasis in a region of northeastern Brazil: a situation analysis after the discontinuance of a zoonosis control program. REVISTA BRASILEIRA DE PARASITOLOGIA VETERINARIA, v. 30, p. e020320, 2021.

▪ **Co-autoria**

1. LIRA, MARIA GABRIELA SAMPAIO; **NOGUEIRA, RANIELLY ARAUJO** ; LICÁ, IRLLA CORREIA LIMA ; FRAZÃO, GLEYCKA CRISTINE CARVALHO GOMES ; DOS SANTOS, VITOR AUGUSTO FERREIRA ; MENDES, ANTONIO CAMILO CORREIA ; RODRIGUES, JOÃO GUSTAVO MENDES ; MIRANDA, GUILHERME SILVA ; SILVA, LUCILENE AMORIM ; GUERRA, ROSANE NASSAR MEIRELES ; CARVALHO, RAFAEL CARDOSO ; NASCIMENTO, FLÁVIA RAQUEL FERNANDES . Immunomodulating and Anti-parasitary Mechanisms of Plant Products in the Treatment of Schistosomiasis. BRAZILIAN JOURNAL OF PHARMACOGNOSY, v. 1, p. 1, 2023.
2. LICÁ ICL, FRAZÃO GCCG, **NOGUEIRA RA**, LIRA MGS, DOS SANTOS VAF, RODRIGUES JGM, MIRANDA GS, CARVALHO RC, SILVA LA, GUERRA RNM, NASCIMENTO FRF. Immunological mechanisms involved in macrophage activation and polarization in schistosomiasis. Parasitology. 2023 Jan 5:1-66. doi: 10.1017/S0031182023000021. Epub ahead of print. PMID: 36601859.
3. RODRIGUES, JOÃO GUSTAVO MENDES ; LIRA, MARIA GABRIELA SAMPAIO ; NOGUEIRA, **RANIELLY ARAÚJO** ; GOMES, GLEYCKA CRISTINE CARVALHO ; LICÁ, IRLLA CORREIA LIMA ; SILVA, JEFERSON KELVIN ALVES DE OLIVEIRA ; MIRANDA, GUILHERME SILVA ; SILVA-SOUZA, NÊUTON . Alterations in blood

glucose concentration in wild rodents, *Holochilus sciureus*, naturally infected with *Schistosoma mansoni*. REVISTA BRASILEIRA DE PARASITOLOGIA VETERINARIA, v. 31, p. 1-9, 2022.

4. REIS, A. T. ; SILVA, C. F. C. ; SILVA-SOARES, RAYNARA FERNANDA ; CARDOSO, D. T. ; RODRIGUES, J. G. M. ; **NOGUEIRA, R. A.** ; MIRANDA, G. S. ; SILVA - SOUZA, N. . A preliminary study on the distribution of breeding sites of *BIOMPHALARIA GLABRATA* in the municipality of peri mirim, a low endemicity area for schistosomiasis in northeast Brazil. REVISTA DE PATOLOGIA TROPICAL (ONLINE), v. 50, p. 223-232, 2021.
5. RODRIGUES, JOÃO GUSTAVO MENDES ; LIRA, MARIA GABRIELA SAMPAIO ; **NOGUEIRA, RANIELLY ARAÚJO** ; GOMES, GLEYCKA CRISTINE CARVALHO ; LICÁ, IRLLA CORREIA LIMA ; VIEGAS-MELO, DAVI ; TELES-REIS, ANDREA ; MIRANDA, GUILHERME SILVA ; SILVA-SOUZA, NÊUTON . Effectiveness of a handmade shell-based substrate for the breeding of *Biomphalaria glabrata* under laboratory conditions. REVISTA DO INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL DE SÃO PAULO, v. 62, p. 1-6, 2020.
6. MORAIS, HEVILEM LETÍCIA MOURA DO NASCIMENTO ; FEITOSA, TALITA CARNEIRO ; RODRIGUES, JOÃO GUSTAVO MENDES ; LIRA, MARIA GABRIELA SAMPAIO ; **NOGUEIRA, RANIELLY ARAÚJO** ; LUZ, TÁSSIO RÔMULO SILVA ARAÚJO ; SILVA-SOUZA, NÊUTON ; LIMA, NERILSON MARQUES ; ANDRADE, TERESINHA DE JESUS AGUIAR DOS SANTOS ; MIRANDA, GUILHERME SILVA . Hydroalcoholic extract of *Caryocar brasiliense* Cambess. leaves affect the development of *Aedes aegypti* mosquitoes. SOCIEDADE BRASILEIRA DE MEDICINA TROPICAL. REVISTA, v. 53, p. 1-7, 2020.
7. ALVES, RAYAN RUBENS DA SILVA; RODRIGUES, JOÃO GUSTAVO MENDES; TELES-REIS, ANDREA; **NOGUEIRA, RANIELLY ARAÚJO** ; LICÁ, IRLLA CORREIA LIMA ; LIRA, MARIA GABRIELA SAMPAIO ; ALVES, RAYNARA DA SILVA ; SILVA-SOUZA, NÊUTON ; ANDRADE, TERESINHA DE JESUS AGUIAR DOS SANTOS ; MIRANDA, GUILHERME SILVA . Antiparasitic effects of ethanolic extracts of and leaves on cercariae and adult worms of. PARASITOLOGY, v. 1, p. 1-41, 2020.
8. MIRANDA, GUILHERME SILVA; RODRIGUES, JOÃO GUSTAVO MENDES; LIRA, MARIA GABRIELA SAMPAIO; **NOGUEIRA, RANIELLY ARAÚJO**; GOMES, GLEYCKA CRISTINE CARVALHO ; SILVA-SOUZA, NÊUTON . *Schistosoma mansoni* Infection in *Holochilus sciureus* Shows Sex-Related Differences in Parasitological Patterns. OPEN JOURNAL OF ANIMAL SCIENCES, v. 09, p. 173-182, 2019.

