

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
FACULDADE DE FARMÁCIA E BIOQUÍMICA
MESTRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Juliane Marques Felicissimo

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DA LICOCHALCONA A NA TERAPIA
DA ESQUISTOSSOMOSE *IN VITRO* E EM MODELO MURINO**

JUIZ DE FORA
2014

JULIANE MARQUES FELICISSIMO

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DA LICOCHALCONA A NA TERAPIA
DA ESQUISTOSSOMOSE *IN VITRO* E EM MODELO MURINO**

Dissertação de Mestrado do Curso de
Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas: Área: Produtos Naturais
Bioativos, para obtenção do Título de
Mestre em Ciências Farmacêuticas:
Área: Produtos Naturais Bioativos.

Orientadora: Dra. Priscila de Faria Pinto

Juiz de Fora
2014

JULIANE MARQUES FELICISSIMO

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DA LICOCHALCONA A NA TERAPIA
DA ESQUISTOSSOMOSE *IN VITRO* E EM MODELO MURINO**

Dissertação de Mestrado do Curso de
Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas: Área: Produtos Naturais
Bioativos, para obtenção do Título de
Mestre em Ciências Farmacêuticas:
Área: Produtos Naturais Bioativos.

Aprovado em __/__/__

BANCA EXAMINADORA

Dr. Ivo Santana Caldas
Universidade Federal de Alfenas

Dr. Jorge Willian Leandro Nascimento
Universidade Federal de Juiz de Fora

Dra. Rafaella Fortini Grenfell e Queiroz (Suplente)
Centro de Pesquisas René Rachou Rachou Fiocruz/MG

Dra. Ademar Alves da Silva Filho (Suplente)
Universidade Federal de Juiz de Fora

Felicissimo, Juliane Marques.

Avaliação do potencial da licochalcona A na terapia da esquistossomose in vitro e em modelo murino / Juliane Marques Felicissimo. -- 2014.

86 p. : il.

Orientadora: Priscila de Faria Pinto

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Faculdade de Farmácia e Bioquímica. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2014.

1. Esquistossomose mansônica. 2. Licochalcona A. 3. Sistema excretor. 4. Glicoproteína-P. 5. ATP Difosfohidrolases. I. Faria Pinto, Priscila de, orient. II. Título.

AGRADECIMENTOS

É tempo de agradecer a colheita que muitos me ajudaram a semear. Primeiramente agradeço a meu Pai do Céu que sempre me abençoou em todos os trajetos que tive que percorrer até aqui e me deu força para continuar a caminhada.

À minha mãe que mesmo lá do céu sei que se alegra a cada conquista que eu faço por aqui. Será minha eterna inspiração, pois foi você que me ensinou a lutar pelos meus objetivos. Dedico essa vitória a você. Eternas saudades.

À minha irmã Fernanda por estar incondicionalmente ao meu lado. Obrigada por me aturar nos momentos difíceis e por me fazer acreditar em dias melhores. Te amo.

Ao meu pai por estar de longe me abençoando e torcendo por mim. Te amo.

À minha querida Orientadora Priscila, por acreditar em mim e ter iniciado o plantio deste sonho lá nas aulas de química analítica qualitativa. Obrigada por não ter desistido de mim, pela sua paciência e em especial, pelos seus conselhos!

Aos caros colegas do Laboratório de Estrutura e Função de Proteínas por todo o incentivo e por me ajudarem a concretizar este sonho: sem vocês nada disso seria possível!

Aos meus amigos do laboratório do Hospital Regional João Penido que me apoiaram nas lutas diárias e me incentivaram muito!

Aos colegas de classe no mestrado e aos meus mestres da UFJF e especialmente, da UNIPAC, que possibilitaram concluir esta etapa de formação!

Aos meus amigos ex-residentes pela força de sempre.

Aos meus familiares e todos aqueles que de alguma forma se alegram com a minha conquista: o meu muito obrigada.

RESUMO

Legítima representante do rol de doenças tropicais negligenciadas, a esquistossomose causada pelos trematódeos do gênero *Schistosoma spp.* constitui uma enfermidade endêmica em 78 países, impondo grandes desafios à saúde das populações afetadas. Atualmente, a ausência de uma vacina eficaz reforça o papel da quimioterapia como o pilar do controle da morbidade e transmissão, a qual permanece restrita e ameaçada pela eminência de cepas resistentes ao praziquantel. Nos últimos anos, esforços vêm sendo empreendidos na tentativa de descobrir novos fármacos esquistossomicidas, com notável contribuição dos produtos naturais. Neste contexto, o flavonóide Licochalcona A - marcador quimiotaxonômico da espécie *Glycyrrhiza inflata* – que detém atividades biológicas diversas, como anti-inflamatória, antioxidante e antiprotozoária para espécies de *Leishmania spp.* e *Plasmodium spp.*, demonstrou atividade esquistossomicida promissora em um estudo preliminar, sendo considerado o objeto do presente estudo. Desta forma, a proposta foi avaliar a progressão da esquistossomose mansônica em camundongos Swiss frente ao tratamento com LicoA, além de obter mais informações acerca de sua atividade contra vermes adultos *in vitro*. Após um período de 24 horas de incubação, a LicoA a partir de 50 μ M foi capaz de causar o escurecimento do tegumento dos vermes, a perda moderada da motilidade e áreas de intumescimento corporal. Além disso, produziu pontos de retenção do corante resorufin e conseqüentemente, a descontinuidade na marcação dos principais túbulos e ramos do sistema excretor dos esquistossomos. Este último pode ser a origem dos demais efeitos, contribuindo para o entendimento das potenciais influências da droga sobre receptores e/ou enzimas presentes nos esquistossomos. Além disso, a suposta inibição parcial das SmATPDases pode igualmente contribuir para o insucesso do parasitismo. Nos ensaios *in vivo*, o esquema de 50mg/Kg em duas doses administrado por via intraperitoneal foi o mais promissor, alcançado uma mediana de 25% da redução da carga parasitária e o maior deslocamento hepático dos vermes. Por outro lado, a droga não induziu alterações no oograma qualitativo ou no peso hepático e esplênico, mostrando relativa inércia sobre a cinética de oviposição. Mais estudos devem ser conduzidos para acumular evidências sobre o

efeito esquistossomicida da Licochalcona A, principalmente os que contemplem um maior número de animais e de parâmetros analisados, como por exemplo, o perfil de citocinas e quimiocinas *in vivo*, além de outras metodologias *in vitro* e o aprimoramento daquelas que foram aqui empregadas, de modo a fornecer mais detalhes sobre a influência da LicoA em alguns sistemas intrínsecos ao parasito.

Descritores: *Schistosoma mansoni*. Licochalcona A. Sistema Excretor. Glicoproteína-P. ATP disfosfohidrolase.

ABSTRACT

Schistosomiasis, one significant neglected tropical disease, is an infection caused by trematode worms of the genus *Schistosoma spp.* it is endemic in 78 countries, being a major public health challenge. Currently, the absence of an effective vaccine supports the chemotherapy as the mainstay of schistosomiasis control programs. However, the chemotherapy has limitations, such as, the emergence of praziquantel-resistant strains. In recent years, attempts to discover new antischistosomal drugs had remarkable contribution of natural products. In this context, the flavonoid Licochalcona A - chemotaxonomic marker of the specie *Glycyrrhiza inflata* - has several biological activities such as anti-inflammatory, antioxidant and anti-protozoan against species of *Leishmania spp.* and *Plasmodium spp.* Moreover, Licochalcona A showed promising schistosomicidal activity in a preliminary study. Thus, the aim of this study was to evaluate the progression of schistosomiasis in Swiss mice treated with LicoA and its activity against adult worms *in vitro*. After 24 hour incubation, concentrations from 50 μ M LicoA caused tegument darkening, moderate loss of motility and areas of swelling body. Moreover, the exposure to the compound produced accumulation of resorufin and hence the discontinuity in the labelling of the main branches and tubules in the excretory system of schistosomes. The latter may be the source of other effects, contributing to the understanding of the potential influence of the drug on receptors and / or enzymes in schistosomes. In addition, the alleged partial inhibition of SmATPDases can also contribute to the failure of parasitism. *In vivo* tests, the 50 mg/kg schedule of two doses administered intraperitoneally were the most promising reached a median 25% reduction of worm burden and increased hepatic displacement of the worms. Moreover, the drug did not induce changes in the qualitative or oogram liver and spleen weight relative inertia about showing the kinetics of oviposition. Further studies should be conducted to collect evidence on the effect of schistosomicidal Licochalcona A, especially those that consider a larger number of animals and analyzed parameters, such as the profile of *in vivo* cytokines and chemokines, and other *in vitro* methods and the improvement of those who were employed here in order to provide more details on the influence of LicoA in some systems intrinsic to the parasite.

Keywords: *Schistosoma mansoni*. Licochalcone A. Excretory system. P-glycoprotein. ATP disfosfohidrolase.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Ciclo de vida dos esquistossomídeos que causam infecção intestinal.	17
Figura 2	Aspecto geral da morfologia externa dos ovos de <i>S. mansoni</i> por microscopia óptica – Aumento de 40x.	19
Figura 3	Exemplos de ovos de espécies de <i>Schistosoma spp</i> que apresentam espícula terminal...	19
Figura 4	Estrutura química da Oxamniquina.	22
Figura 5	Estrutura química do Praziquantel.	23
Quadro 1	Relação de alguns resultados promissores relativos a substâncias e ou extratos testados como drogas esquistossomicidas.	26
Figura 6	Artemisinina e seus derivados...	27
Figura 7	Esqueleto básico de uma chalcona	29
Figura 8	Estrutura da Licochalcona A...	29
Quadro 2	Relação de algumas atividades biológicas descritas para a Licochalcona A.	30
Figura 9	Parte área do vegetal que constitui a fonte primária para obtenção de Licochalcona A: <i>Glycyrrhiza inflata</i> .	31
Figura 10	Alterações morfológicas de vermes adultos de <i>Schistosoma mansoni</i> provocadas pela ação da Licochalcona A em cultura...	43
Figura 11	Alterações morfológicas do sistema excretor de vermes adultos de <i>Schistosoma mansoni</i> provocadas pela ação da Licochalcona A em cultura e visualizadas através de marcação fluorescente por Resorufin...	44
Figura 12	Efeitos do tratamento em dose única com Licochalcona A sobre o oograma de camundongos da linhagem Swiss infectados com <i>Schistosoma mansoni</i> ...	49
Figura 13	Efeitos do tratamento em duas doses com Licochalcona A sobre o oograma em camundongos da linhagem Swiss	50

infectados com *Schistosoma mansoni*...

Gráfico 1 Inibição da atividade ATP difosfohidrolásica do
homogeneizado do tegumento de *S. mansoni* por diferentes
concentrações de Licochalcona A...

52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Disposição dos animais em seis grupos experimentais e seus respectivos esquemas de tratamento..	38
Tabela 2	Dados referentes à intervenção em cada grupo experimental e à taxa de recuperação de vermes...	45
Tabela 3	Contagem média global de leucócitos em amostras de sangue de animais infectados por <i>Schistosoma mansoni</i> e tratados com as drogas Licochalcona A ($\times 10^3/\text{mm}^3$ de sangue)...	47
Tabela 4	Peso médio dos órgãos removidos após eutanásia dos animais infectados por <i>Schistosoma mansoni</i> e tratados com duas doses da substância Licochalcona A e com praziquantel.	47
Tabela 5	Potencial de inibição da Licochalcona A sobre a atividade ATPásica e ADPásica das isoformas de ATP difosfohidrolase de <i>Schistosoma mansoni</i> ...	51

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADP	Adenosina difosfato
ART	Arteméter
ATP	Adenosina trifosfato
BH	Belo Horizonte
°C	Graus centígrados
CaCl ₂	Cloreto de Cálcio
CH ₃	Grupo metil
CO ₂	Gás carbônico
CT	Controle
Da	Daltons
DMSO	Dimetilsulfóxido
G	Grama
Gp-P	Glicoproteína-P
HCl	Ácido Clorídrico
IgG	Imunoglobulina Gama
Ip.	Intraperitoneal
K	Kilo
KCl	Cloreto de potássio
KK	Kato-Katz
L	Litro
LicoA	Licochalcona A
μ	Micro
M	Mili
M	Molar
MG	Minas Gerais
MgCl ₂	Cloreto de Magnésio
Min.	Minutos
MOPS	Ácido 3- N-morfolino- propanosulfônico
N	Nano
N	Normal

NaCl ₂	Cloreto de Sódio
NaN ₃	Azida de Sódio
NIPPAN	Núcleo de Identificação e Pesquisa de Princípios Ativos Naturais
NTPases	Nucleosídeos Trifosfato Hidrolases
NTPDases	Nucleosídeos Trifosfato Difosfohidrolases
OMS	Organização Mundial da Saúde
OXM	Oxamniquina
PBS	Phosphate Buffer Solution - Solução tampão fosfato
PCR	Polimerase Chain Reaction – Reação da Polimerase em cadeia
pH	Potencial Hidrogeniônico
Pi	Fosfato inorgânico
PZQ	Praziquantel
RPMI	Roswell Park Memorial Institut
SmATPDase	Schistosoma mansoni ATP difosfohidrolase
TRIS	Trishidroximetilaminometano
UFJF	Universidade Federal de Juiz de Fora

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
1.1 ESQUISTOSSOMOSE: ASPECTOS GERAIS.....	15
1.2 DIAGNÓSTICO CLÍNICO - LABORATORIAL.	18
1.3 ABORDAGEM FARMACOLÓGICA NA ESQUISTOSSOMOSE	20
1.4 PRODUTOS NATURAIS COMO FONTES DE NOVOS FÁRMACOS ESQUISTOSSOMICIDAS	24
1.5 CARACTERIZAÇÃO DA LICOCHALCONA A.....	28
1.6 CARACTERIZAÇÃO DAS ISOFORMAS DA ATP DIFOSFOHIDROLASE EM <i>SCHISTOSOMA MANSONI</i>	33
2 OBJETIVOS.....	35
2.1 OBJETIVOS GERAIS.....	35
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	35
3 MATERIAL E MÉTODOS	36
3.1 OBTENÇÃO DA LICOCHALCONA A	36
3.2 INFECÇÃO E CICLO INFECÇÃO	36
3.3 ENSAIOS <i>IN VITRO</i>	37
3.4 ENSAIOS <i>IN VIVO</i> , TRATAMENTO E AVALIAÇÃO PARASITOLÓGICA DOS ANIMAIS.....	38
3.4.1 Contagem da leucometria global	39
3.4.2 Peso hepático e esplênico.....	39
3.4.3 Oograma qualitativo.....	39

3.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DA LICOCHALCONA A SOBRE AS ISOFORMAS DE ATP DIFOSFOHIDROLASE	40
3.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	41
3.7 ASPECTOS ÉTICOS.....	41
4 RESULTADOS	42
4.1 ENSAIOS <i>IN VITRO</i>	42
4.2 ENSAIOS <i>IN VIVO</i>	45
4.2.1 Recuperação dos vermes.....	45
4.2.2 Leucometria Global	46
4.2.3 Peso hepático e esplênico.....	47
4.2.4 Oograma qualitativo.....	48
4.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DA LICOCHALCONA A SOBRE AS ISOFORMAS DE ATP DIFOSFOHIDROLASE.....	51
5 DISCUSSÃO	53
6 CONCLUSÃO	60
REFERÊNCIAS.....	61
ANEXO	86

1) INTRODUÇÃO

1.1 ESQUISTOSSOMOSE: ASPECTOS GERAIS

Legítima representante do rol de doenças tropicais negligenciadas, a esquistossomose é uma enfermidade endêmica em 78 países, impondo grandes desafios à saúde das populações afetadas. Estimativas da Organização Mundial da Saúde (OMS) apontam mais de 700 milhões de pessoas residentes em áreas endêmicas e aproximadamente 240 milhões de pessoas infectadas por tal parasitose, que se associa essencialmente às precárias condições de saneamento básico, baixo nível socioeconômico e educação sanitária insuficiente (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2013a; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2013b). Em 2011, o Brasil confirmou algo em torno de 65 mil casos da doença, cuja incidência é de notificação compulsória (BRASIL, 2011; BRASIL, 2013).

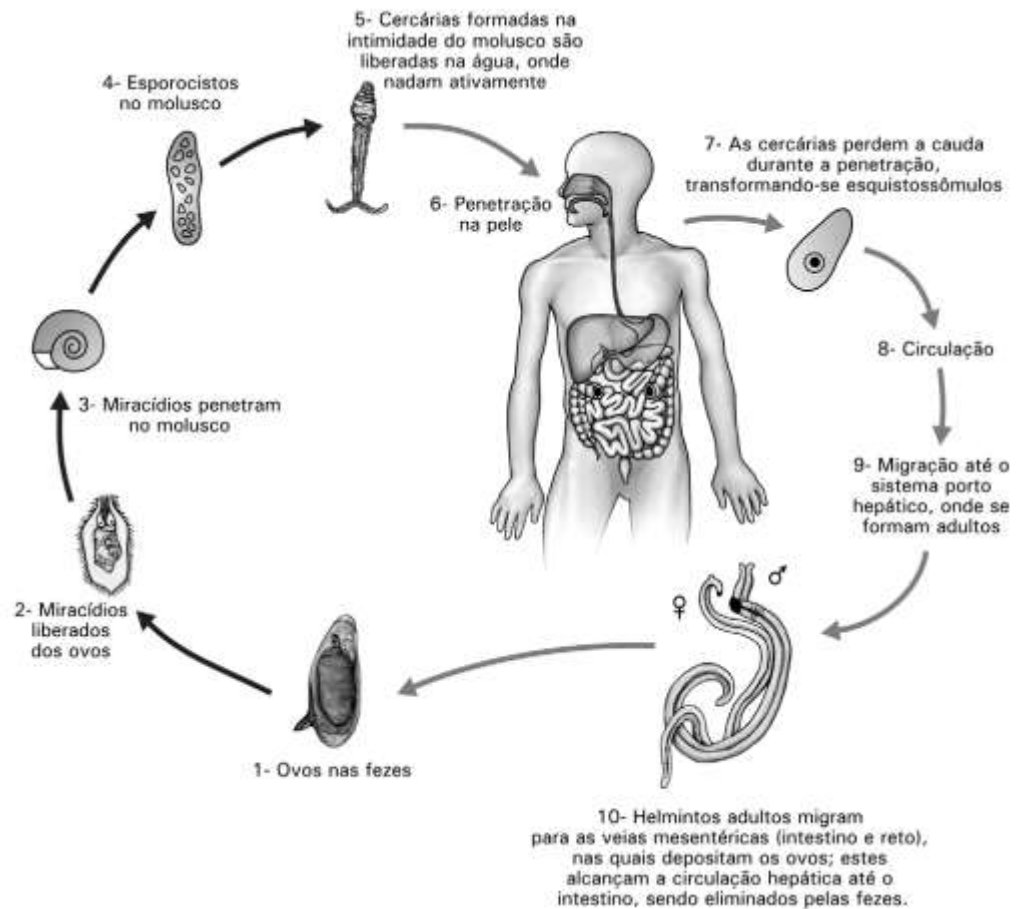
Historicamente, atribui-se a vigência da endemia no país ao tráfico de escravos infectados, que introduziram os helmintos do gênero *Schistosoma spp.* no território nacional. Apesar das condições ambientais favoráveis, a disponibilidade de hospedeiros intermediários - plarnobídeos do gênero *Biomphalaria spp.* – tornou-se um fator limitante ao desenvolvimento das espécies então introduzidas, permanecendo apenas o *Schistosoma mansoni* no país (KATZ, 2003; SOUZA et al., 2011).

A esquistossomose consiste em uma verminose transmitida pelos platelmintos pertencentes à classe *Trematoda*, família *Schistosomatidae* e gênero *Schistosoma*, podendo ser urinária ou intestinal de acordo com a espécie envolvida. Assim, infecção por *S. haematobium* determina o acometimento do sistema urogenital, sendo as demais espécies - *S. mansoni*, *S. malayensis*, *S. guineensis*, *S. mekongi*, *S. japonicum* e *S. intercalatum* - agentes etiológicos da infecção intestinal (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1985; GRYSEELS et al., 2006). Os esquistossomídeos exibem coloração esbranquiçada, corpo achatado, sexos separados, acentuado dimorfismo sexual e ciclo de vida do tipo heteroxênico (SOUZA et al., 2011).