9. DO CARMO-SILVA, CARLA FERNANDA; TELES-REIS, ANDREA; SILVA-SOARES, RAYNARA FERNANDA; RODRIGUES, JOÃO GUSTAVO MENDES; LIRA, MARIA GABRIELA SAMPAIO ; **NOGUEIRA, RANIELLY ARAÚJO** ; VIEGAS-MELO, DAVI ; CARDOSO, DIOGO TAVARES ; MIRANDA, GUILHERME SILVA ; SILVA-SOUZA, NÊUTON . Spatial and Seasonal Distribution of *Holochilus sciureus* with *Schistosoma mansoni* Infection in an Endemic Area for Schistosomiasis in Brazil. ACTA PARASITOLOGICA, v. 14, p. 1-6, 2019.

10. SILVA-SOUZA, NÊUTON DA; SILVA, ANA PATRÍCIA DE CARVALHO DA; OLIVEIRA, RENATA MONDEGO DE ; LIRA, MARIA GABRIELA SAMPAIO ; **NOGUEIRA, RANIELLY ARAÚJO** ; PENHA-SILVA, TATIANE ARANHA DA ; MELO, SOLANGE DE ARAÚJO ; ANDRADE, FÁBIO HENRIQUE EVANGELISTA DE ; SANTOS-RIBEIRO, LARISSA SARMENTO DOS ; CARVALHO NETA, ALCINA VIEIRA DE ; ABREU-SILVA, ANA LUCIA . Parasitological and histological aspects of *Holochilus sciureus* naturally infected by *Schistosoma mansoni*. Revista Brasileira de Parasitologia Veterinaria, v. 28, p. 769-772, 2019.

ANEXOS

**ANEXO A- PROTOCOLO DO COMITÊ DE ÉTICA E EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL
DA UFMA**

	UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA CIAEP: 02.0341.2019	 Comissão de Ética no Uso de Animais
<u>CERTIFICADO</u>		
09/2020		
<p>Certificamos que a proposta intitulada: "INVESTIGAÇÃO PARASITOLÓGICA E IMUNOLÓGICA EM CAMUNDONGOS INFECTADOS POR <i>Schistosoma mansoni</i> SAMBON, 1907", Processo n. 23115.002254/2020-18, sob a responsabilidade do Profa. Dra. Flávia Raquel Fernandes do Nascimento, 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 considerado APROVADO pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA - UFMA) da Universidade Federal do Maranhão, na reunião realizada em 21/02/2020.</p> <p>We certify that the proposal: "PARASITOLOGICAL AND IMMUNOLOGICAL INVESTIGATION IN INFECTED MICE BY <i>Schistosoma mansoni</i> SAMBON, 1907", Process n. 23115.002254/2020-18, under the responsibility of Prof. Dr. Flávia Raquel Fernandes do Nascimento, which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, sub phylum Vertebrata (except humans beings) for scientific research purposes (or teaching) - is in accordance with Law No. 11,794, of October 8, 2008, Decree No. 6.899, of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was APPROVED by the Ethics Committee on Animals Use of the Federal University of Maranhão (CEUA - UFMA), in meeting of 02/21/2020.</p>		
Finalidade da Proposta: Pesquisa		Área: Ciências da Saúde
Vigência da Proposta: 01/08/2020 à 01/08/2024.		
Origem Biotério Central da Universidade Federal do Maranhão		
Espécie	Camundongos <i>Mus musculus</i>	Sexo Macho Idade 60 a 90 dias Peso 20-25g
		Amostra 316
Linhagem/Raça: Swiss		
Local do experimento: Biotério Setorial da Pós-Graduação do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde - CCBS/UFMA.		
São Luís, 28 de abril de 2020.		
 Prof. Dr. Rafael Cardoso Carvalho Presidente da Comissão de Ética no uso de Animais – CEUA/UFMA		