Diferenças morfológicas, metabólicas e reprodutivas podem ser evidenciadas durante o ciclo do *S. mansoni* (Figura 1) até que o mesmo alcance o estágio adulto no hospedeiro definitivo. Os miracídios, que são ciliados, eclodem dos ovos introduzidos nas coleções hídricas pelas fezes do hospedeiro mamífero infectado e nadam em direção aos moluscos suscetíveis ao seu desenvolvimento. Dentro do molusco, os miracídios sofrem algumas transformações e evoluem para as formas infectantes aos mamíferos – ou cercárias - dentro de 3 a 5 semanas. As cercárias abandonam o molusco nadando ativamente em busca de potenciais hospedeiros definitivos, podendo penetrar ativamente no homem através da pele ou da mucosa. Uma vez inseridas, as cercárias agora denominadas esquistossômulos são carregadas passivamente pela corrente sanguínea até desembocarem no sistema porta hepático, sítio em que completam o processo de maturação e diferenciação sexual em um período aproximado de 30 dias. Por ocasião da cópula, a fêmea se alberga no canal ginecóforo do macho e o casal se aloja preferencialmente no sistema venoso mesentérico (GRYSEELS et al., 2006; SOUZA et al., 2011). A oviposição transcorre na submucosa do intestino com a postura de ovos imaturos. Dentro de uma semana, em média, estes se tornam viáveis e podem ser eliminados pelas fezes do hospedeiro mamífero (KATZ, 2003).

O quadro clínico da doença relaciona-se com as fases reveladas durante o desenvolvimento do helminto. Primariamente, as larvas que atingem a derme desencadeiam uma reação inflamatória urticariforme – ou *dermatite cercariana* – que é capaz de eliminar parte do inoculo inicial. Após o sucesso da penetração pela pele, a migração dos esquistossômulos remanescentes estimula a fase aguda da doença, a qual pode transcorrer de forma assintomática/leve ou como uma síndrome toxêmica, conhecida por *Febre de Katayama*. Nesta última, os sintomas, que incluem: mal-estar geral, febre, anorexia, dor abdominal, tosse seca, sudorese, mialgia, diarreia, linfadenopatia, cefaleia, prostração, entre outros; surgem de três a quatro semanas após a contaminação e tornam-se mais intensos entre a quinta e sexta semana. Por fim, a fase crônica na esquistossomose é órgão específica, sendo o seu curso determinado pelos desdobramentos da reação granulomatosa frente aos ovos internalizados nos tecidos ou pela deposição de imunocomplexos (BARSOUM, ESMAT e EL-BAZ, 2013; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2013a).

Figura 1 – Ciclo de vida dos esquistossômídeos que causam infecção intestinal.



Fonte: SOUZA et al., 2011.

As entidades clínicas, intestinal ou hepatointestinal, tidas como formas crônicas leves e, normalmente assintomáticas, acometem a maioria dos indivíduos que moram em áreas endêmicas. Os sintomas, quando presentes, são variáveis entre queixas dispépticas, diarreicas e/ou inespecíficas, sendo a função hepática preservada nestes casos. A esquistossomose hepatoesplênica corresponde à forma grave da doença em que há uma expressiva fibrose no nível dos espaços periportais do fígado, comprometendo a circulação portal. Neste ponto, hipertensão portal e congestão passiva tornam-se patentes podendo ser acompanhada ou não de prejuízo à função hepática (SILVA et al., 2012; BARSOUM, ESMAT e EL-BAZ, 2013).

1.2 DIAGNÓSTICO CLÍNICO-LABORATORIAL

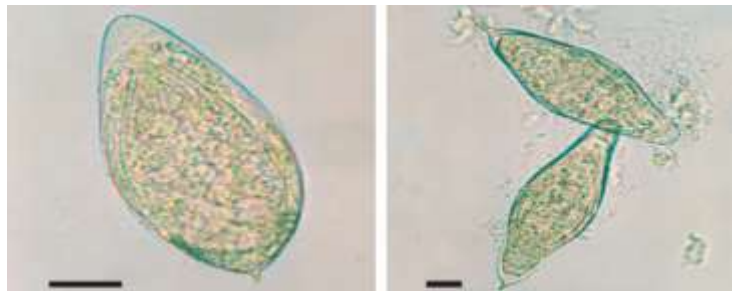
No âmbito do diagnóstico clínico-epidemiológico da esquistossomose, a confirmação laboratorial é uma ferramenta indispensável, sendo essencialmente viabilizada pela pesquisa direta de ovos de *Schistosoma spp.* em amostras fecais, os quais exibem características peculiares (Figura 2) como o tamanho relativo e a presença de uma espícula na posição lateral (apenas para *S. mansoni*) ou terminal (Figura 3) dependendo da espécie (GRAY et al., 2011). A espécie *S. haematobium* apresenta-se como uma exceção, pois a amostra de eleição é urina (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1985). A técnica de Kato-Katz (KK) (KATZ, CHAVES e PELLEGRINO, 1972) constitui padrão ouro preconizado pela OMS na definição dos casos de esquistossomose intestinal, que aliado ao baixo custo técnico-operacional, permite estimar a intensidade da infecção em baixa, moderada ou alta através da quantificação do número de ovos por grama de fezes examinado (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1985; GRYSEELS et al., 2006), muito embora o diagnóstico possa ser seguramente determinado em outros exames parasitológicos de rotina com emprego de técnicas de concentração ou sedimentação (RABELO et al., 1992; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1993b; KONGS et al., 2001). No entanto, fatores como a variação diária na excreção de ovos (KONGS et al., 2001; ZHANG et al., 2009), infecção com baixa carga parasitária e ocorrência de esquistossomose ectópica desafiam a sensibilidade destes métodos (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2009; FROTA et al., 2011), com prejuízo na obtenção de dados fidedignos de prevalência, principalmente em áreas com baixos níveis de transmissão e em populações submetidas a tratamentos prévios (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1985; UTZINGER et al., 2011).

Figura 2 - Aspecto geral da morfologia externa dos ovos de *S. mansoni* por microscopia óptica



Fonte: Faria-Pinto – acervo pessoal. Aumento de 40x.

Figura 3 – Exemplos de ovos de espécies de *Schistosoma spp.* que apresentam espícula terminal.



Fonte: WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1994. À esquerda ovos de *S. haematobium* e à direita, *S. intercalatum*.

Alguns estudos (BERHE et al., 2004; ENK et al., 2008; LIN et al., 2008; FROTA et al., 2011) demonstraram que a confecção e exame de uma única lâmina pela técnica de KK subestima a população infectada em áreas de baixa transmissão, sendo aconselhável aumentar o número de esfregaços por amostra de fezes obtida. De fato, Berhe et al. (2004) demonstraram que a partir de uma única amostra fecal, a prevalência de casos aumentou de 31,3% para 45,7%, e depois para 52,1% quando se analisaram um, três e cinco esfregaços, respectivamente. Semelhante ao estudo anterior houve um aumento na sensibilidade da técnica de 12% para 44% quando foram analisadas três lâminas ao invés de uma, como apontado por Frota et al. (2011). Ainda, Siqueira et al. (2011) evidenciaram um aumento mais expressivo na sensibilidade da técnica quando mais amostras de fezes foram fornecidas ao invés de apenas uma.

A detecção dos níveis de antígenos catódicos ou anódicos circulantes em amostras de urina ou soro exibe especificidade ótima, além da boa correlação com o nível de excreção de ovos, constituindo outra vertente bastante adequada aos inquéritos epidemiológicos (GRYSEELS et al., 1995; HAMILTON, KLINKER e DOENHOFF, 1998). Apesar do comprometimento da especificidade pela ocorrência

de potenciais reações cruzadas, imunoenaios com anticorpos aplicados a amostras sorológicas também são úteis pela relativa sensibilidade, notadamente em áreas de baixa endemicidade (HAMILTON, KLINKER e DOENHOFF, 1998; PONTES et al., 2003; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2009; CAVALCANTI et al., 2013) em que podem ser combinados com análises coproscópicas para uma estimativa mais real da prevalência de casos (GONÇALVES et al., 2006; FROTA et al., 2011) e na avaliação de estratégias de erradicação e controle da doença (CAVALCANTI et al., 2013).

Alternativa com expressiva sensibilidade e elevado custo operacional, a amplificação do DNA pela reação de polimerase em cadeia (PCR) pode ser aplicada em amostras de fezes e também de soro, principalmente quando o padrão de oviposição apresenta-se inferior ao limite de detecção do KK (PONTES, DIAS-NETO e RABELLO, 2002; PONTES et al., 2003). Além disso, métodos histopatológicos, como a biópsia retal e hepática, ampliam a diversidade de ferramentas laboratoriais disponíveis, que pelo seu caráter invasivo, se restringem aos casos de difícil diagnóstico (HAMILTON, KLINKER e DOENHOFF, 1998; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2009).

1.3 ABORDAGEM FARMACOLÓGICA NA ESQUISTOSSOMOSE

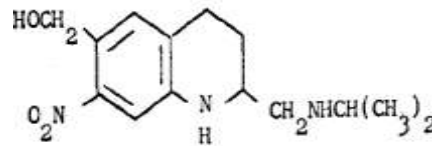
Historicamente, as intervenções que contribuam para a redução da morbidade e o risco de transmissão da esquistossomose são direcionados a ambos hospedeiros. Neste sentido, os programas de tratamento em massa em áreas endêmicas com fármacos seguros, eficazes e de baixo custo são amplamente recomendados pela OMS, juntamente com as medidas de saneamento básico e educação em saúde, além do controle malacológico do hospedeiro invertebrado através de moluscidas e/ou competição biológica (GRYSEELS et al., 2006; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2013a).

No início do século 20, tártaro emético (CHRISTOPHERSON, 1918) e outros derivados antimoniais compuseram a primeira classe terapêutica efetiva na quimioterapia da esquistossomose. Estes compostos eram administrados por via

parenteral e não raro, exibiam pronunciada toxicidade, como por exemplo, a fragmentação da fibra muscular (*fragmentatio cordis*) observada em muitos casos de morte súbita (CIOLI, PICA-MATTOCCIA e ARCHER, 1995; COURA e CONCEIÇÃO, 2010). Após o fim da Segunda Guerra Mundial, alguns pesquisadores retomaram a busca por esquistossomicidas mais seguros e ativos por via oral, culminando com a inserção da lucantona na prática clínica em 1948. Durante as décadas de 60 e 70, uma variedade de outros compostos foi introduzida para o uso clínico de maneira promissora, entre eles a oxamniquina e o praziquantel, os quais figuram o tratamento da esquistossomose até os dias atuais (CIOLI, PICA-MATTOCCIA e ARCHER, 1995).

A oxamniquina (OXM – Figura 4) é um metabólito derivado da série de compostos 2-aminometiltetrahydroquinolina ativo por via oral e parenteral. Em doses terapêuticas, exibe pouca ou nenhuma atividade contra as espécies *S. japonicum* e *S. haematobium*, sendo eficaz apenas na infecção por *S. mansoni* (FOSTER e CHEETHAM, 1973; COLES, 2002). Embora possa tratar qualquer fase da doença, os parasitos manifestam diferenças na suscetibilidade ao fármaco, sendo esta maior para as formas adultas e na primeira semana pós-infecção (SABAH et al., 1986), bem como, para o verme do sexo masculino (FOSTER e CHEETHAM, 1973; WHO, 1985). Inicialmente o mecanismo de ação proposto – de forma similar a hicantona - relacionava-se à propriedade anticolinérgica do fármaco (HILLMAN, GIBLER e CHU, 1976; TOMOSKY-SYKES e BUEDING, 1977; HILLMAN, SENFT e GIBLER, 1978), a qual conduziria o aumento da atividade motora do verme com prejuízo ao peristaltismo e à nutrição (CIOLI, PICA-MATTOCCIA e ARCHER, 1993). Esta hipótese foi refutada quando se observou que vermes resistentes expostos ao fármaco exibiam alterações motoras, sem obrigatoriamente evoluírem para um desfecho fatal (TOMOSKY-SYKES e BUEDING, 1977; CIOLI, PICA-MATTOCCIA e ARCHER, 1995). Posteriormente, a OXM foi evidenciada como um pró-fármaco, que no interior do verme é convertida enzimaticamente a um agente alquilante capaz de se ligar irreversivelmente ao DNA e demais macromoléculas essenciais (PICA-MATTOCCIA e CIOLI, 1985). A este respeito, poder-se-ia atribuir o nível de atividade da enzima envolvida na conversão do pró-fármaco à ocorrência de tolerância estágio e/ou sexo dependente e à existência de cepas com menor suscetibilidade à OXM (CIOLI, PICA-MATTOCCIA e ARCHER, 1993).

Figura 4 – Estrutura química da Oxamniquina.



Fonte: FOSTER e CHEETHAM, 1977.

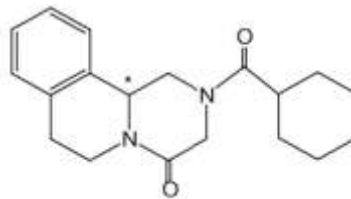
Seu emprego pode ocorrer tanto no estágio agudo quanto na fase hepatoesplênica crônica da doença, com esquemas de dose única ou divididas em duas administrações no decorrer de um dia. Apresenta-se em cápsulas e em suspensão oral, sendo este último um recurso importante em pediatria (KATZ e COELHO, 2008). Os efeitos colaterais geralmente são leves e de curta duração, sendo comum os distúrbios menores relacionados ao sistema nervoso central, tais como tontura, sonolência e cefaléia, bem como, desconforto abdominal, vômito e diarreia (WHO, 1985).

O praziquantel (PZQ – Figura 5) consiste em um derivado pirazinoquinoleico com amplo espectro de ação antiparasitária, sendo útil em diversas infecções por trematódeos e cestódeos (KUMAR e GRYSEELS, 1994; WATSON, 2009). Na quimioterapia da esquistossomose, atua de forma eficaz contra todas as espécies do gênero *Schistosoma spp.*, característica que aliada ao baixo custo, relativa segurança – inclusive para gestantes e lactantes - e administração em dose única, tornaram-no o fármaco de primeira escolha contra a infecção, o qual é amplamente utilizado em programas de tratamento em massa (ANDREWS, 1985; ALLEN et al., 2002). Os eventos adversos mais comuns são relacionados ao trato gastrointestinal, tais como, desconforto abdominal, náuseas, vômitos, anorexia e diarreia.

Embora seja comercializado sob a forma de uma mistura racêmica, apenas o estereoisômero “levo” é ativo (ANDREWS, 1985; XIAO et al., 1999), o que sugere uma ação farmacológica alvo específica, a qual não está completamente elucidada (RIBEIRO et al., 2004; ARAGON et al., 2009). A exposição *in vitro* ao fármaco induz um rápido influxo de cálcio através do tegumento, produzindo contração muscular e subsequente paralisia total (ANDREWS, 1985; REDMAN et al., 1996). A formação de vesículas tegumentares também constitui um evento primário (ANDREWS, 1985; HARNETT, 1988; OLIVEIRA et al., 2006), o qual parece ser dependente da

concentração de cálcio no meio extracelular, diferentemente da penetração do PZQ no parasito, que pode ocorrer na ausência de cálcio e sem dano detectável no tegumento do verme (XIAO, CATTO e WEBSTER, 1985). Em 1997, Cunha e Noel descartaram a hipótese de que no mecanismo molecular do PZQ pudessem estar envolvidas as ATPases responsáveis pela extrusão do cálcio.

Figura 5 – Estrutura química do Praziquantel.



Fonte: Adaptado de CAFREY, 2007.

Em infecções experimentais, a eficácia do PZQ varia conforme o estágio de vida do verme, sendo esta menor para as formas jovens de 3 a 4 semanas em comparação às formas adultas de 6 a 7 semanas, bem como, àquelas existentes nas duas primeiras semanas pós-infecção (SABAH et al., 1986; BRINDLEY, 1994; PICA-MATTOCCIA e CIOLI, 2004; ARAGON et al., 2009). Xiao, Catto e Webster (1985) evidenciaram a ocorrência desta resistência *in vitro* e sugeriram uma boa correlação com a propriedade do fármaco em induzir dano tegumentar. Em relação ao sexo, as fêmeas são menos sensíveis do que os machos (ANDREWS, 1985; BRINDLEY e SHER, 1990). Ademais, dados *in vitro* e *in vivo* demonstraram que independente do sexo, vermes envolvidos em infecções unissexuais de sete semanas são mais refratários ao tratamento do que aqueles existentes em infecções bissexuais de mesmo período, sendo ainda a refratariedade da infecção unissexual feminina superior a da masculina (PICA-MATTOCCIA e CIOLI, 2004).

Alguns estudos sugerem uma relação sinérgica entre a eficácia do PZQ e a integridade da resposta imune do hospedeiro, decorrente a exposição de antígenos induzida indiretamente pelo fármaco (SABAH et al., 1985; BRINDLEY e SHER, 1990). Em modelo murino, Doenhff et al. (1987) demonstraram que nos estágios em que o *S. mansoni* é menos suscetível ao PZQ, a combinação da quimioterapia com anti-soro de coelho (produzido a partir de antígenos superficiais do verme adulto) alcança maiores taxas de cura se comparado ao emprego do fármaco isolado.

Ainda, Ribeiro et al. (2004) encontraram uma associação sinérgica entre a imunidade específica contra *S. mansoni* - induzida frente a reinfeção - e o tratamento com doses subterapêuticas de PZQ, particularmente na fase pulmonar do parasito se comparada à fase dérmica.

De modo geral, o PZQ alcança altas taxas de cura na infecção por *S. mansoni* com esquemas de dose única, variando entre 60 a 95% nos levantamentos epidemiológicos (STELMA et al., 1997; ERKO et al., 2012). No entanto, alguns relatos existentes na literatura (STELMA et al., 1995; ISMAIL et al., 1999; WILLIAM et al., 2001; LAWN, LUCAS e CHIODINI, 2003) apontam para a emergência de cepas resistentes ao tratamento, o que pode vir a comprometer o controle da doença a nível mundial se novos fármacos não forem introduzidos para uso clínico.

Além de ser limitada, a quimioterapia, a priori, é direcionada ao controle da morbidade, sem influenciar diretamente os níveis de transmissão ou de reinfeção. O desenvolvimento de uma vacina eficaz beneficiaria este cenário, através do potencial em controlar a reinfeção que lhe é próprio (KATZ, 2003; EL RIDI e TALLIMA, 2013). Em 2012, uma iniciativa público-privada alcançou resultados satisfatórios no estudo clínico de fase I relativo à vacina esquistossomicida para *S. mansoni* (INSTITUTO OSWALDO CRUZ, 2012) - derivada do antígeno recombinante Sm14 relacionado à incorporação de lipídeos pelo parasito - a qual, no âmbito veterinário, demonstrou a vantagem de induzir reação cruzada contra diferentes espécies de trematódeos, cestódeos e nematódeos, com destaque para *Fasciola hepática* (ALMEIDA et al., 2003; TENDLER e SIMPSON, 2008). No entanto, este estudo clínico permanece em andamento e nenhuma outra vacina está disponível atualmente.

1.4 PRODUTOS NATURAIS COMO FONTE DE NOVOS FÁRMACOS ESQUISTOSSOMICIDAS

Desde a antiguidade, o ser humano tem recorrido aos recursos naturais na tentativa de aliviar ou curar enfermidades que desafiam o cotidiano das civilizações. Neste contexto, a notória diversidade química dos produtos naturais – ou metabólitos

bioativos oriundos de organismos vivos – contribuiu para revelar novos fármacos e protótipos, que juntos representam mais de 50% do arsenal terapêutico atualmente existente, e ainda hoje permanece sob o foco de muitas investigações científicas (BALUNAS e KINGHORN, 2005; GURIB-FAKIM, 2006; VALLI et al., 2013). Entre as mais de 250.000 plantas superiores existentes estima-se que aproximadamente 20 mil espécies são utilizadas na medicina tradicional, permanecendo o restante como fontes potenciais inexploradas quanto as suas propriedades farmacológicas (PHILLIPSON, 1994).

No âmbito das doenças parasitárias, a descoberta do alcaloide *quinina* a partir das cascas da *Cinchona succiruba* (Rubiaceae) no século XVI (KLAYMAN, 1985) e seu desdobramento como uma potente droga antimalárica, revelou a potencialidade das fontes naturais para obtenção de novos antiparasitários (KAYSER, KIDERLEN e CROFT, 2003). Mais tarde, a constatação da eficácia clínica da Artemisinina como antimalárico reforçou o indício de que o reino *Plantae* poderia ser explorado na descoberta de fármacos para o tratamento das diversas protozooses e helmintoses (PHILLIPSON, 1994), incluindo a esquistossomose.

Nas últimas duas décadas, muitos extratos e/ou substâncias majoritárias foram testadas contra adultos de *Schistosoma mansoni* com intuito de incrementar o limitado arsenal terapêutico de drogas esquistossomicidas. Alguns dos resultados promissores estão relacionados no Quadro 1. Em 2001, uma preparação comercial de Mirra – resina extraída das árvores de *Comiphora molmol* (Burseraceae) - denominada Mirazid foi introduzida no mercado egípcio para o tratamento de esquistossomose. Além do fraco efeito esquistossomicida constatado em alguns modelos experimentais (BOTROS et al., 2004; LOTFY et al., 2013), uma pesquisa clínica revelou baixos níveis de cura para crianças em idade escolar recebendo Mirazid se comparado àquelas que receberam o PZQ – 9,1% contra 62,5%, respectivamente -, tornando questionável o valor deste novo tratamento (BOTROS et al., 2005).