ANEXO B- COMPROVAÇÃO DE FINANCIAMENTO DE PESQUISA

	<p>ESTADO DO MARANHÃO FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA E AO DESENVOLVIMENTO CIENTÍFICO E TECNOLÓGICO DO MARANHÃO TERMO DE OUTORGA - ACEITAÇÃO DE AUXÍLIO</p>	<p>Processo UNIVERSAL-01001/19</p>
IDENTIFICAÇÃO DO OUTORGANTE		
<p>NOME: FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA E AO DESENVOLVIMENTO CIENTÍFICO E TECNOLÓGICO DO MARANHÃO (www.fapema.br)</p> <p>LEGISLAÇÃO: LEI COMPLEMENTAR Nº 060 DE 31 DE JANEIRO DE 2003.</p> <p>ENDEREÇO: Rua Perdizes, nº 05, Qd 37,</p> <p>RESPONSÁVEL: André Luis Silva dos Santos</p> <p>BAIRRO / CEP: Jardim Renascença / 65075-340</p> <p>CARGO: DIRETOR-PRESIDENTE</p>		
IDENTIFICAÇÃO DO OUTORGADO		
<p>NOME: Flávia Raquel Fernandes do Nascimento</p> <p>CPF: 488.271.693-34</p> <p>BANCO: Brasil</p> <p>INSTITUIÇÃO: UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO</p> <p>DEPARTAMENTO: Departamento de Patologia</p> <p>ENDEREÇO: AV MONÇÃO, N01, CONDOMINIO DUBAI, BL SAFIRA, APT0 406</p> <p>CEP: 65.075-692</p> <p>ENDEREÇO ELETRÔNICO: FLAVIA.NASCIMENTO@UFMA.BR</p> <p>IDENTIDADE: 1010087748</p> <p>Nº AGÊNCIA: 4445-8</p> <p>Nº CONTA: 26494-6</p> <p>BAIRRO: JARDIM RENASCENÇA</p> <p>U.F.: MARANHÃO</p> <p>CIDADE: SÃO LUÍS</p> <p>FONE FIXO:</p>		
IDENTIFICAÇÃO DO AUXÍLIO		
<p>UNIVERSAL-01001/19 VIGÊNCIA: 06/11/2020 a 06/11/2022</p> <p>MODALIDADE: UNIVERSAL - APOIO A PROJETO DE PESQUISA - UNIVERSAL EDITAL FAPEMA Nº 002/2019 - UNIVERSAL</p> <p>TÍTULO DO PROJETO: INVESTIGAÇÃO DO POTENCIAL IMUNOMODULADOR DE DYSPHANIA AMBROSIOIDES (L.) MOSYAKIN & CLEMANTS (MASTRUZ) NA ESQUISTOSSOMOSE EXPERIMENTAL</p> <p>ÁREA / SUBÁREA : Ciências Biológicas / IMUNOLOGIA</p>		
VALOR DO AUXÍLIO A SER PAGO		
DATA LIMITE - RELATÓRIO TÉCNICO / PRESTAÇÃO DE CONTAS	NÚMERO DE PARCELA(S)	VALOR TOTAL
06/12/2022	01	R\$ 35.000,00

ANEXO C – LIMITE TEÓRICO DE DETECÇÃO DO KIT CBA PARA CITOCINAS Th1, Th2 E Th17

30 | BD CBA Mouse Th1/Th2/Th17 Cytokine Kit

Theoretical limit of detection

Experiment details

The individual standard curve range for a given cytokine defines the minimum and maximum quantifiable levels using the BD CBA Mouse Th1/Th2/Th17 Cytokine Kit (ie, 20 pg/mL and 5000 pg/mL). By applying the 4-parameter curve fit option, it is possible to extrapolate values for sample intensities not falling within the limits of the standard curve. It is up to the researcher to decide the best method for calculating values for unknown samples using this assay. The theoretical limit of detection for each cytokine using the BD CBA Mouse Th1/Th2/Th17 Cytokine Kit is defined as the corresponding concentration at two standard deviations above the median fluorescence of 30 replicates of the negative control (0 pg/mL).

Limit of detection data

Cytokine	Limit of detection (pg/mL)
IL-2	0.1
IL-4	0.03
IL-6	1.4
IFN- γ	0.5
TNF	0.9
IL-17A	0.8
IL-10	16.8