Quadro 1 - Relação de alguns resultados promissores relativos a substâncias e ou extratos testados como drogas esquistossomicidas.

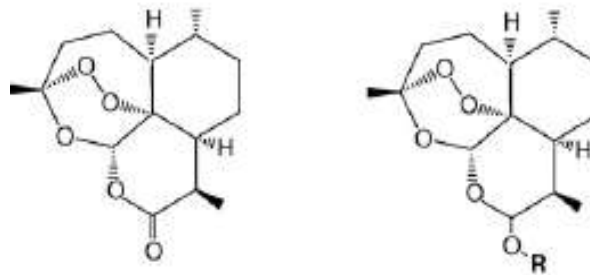
SUBSTÂNCIA E/OU EXTRATO	ATIVIDADES	REFERÊNCIA
Piplartina (<i>Piper tuberculatum</i>)	<i>In vitro</i> – esquistossômulos e vermes adultos	MORAES et al., 2011; 2012
Óleo essencial de <i>Ageratum conyzoides</i>	<i>In vitro</i> – vermes adultos	MELO et al., 2011
Óleo essencial das folhas de <i>Baccharis</i> <i>dracunculifolia</i>	<i>In vitro</i> – vermes adultos	PARREIRA et al., 2010
Óleo essencial Plectranthus neochilus	<i>In vitro</i> – vermes adultos	CAIXETA et al., 2011
<i>Allium cepa</i> e <i>Allium</i> <i>Sativum</i> em pó	<i>In vitro</i> – miracídios, cercárias, esquistossômulos e vermes adultos. <i>In vivo</i> – verme adulto	MANTAWY, ALI e RIZK, 2011; MANTAWY et al., 2012
Óleo essencial das folhas de <i>Baccharis</i> <i>trimera</i>	<i>In vitro</i> – vermes adultos e esquistossômulos	DE OLIVEIRA et al., 2012
Extrato em diclorometano e fração aquosa de <i>Baccharis</i> <i>trimera</i>	<i>In vitro</i> - vermes adultos <i>In vivo</i> – esquistossômulos e vermes jovens e adultos	DE OLIVEIRA et al., 2014
2-hidroxicrisofanol e kwanzoquinona E de <i>Hemerocallis fulva</i>	<i>In vitro</i> - cercárias	CICHEWICZ, MCKERROW e NAIR, 2002

Fonte: Elaboração própria.

A artemisinina (Figura 6) consiste em uma lactona sesquiterpênica obtida das folhas de *Artemisia annua* (Compositae) ou *qinghao*, que exibe potente atividade contra espécies de *Plasmodium spp.*, servindo como protótipo para derivados antimaláricos semissintéticos tais como Artemeter (ART - Figura 6), Artesunato (Figura 6) e Diidroartemisinina (KLAYMAN, 1985). Perante a manifestação de atividade esquistossomicida do ART contra *S. japonicum* (LE et al., 1982), tal substância foi desafiada em ensaios *in vitro* e *in vivo* contra *S. mansoni*, demonstrando modesto efeito contra as formas adultas do verme. Por outro lado, a droga exibia notória atividade contra as formas jovens de 2 a 3 semanas (XIAO e CATTO, 1989), constatação que se manteve em estudos posteriores (ARAÚJO, KOHN e KATZ, 1991; UTZINGER et al., 2001a; HAMZA, METWALY e EL-MAATY, 2012) utilizando diferentes cepas (EL-BESHBISHI et al., 2013) e outro derivado

como o Artesunato - embora tenha sido menos efetivo que o ART (UTZINGER et al., 2002). Além disso, maior atividade contra fêmeas adultas (UTZINGER et al., 2001a), deformações reversíveis no sistema reprodutor de ambos os sexos (XIAO e CATTO, 1989), alterações no oograma (ARAÚJO, KOHN e KATZ, 1991) e dano ao tegumento (XIAO et al., 2000a; FREZZA et al., 2013), em especial para os esquistossômulos (XIAO et al., 2000a), foram descritos.

Figura 6 – Artemisinina e seus derivados.



Fonte: Adaptado de CAFREY, 2007. À esquerda estrutura química da Artemisinina e à direita núcleo fundamental das estruturas Artemeter e Artesunato quando o grupo R for igual a CH_3 e $\text{CO}(\text{CH}_2)_2\text{COOH}$, respectivamente.

O preciso mecanismo de ação destes derivados é desconhecido e tem sido especulada a luz da redução do conteúdo de glicogênio (UTZINGER et al., 2003) e da formação de ligações covalentes com macromoléculas após a ativação radicalar da ponte de endoperóxido pela interação com o ferro consumido pelo verme (XIAO et al., 2001; BOISSIER et al., 2009).

A evidência de maior suscetibilidade dos esquistossômulos ao ART, podendo bloquear o estabelecimento do verme adulto, propiciou a condução de estudos experimentais (XIAO et al., 2000b) e clínicos (UTZINGER et al., 2000) a fim de avaliar o efeito do fármaco na prevenção da infecção. De fato, ambos os estudos revelaram atividade profilática promissora, especialmente no último, em que a droga foi capaz de prevenir a reinfecção após cura parasitológica com PZQ (XIAO et al., 2000a). Neste ponto, vale ressaltar que o termo profilaxia deve ser utilizado em seu sentido mais amplo, visto que uma quimioprofilaxia verdadeira para a esquistossomose envolveria um impedimento no nível da penetração da cercaria (EL-BESHBISHI et al., 2013).

Na medida em que ART e PZQ atuam em estágios de desenvolvimento distintos do parasito (SABAH et al., 1986; XIAO e CATTO, 1989; ARAÚJO, KOHN e

KATZ, 1991; UTZINGER et al., 2001a; 2002), um efeito aditivo é esperado na combinação de ambos os fármacos, o que foi demonstrado em um modelo experimental (UTZINGER et al., 2001a), sendo amplamente discutida como ferramenta adicional ao controle da esquistossomose em áreas não endêmicas para malária (UTZINGER et al., 2003; EL-BESHBISHI et al., 2013).

1.5 CARACTERIZAÇÃO DA LICOCHALCONA A

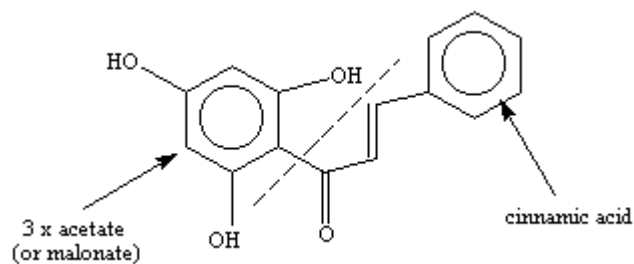
A família *Fabaceae* ou *Leguminosae* figura entre as maiores fontes de plantas medicinais, dentre os seus 751 gêneros catalogados (GAO et al., 2010; LEGUME PHYLOGENY WORKING GROUP, 2013a). Possui distribuição cosmopolita, sendo abundante em regiões temperadas, tropicais e subtropicais (HEGNAUER e GRAYER-BARKMEIJ, 1993). Constitui a terceira maior família das angiospermas, sendo que a partir das características morfológicas das suas inflorescências se reconhecem tradicionalmente três subfamílias: *Papilionoideae*, *Caesalpinioideae* e *Mimosoideae* (KASS e WINK, 1996; WINK e MOHAMED, 2003). No entanto, o consenso em relação à taxonomia destas subfamílias permanece controverso e perspectivas recentes direcionam para um novo sistema de classificação (LEGUME PHYLOGENY WORKING GROUP, 2013b).

Dos 478 gêneros que representam a subfamília *Papilionoideae* (LEGUME PHYLOGENY WORKING GROUP, 2013a), *Glycyrrhiza spp.* – conhecido popularmente como alcaçuz - destaca-se pelo emprego secular na medicina tradicional chinesa (DAO et al., 2011). O gênero é composto por aproximadamente 30 espécies, sendo que as espécies *G. glabra*, *G. uralensis* e *G. inflata* são oficialmente utilizadas como alcaçuz segundo a Farmacopeia Chinesa (CHEN et al., 1993; DAO et al., 2011; TAO et al., 2013). As raízes e ou rizomas de *Glycyrrhiza spp.* são as partes destinadas ao uso terapêutico e não podem ser diferenciadas morfológicamente entre as espécies (TAO et al., 2013).

Em relação ao perfil fitoquímico, os principais metabólitos secundários do alcaçuz são as saponinas triterpênicas (ASL e HOSSEINZADEH, 2008) e compostos flavonoídicos (OKURA, 1999). Os flavonóides constituem metabólitos secundários

amplamente dispersos na natureza, apresentando-se quimicamente como estruturas (poli) fenólicas, as quais são produtos de biossíntese mista entre as vias do chiquimato – uma unidade iniciadora fenilpropanoídica (para-cinamoil Coenzima A) - e do acetato-malonato – três unidades extensoras de malonil-CoA. Dentre os vários subgrupos dos flavonóides, as chalconas são as primeiras estruturas formadas, constituindo os precursores diretos dos demais derivados flavonoídicos (DEWICK, 2002; IBRAHIM e ANZELLOTTI, 2003, p. 1 - 36; ZUANAZZI e MONTANHA, 2004, p. 577-614). A figura 7 exhibe o núcleo fundamental de uma chalcona.

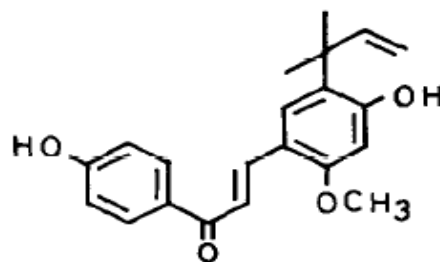
Figura 7 – Esqueleto básico de uma chalcona.



Fonte: <http://acd.ufrj.br/~tbocl/tbocl-f-chalcona.php>. Acesso em: 27 out 2013.

Em 1975, Saitoh e Shibata isolaram a chalcona licochalcona A (Figura 8), presumivelmente de uma variedade de *Glycyrrhiza glabra* (Fabaceae), juntamente com a licochalcona B e equinantina. Nesta ocasião, os pesquisadores denotaram que tais substâncias continham os anéis A e B em um padrão de oxigenação reverso ao das chalconas até então conhecidas, sugerindo uma nova via biossintética para estes flavonóides - na qual o anel A deriva do Cinamoil CoA e o anel B, do Malonil CoA. Assim, os termos “retroflavonóide” e “retrochalcona” foram então introduzidos para designar os derivados dessa via em potencial (SAITOH e SHIBATA, 1975).

Figura 8 – Estrutura da Licochalcona A.



Fonte: SAITOH; SHIBATA e SANKAWA, 1975. À direita o anel B e à esquerda o anel A.

Embora seja considerado marcador quimiotaxonômico da espécie *G. inflata* (Figura 9) (HATANO et al., 1991; KAJIYAMA et al., 1992; NIELSEN et al., 1995; NAGAI et al., 2007), a licochalcona A pode ser extraída de *G. glabra* (SAITOH e SHIBATA, 1975; FENWICK, LUTOMSKI e NIEMAN, 1990) e *G. uralensis* (WON et al., 2007; LEE et al., 2010; ZHANG et al., 2011). A licochalcona A exibe atividades biológicas diversas e algumas estão relacionadas no Quadro 2.

Quadro 2 - Relação de algumas atividades biológicas descritas para a Licochalcona A.

ATIVIDADES DA LICOCHALCONA A	REFERÊNCIAS
✓ Efeito antiangiogênico	KIM et al., 2010.
✓ Antioxidante e captação de radicais livres	HATANO et al., 1988; VAYA, BELINKY e AVIRAM, 1997; HARAGUCHI et al., 1998a.
✓ Antibacteriano contra <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Micrococcus luteus</i>, <i>Helicobacter pilory</i> e bactérias formadoras de esporos.	HARAGUCHI et al., 1998b; FUKAI et al., 2002 eTSUKIYAMA et al., 2002.
✓ Antifúngico para <i>Candida albicans</i>	MESSIER e GRENIER, 2011.
✓ Anti-inflamatório	FURUHASHI et al., 2005; CUI et al., 2008; FUNAKOSHI-TAGO et al., 2009a; 2009b; FURUSAWA et al., 2009a; 2009b; CHU et al., 2012.
✓ Inibidor da formação de osteoclastos e reabsorção óssea	KIM et al., 2008.
✓ Antitumoral para diversas linhagens de células carcinomatosas	FU et al., 2004; YOON, KANG e CHEON, 2007; FUNAKOSHI-TAGO et al., 2008; LEE et al., 2008; YO et al., 2009; XIAO et al., 2011; YUAN et al., 2013.
✓ Inibidor da proteína tirosina fosfatase com benefício a sensibilidade tecidual a insulina	YOON et al., 2009.
✓ Imunomodulador	BARFORD et al., 2002; TANIFUJI et al., 2010; FONTES et al., 2014.
✓ Antiproliferativo de células vasculares do músculo liso	PARK et al., 2008.
✓ Antiespasmódico	NAGAI et al., 2007.
✓ Inibidor da tirosinase	FU et al., 2005.
✓ Efeito sobre a acumulação de lipídeos no fígado	QUAN et al., 2013.
✓ Anti-obesidade	WON et al., 2007; QUAN, BAEK e CHUNG, 2012.

Fonte: Elaboração própria.

Figura 9 – Parte área do vegetal que constitui a fonte primária para obtenção de Licochalcona A: *Glycyrrhiza inflata*.



Fonte: <http://www.chemfaces.com/direct/Glycyrrhiza-inflata-Batalin-20177.html>. Acesso em: 27 out 2013.

Dentre as doenças parasitárias, a Licochalcona A exibe atividade antiprotozoária para espécies de *Leishmania spp.* e *Plasmodium spp.* (KAYSER, KIDERLEN e CROFT, 2003; LIU et al., 2003). Chen et al. (1993) demonstraram *in vitro* que tal substância inibe a absorção de timidina tritiada a partir do meio, com prejuízo ao crescimento e viabilidade das formas promastigotas e amastigotas das espécies *Leishmania major* e *L. donovani*. As formas amastigotas foram mais sensíveis que as promastigotas, sendo que para estas últimas houve inibição total na concentração de 5,0 µg/mL. Em roedores, a licochalcona A foi capaz de reduzir a carga parasitária de *L. donovani* e de prevenir lesões induzidas por *L. major* (CHEN et al., 1994a). Mais tarde, o efeito da substância (ZHAI et al., 1995) e de seus derivados sintéticos (ZHAI et al., 2009) pôde ser correlacionado a inibição de desidrogenases presentes na mitocôndria dos parasitos.

Chen et al. (1994b) evidenciaram a inibição do desenvolvimento de cepas de *Plasmodium falciparum* sensíveis e resistentes à cloroquina *in vitro*, nos diversos estágios do ciclo sanguíneo do parasito, além da redução da parasitemia e proteção contra um desfecho fatal para camundongos infectados pela espécie *P. yoelii*.

Paralelamente a atividade antiplasmódica, Ziegler et al. (2004) denotaram uma deformação dos eritrócitos (equinócitos) *in vitro* e *in vivo*, independente destes estarem parasitados, e sugeriram que a atividade antiplasmódica poderia ser consequência da alteração na integridade de célula hospedeira. No entanto, alguns estudos sugerem que o mecanismo de ação da licochalcona A e de seus derivados sintéticos seja reflexo da sua interferência na degradação de hemoglobina pelo parasito (TADIGOPPULA et al., 2013).

Em estudo recente (CARVALHO, 2013), a atividade do extrato bruto de raízes de *G. inflata* foi avaliada contra vermes adultos da cepa LE/BH de *S. mansoni*, bem como, a de duas chalconas isoladas e elucidadas deste material. Semelhante ao controle positivo de praziquantel a 10 μ M – capaz de matar 100% dos vermes após um dia de incubação -, o extrato bruto (200 μ g/mL) apresentou expressiva atividade esquistossomicida *in vitro* após 24 horas e boa correlação com atividade testada a partir da licochalcona A isolada (100 μ M). De fato, a outra chalcona isolada – equinantina – foi pouca ativa na concentração de 100 μ M, havendo prosseguimento dos testes nas concentrações de 5, 10, 25 e 50 μ M apenas para a licochalcona A. Por conseguinte, a partir de 25 μ M de Licochalcona A pôde-se perceber a morte de 100% dos parasitos em um período de 24 horas de incubação, sendo que na concentração de 10 μ M isso só foi possível após 96 horas, além de terem sido observadas redução da motilidade e alterações tegumentares significativas a partir de 72 horas de incubação. Ainda, a partir da exposição à 5 μ M, o tempo de incubação total (120 horas) pôde ser concluído exclusivamente com a observação de leve redução na atividade motora.

De acordo com o exposto, a Licochalcona A apresentou-se como uma droga potencialmente promissora no tratamento da esquistossomose, sendo objeto do presente estudo.

1.6 CARACTERIZAÇÃO DAS ISOFORMAS DA ATP DIFOSFOHIDROLASE EM *SCHISTOSOMA MANSONI*

Os primeiros relatos da capacidade hidrolítica do extrato de batata sobre o ATP com liberação de dois equivalentes ortofosfato renderam a caracterização de uma nova classe de enzimas – denominadas apirases – cujo potencial terapêutico tem sido extensivamente estudado nos últimos anos (KALCAR, 1944; MOLNAR e LORAND, 1961; TRAVERSO-CORI; TRAVERSO; REYES, 1970; FARIA-PINTO et al., 2006; VASCONCELOS et al., 2009). As apirases (ATP difosfohidrolases ou ATPDases - 3.6.1.5) exibem distribuição cosmopolita dentre os diversos reinos existentes e caracterizam-se pela habilidade de hidrolisar nucleotídeos tri e difosfatados em seus derivados monofosfatados na presença de íons metálicos bivalentes, com ampla especificidade de substratos (TRAVERSO-CORI, TRAVERSO; REYES, 1970; VASCONCELOS et al., 1993).

O alinhamento das sequências primárias de aminoácidos desta família de enzimas permitiu identificar cinco domínios altamente conservados entre seus membros, as chamadas regiões conservadas da apirase ou ACRs, com relevância para o ciclo catalítico. Tais membros são normalmente nomeados de acordo com o organismo de origem: ATPDases ou NTPases (Nucleosídeos Trifosfato Hidrolases) em parasitos, NTPDases (Nucleosídeos Trifosfato Difosfohidrolases) em mamíferos e apirases em plantas (HANDA e GUIDOTTI, 1996; VANCONCELOS et al., 1996; 2009). Em mamíferos, oito isoformas com diferenças em suas propriedades funcionais e localização celular foram caracterizadas: NTPDases 1, 2, 3 e 8 - proteínas de superfície celular com o sítio catalítico voltado ao meio extracelular; NTPDases 4 e 7 - compõem a superfície de organelas citoplasmáticas, com a face catalítica voltada para o lúmen das mesmas; e, NTPDases 5 e 6 - presentes no meio intracelular e sujeitas à clivagem para a forma solúvel (GENDRON et al., 2002; ROBSON, SEVIGNY e ZIMMERMANN, 2006).

Em 1993, Vasconcelos et al. denotaram a atividade ATP difosfohidrolásica na superfície externa de exemplares adultos de *S. mansoni*, especulando sua possível contribuição para os mecanismos de evasão do parasito à reação imunológica do hospedeiro, sobretudo à ação citotóxica de plaquetas e linfócitos.

Evidências posteriores (VASCONCELOS et al., 1996; FARIA-PINTO et al., 2004) caracterizaram a existência de duas isoformas - SmATPDase 1 e SmATPDase 2 - no tegumento do verme adulto e em homogeneizados de ovos, enzimas com massa de aproximadamente 63kDa que diferem em suas eficiências catalíticas e na solubilidade e sensibilidade a detergentes não iônicos; e que, além disso, apresentam franca reatividade cruzada com anticorpos policlonais anti-apirase de batata. Ambas isoformas estão presentes em todos os estágios do ciclo de vida do parasito com padrões distintos de expressão e localização subcelular (DEMARCO et al., 2003; LEVANO-GARCIA et al., 2007). A SmATPDase 1 possui duas regiões transmembrana e uma elevada similaridade com a NTPDase 1 de mamíferos (DEMARCO et al., 2003). Por outro lado, a SmATPDase 2 detém apenas uma região transmembrana, e semelhante ao que ocorre com as NTPDases 5 e 6 solúveis de mamíferos, parece estar sujeita a um processo de proteólise pós-traducional para originar uma proteína secretada com cerca de 55kDa (LEVANO-GARCIA et al., 2007).

Ensaio *in vivo* (FARIA-PINTO et al., 2006) demonstraram que os anticorpos policlonais anti-apirase de batata são capazes de reconhecer seletivamente as SmATPDases em um ambiente em que as NTPDases do hospedeiro normalmente coexistem, sugerindo que não há formação de auto-anticorpos na imunização com a apirase. Esta última apresenta ainda homologia estrutural com as isoformas da SmATPDase - notadamente a SmATPDase 2 - e é capaz de incitar uma reação antígeno-anticorpo com IgG humanas de pacientes esquistossomóticos, sugerindo que os epítomos compartilhados por estas enzimas são antigênicos e podem ser explorados para fins de imunização (FARIA-PINTO et al., 2008) e/ou estudos epidemiológicos em populações cronicamente infectadas (FARIA-PINTO et al., 2010). Ademais, embora o papel das SmATPDases não esteja totalmente elucidado, sua possível contribuição no metabolismo de moléculas associadas ao dano, como o ATP, fortalece a crença de que estas sejam alvos promissores para a descoberta de novos fármacos esquistossomicidas (BHARDWAJ e SKELLY, 2009).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Partindo-se dos resultados preliminares *in vitro* que indicam uma promissora atividade esquistossomicida do composto Licochalcona A, o presente trabalho tem como objetivos gerais avaliar a atividade da esquistossomicida *in vivo* em um modelo murino e obter mais informações sobre o comportamento da droga *in vitro*.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Os objetivos específicos do trabalho são:

- ✓ Comparar o efeito das drogas administradas sobre a redução da carga parasitária; as variações do peso hepático e esplênico e a repercussões na leucometria global dos animais.
- ✓ Atestar se houve interferência na cinética de oviposição através da confecção de um oograma qualitativo entre os grupos que receberam as intervenções;
- ✓ Avaliar se a atividade esquistossomicida *in vitro* da Licochalcona A preliminarmente comprovada relaciona-se com os efeitos sobre a homeostase do sistema excretor do parasito e/ou sobre a inibição das ATP difosfohidrolases presentes no homogeneizado de vermes adultos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 OBTENÇÃO DA LICOCHALCONA A

Licochalcona A (LicoA) purificada do extrato seco em pó das raízes de *Glycyrrhiza inflata* foi gentilmente cedida pelo Núcleo de Identificação e Pesquisa de Princípios Ativos Naturais – NIPPAN, da Faculdade de Farmácia, na Universidade Federal de Juiz de Fora, coordenado pelo professor Doutor Ademar Alves Da Silva Filho.

3.2 INFECÇÃO E CICLO

Camundongos albinos fêmeas da linhagem não isogênica Swiss, obtidos do Centro de Biologia da Reprodução - UFJF com cerca de 56 dias de nascido e com peso variando entre 35 - 50g, foram submetidos a uma infecção bissexual por via subcutânea segundo a técnica descrita por Barbosa et al. (1978) com aproximadamente 50 cercárias/animal da cepa LE (de Belo Horizonte – MG). Tal cepa é mantida no Laboratório de Esquistossomose do Centro de Pesquisas René Rachou Fiocruz/MG, através da passagem seriada em moluscos *Biomphalaria glabrata*, o hospedeiro invertebrado, e em camundongos da linhagem Swiss como hospedeiro definitivo mamífero. As condições de acesso à ração e água foram mantidas *ad libitum*. Ao final de 50 dias pós-infecção, os animais foram sacrificados por aprofundamento de anestesia (Ketamina + Xilazina) e perfundidos para recuperação de vermes adultos do sistema porta-hepático, adaptado da técnica descrita por Pellegrino e Siqueira (1956).

3.3 ENSAIOS *IN VITRO*

Vermes recuperados assepticamente após a perfusão foram mantidos em meio estéril RPMI (Roswell Park Memorial Institut) 1640 (Invitrogen) até serem submetidos aos ensaios esquistossomicidas *in vitro*. Nestes ensaios, três casais de parasitos, previamente lavados em média 5 vezes com meio RPMI + antibióticos para remoção de detritos, foram colocados em placas de petri estéreis (2 X 15cm) contendo meio RPMI a 37°C, suplementado com penicilina cristalina G (1000 UI/mL), estreptomicina (1000 µg/mL) e 10% de soro bovino fetal. Os parasitos foram reunidos usando uma pipeta de 250µL e separados em grupos experimentais para cultivo em placa de 12 poços estéril, contendo 2 mL de meio RPMI 1640 em cada poço e incubados em atmosfera de CO₂ 5%. As amostras de LicoA foram dissolvidas em dimetilsulfóxido (DMSO) a 10% em água e diluídas em meio RPMI 1640 para uma concentração final de 50µM e 100µM. Cada grupo experimental recebeu três pares de verme, sendo denominados segundo a intervenção existente, a saber: LicoA 100 µM, LicoA 50µM, Controle DMSO 1% (onde os pares de parasitos foram cultivados em meio RPMI 1640 na presença de DMSO 1%) e Controle (contendo apenas meio RPMI 1640). Após 24 horas de incubação, os parasitos foram observados quanto aos sinais de viabilidade (motilidade corporal e das ventosas, pareamento e lesões tegumentares e morte), bem como, à produção de ovos, com o auxílio de microscópio de luz invertida (LABOMED), sendo as alterações relatadas. Os ensaios foram realizados em triplicata. As concentrações escolhidas para o ensaio foram baseadas no trabalho anterior de Carvalho (2013).

Para avaliar o efeito da LicoA sobre o funcionamento do sistema excretor dos vermes adultos de *Schistosoma mansoni*, a marcação pela sonda fluorescente de resorufin (Sigma) foi utilizada em conjunto da microscopia de fluorescência. Desta forma, após 24 horas de incubação os grupos experimentais anteriormente mencionados foram submetidos à sonda de resorufin 350µg/mL por 30 minutos. Após este período, houve substituição por meio contendo apenas RPMI 1640 e os vermes foram avaliados a $\lambda = 532\text{nm}$ em microscópio de imunofluorescência confocal a laser (LEICA SP5), e posteriormente, fotografados.

3.4 ENSAIOS *IN VIVO*, TRATAMENTO E AVALIAÇÃO PARASITOLÓGICA DOS ANIMAIS

Os camundongos foram divididos em seis grupos (Tabela 1), incluindo um grupo controle de infecção composto por animais não tratados e um controle de tratamento, no qual os animais receberam uma por via oral uma dose única de PZQ 200mg/kg de peso. Os demais grupos receberam LicoA por via intraperitoneal (ip.), nas doses de 25mg/Kg ou 50mg/Kg de peso, em dois esquemas distintos: dose única e dose dupla, sendo este último intercalado por um período de quatorze dias. As doses de LicoA foram extrapoladas dos ensaios *in vitro* considerando o peso do animal. O tratamento foi iniciado aos 26 dias pós-infecção, aproximadamente, frente à pesagem dos animais para ajuste da dose. A suspensão de PZQ 100mg/mL foi obtida após maceração de comprimidos de Praziquantel 600mg (Farmanguinhos – Lote: 13010097 – Validade: 01/2015) em 6mL de PBS 10mM (Solução tampão fosfato com pH 7,4). Já as suspensões de Licochalcona A foram obtidas emulsionando o pó na solução de DMSO 10% em PBS para obter uma concentração final de 25mg/mL. As doses administradas foram calculadas conforme o peso individual de cada animal nos diferentes grupos.

Tabela 1 – Disposição dos animais em seis grupos experimentais e seus respectivos esquemas de tratamento. Os animais iniciaram o tratamento aos 26 dias pós-infecção e para aqueles que receberam o esquema de dose dupla, a segunda dose foi administrada após quatorze dias de intervalo da primeira

Grupo	Esquema de tratamento em mg/Kg	Via	Nº animais	Esquema de doses
Controle	Não tratado	-	8	-
Praziquantel	200	Oral	10	Única
Licochalcona	25	Ip.	6	Única
Licochalcona	25	Ip.	6	Duas
Licochalcona	50	Ip.	5	Única
Licochalcona	50	Ip.	6	Duas

Elaboração própria. Ip. = intraperitoneal.

A avaliação da ação esquistossomicida sobre os animais infectados foi realizada após 50 dias da infecção, após a eutanásia dos animais com Xilazina (~0,6 mg/animal) e Cetamina (~3,0 mg/animal). Os vermes, separados em machos, fêmeas ou casais, foram recuperados da perfusão dos camundongos tratados e

contados/agrupados conforme a localização dos mesmos (se nas veias mesentéricas ou hepáticas). Os resultados foram comparados aos obtidos no grupo controle não tratado.

3.4.1 Contagem da Leucometria Global

No dia da perfusão, os animais de cada grupo foram anestesiados e tiveram seu sangue coletado pelo plexo retro-orbital. As amostras de sangue total foram coletadas em tubos heparinizados e contadas na Câmara de Neubauer para obtenção da leucometria global. Alíquotas contendo 20 μL de sangue foram diluídas em 400 μL de líquido diluidor de Turk (Ácido acético glacial 40mL, Violeta de Genciana 1% 40 gotas e Água Destilada qsp. 1000mL) e procedeu-se o enchimento da câmara para a contagem manual das células nos quatro quadrados laterais, em microscópio óptico comum (ZEISS), no aumento de 100 vezes com condensador baixo. O somatório dos quatro quadrados foi multiplicado pelo fator 50 para obter a leucometria em leucócitos por mm^3 (μL).

3.4.2 Peso Hepático e Esplênico

Após eutanásia e perfusão, o fígado e baço de cada camundongo submetido ao regime de dose dupla de LicoA (25mg/Kg e 50mg/Kg de peso), bem como, daqueles pertencentes aos grupos controles - PZQ e não tratado - foram removidos e seus pesos determinados.

3.4.3 Oograma Qualitativo

Para avaliar os efeitos sobre a evolução dos ovos, foram realizados oogramas qualitativos com uma porção de cerca de um cm da junção ileocecal dos

animais submetidos ao tratamento e do grupo controle. A porção foi ligeiramente seca em papel absorvente e mantida pressionada entre uma lâmina e uma lamínula de vidro. Os ovos foram observados a fresco e qualitativamente avaliados quanto a maturidade sob microscópio óptico comum (aumento de 200 vezes) e posteriormente, fotografados.

3.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DA LICOCHALCONA A SOBRE AS ISOFORMAS DE ATP DIFOSFOHIDROLASE

Um homogeneizado de vermes adultos foi obtido de acordo com a técnica descrita por Vasconcelos et al. (1993). Desta forma, os vermes adultos de *S. mansoni* foram incubados por 10 min a 37° C em 10 ml de tampão TRIS (Trishidroximetilaminometano), suplementado com íons e inibidores de proteases, e submetidos à agitação em vortex por 10 segundos. Os vermes foram homogeneizados em 300 ml de Tris-HCl, pH 7,4, contendo 8% de sacarose e inibidores de proteases, com o auxílio de Potter-Elvehjem, e a concentração de proteínas das amostras foi determinada pelo método de Lowry (LOWRY et al., 1951). Alíquotas do homogeneizado contendo o equivalente a 0,05 mg de proteínas totais/mL foram incubadas durante 60 min. a 37 °C com a concentração correspondente da droga - 0,1 µM até 10 mM - em um meio de reação padrão tampão contendo MOPS 50 mM, pH 7,4, 5 mM de CaCl₂, 2 mM MgCl₂, 150 mM de NaCl, 5 mM de KCl, 1 mM de ouabaína e 10 mM NaN₃. Quantidade suficiente de substrato ATP ou ADP (concentração final 3mM) foi adicionado iniciando a reação hidrolítica, a qual foi interrompida transcorrido 60min pela adição de 0,1 N de HCl (VASCONCELOS et al., 1993). A medida de hidrólise de ATP ou ADP foi feita por meio da análise espectrofotométrica de fosfato inorgânico liberado de acordo com Taussky e Shorr (1953). As amostras de controle foram incubadas no mesmo meio sem a adição de Licochalcona A e na presença e ausência de DMSO a 2,5%, o solvente usado para dissolver a droga.

3.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

No intuito de comparar os resultados obtidos das amostras independentes, o teste de Kruskal-Wallis foi utilizado. A mediana foi calculada quando os resultados das médias não foram adequados. Os resultados são apresentados como média aritmética \pm o valor do desvio padrão, medianas e porcentagem. Valores com $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. A avaliação estatística dos resultados foi realizada através do GraphPad Prism 5®.

3.7 ASPECTOS ÉTICOS

Sob a observância dos Princípios Éticos de Experimentação Animal, a presente pesquisa foi submetida à apreciação da Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA) da Pró-reitoria de Pesquisa da Universidade Federal de Juiz de Fora, sendo aprovada em 20/03/2012 sob o Parecer nº 026/2012 (Anexo).

4 RESULTADOS

4.1 ENSAIOS *IN VITRO*

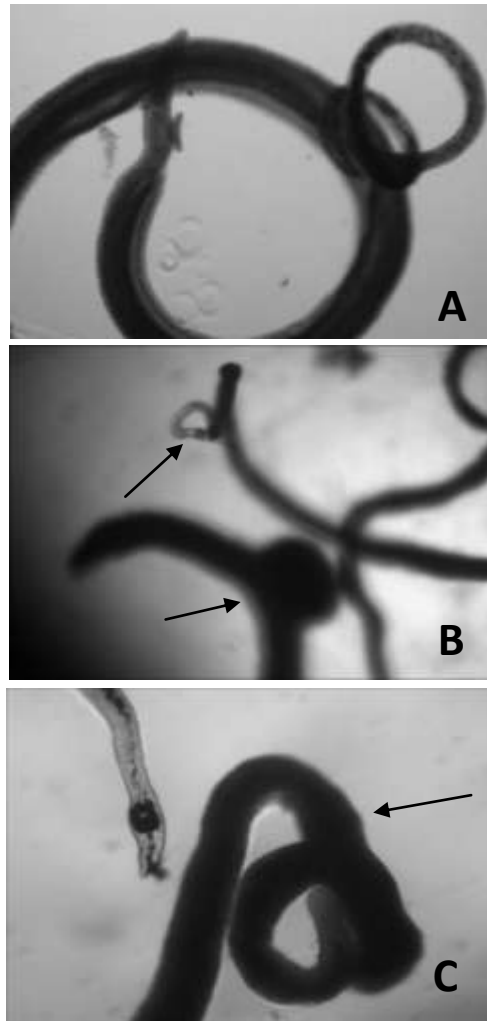
O ensaio foi conduzido com três pares de vermes adultos por poço. Os vermes utilizados estavam íntegros e com intensa atividade motora ao serem recuperados dos camundongos. Após a manutenção da cultura por um período de 24 horas, diferenças entre os grupos contendo vermes adultos expostos e não expostos à LicoA, nas concentrações de 50 e 100 μ M, puderam ser observadas. De forma mais específica, os vermes expostos à droga, em ambas as concentrações, exibiram algumas alterações morfológicas reprodutíveis, como o escurecimento do tegumento, presença de áreas de intumescimento corporal, pontos de contorção da musculatura e perda parcial da motilidade sem, contudo, perder a fixação à superfície do poço. A Figura 10 retrata algumas destas alterações, as quais não foram gênero-específicas. Ao final de 24 horas, todos os vermes apresentavam ainda sinais de vitalidade, mas com danos visíveis. Em contrapartida, os vermes mantidos em meio RPMI - independente da adição de DMSO 1% - apresentavam-se com intensa atividade motora (corporal e de suas ventosas), tegumento translúcido e peristalse intestinal regular.

Alguns casais de vermes mantiveram-se acasalados durante todo o período de incubação, sendo que os pares de vermes de todos os grupos mostraram-se inativos para oviposição até o fim período mencionado. Desta forma, o ensaio não foi capaz de revelar se existe influência direta do tratamento com a LicoA sobre o acasalamento e oviposição.

A fim de pesquisar se a LicoA induz algum nível de perturbação na homeostase excretora do parasito, a técnica de marcação do sistema excretor protonefridial com sonda fluorescente de resorufin foi utilizada. Este corante é passivamente absorvido pelo tegumento do verme adulto, concentra-se nos túbulos do sistema excretor por um mecanismo dependente de energia – que supõe a participação de uma proteína homóloga a glicoproteína-P, a qual é expressa no epitélio do sistema excretor do *S. mansoni* – e é eliminado via nefridiosporo (SATO,

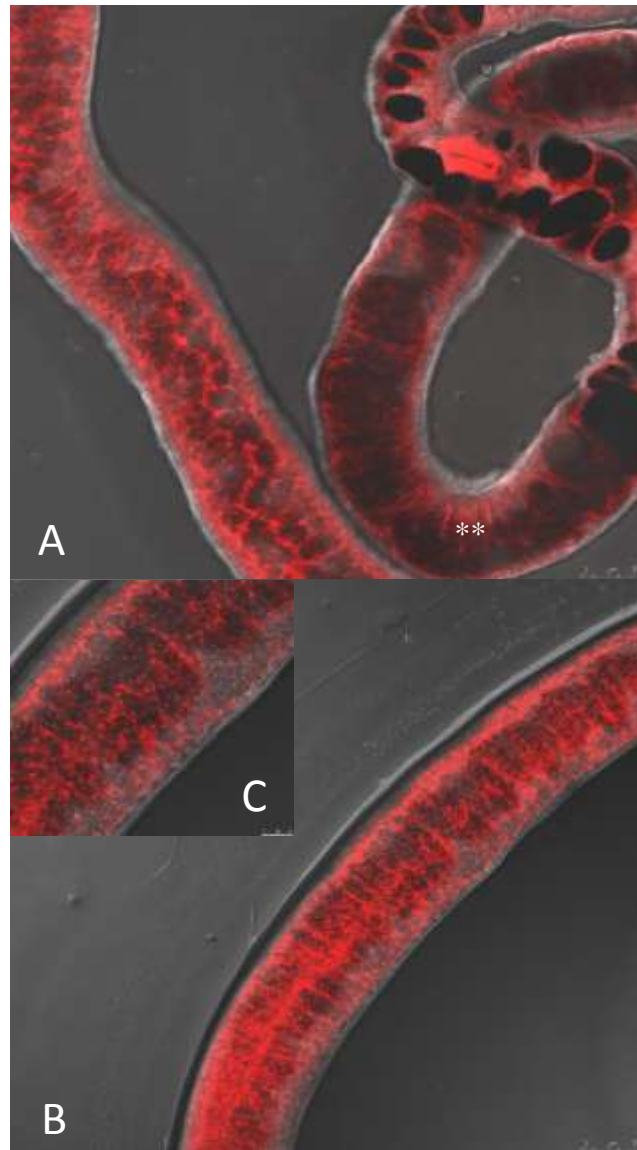
KUSEL e THORNHILL, 2002). Os resultados mostraram que a exposição à LicoA induz pontos de retenção do corante nos vermes adultos, mantendo a presença da sonda (marcação fluorescente) nos principais túbulos e ramos do sistema excretor, interrompendo, portanto, o seu fluxo normal (Figura 11).

Figura 10 – Alterações morfológicas de vermes adultos de *Schistosoma mansoni* provocadas pela ação da Licochalcona A em cultura.



Fonte: Elaboração própria. Vermes adultos foram recuperados de camundongos infectados com 50 cercárias e submetidos à cultura em meio RPMI 1640, suplementado com soro fetal bovino e antibióticos. Em (A), imagem dos casais de vermes mantidos sem contato com a droga. Em (B) e (C), o efeito do escurecimento tegumentar, contorções e dilatação corporal provocado pela exposição à concentração de 50 μM de Licochalcona A.

Figura 11 – Alterações morfológicas do sistema excretor de vermes adultos de *Schistosoma mansoni* provocadas pela ação da Licochalcona A em cultura e visualizadas através de marcação fluorescente por Resorufin.



Fonte: Elaboração própria. Vermes adultos foram recuperados de camundongos infectados com 50 cercárias e submetidos à cultura em meio RPMI 1640, suplementado com soro fetal bovino, antibióticos e expostos a sonda resorufin (Sigma). Em (A), imagem dos vermes mantidos sem contato com a droga e com capacidade de eliminar a sonda via sistema excretor (asteriscos). Em (B) e (C), a manutenção da intensidade da marcação, destacada pelo excesso de marcações (efeito pontilhado) da distribuição da sonda Resorufin provocado pela exposição à concentração de 50 μM de Licochalcona A, revela a falha no sistema excretor, promovida pela ação da droga, provocando a manutenção da marcação dos principais túbulos e ramos do sistema excretor do verme. Em (C), um zoom das alterações observadas.

4.2 ENSAIOS *IN VIVO*

4.2.1 Recuperação de Vermes

Em modelo murino, a perfusão dos animais consiste em uma ferramenta útil para avaliar a redução da carga parasitária promovida por uma droga em teste, além do efeito da mesma sobre o deslocamento hepático dos vermes como indício de uma boa atividade esquistossomicida (BOTROS et al., 1989). A Tabela 2 mostra as médias e medianas de recuperação dos vermes em cada grupo de tratamento. Em função das discrepâncias observadas nos níveis de recuperação intragrupo, uma descrição qualitativa foi utilizada e outra medida de tendência central foi aplicada aos dados.

Tabela 2 – Dados referentes à intervenção em cada grupo experimental e à taxa de recuperação de vermes. Os camundongos foram divididos em seis grupos, incluindo um grupo controle não tratado e um grupo que recebeu praziquantel 200mg/Kg de peso, por via oral, como controle de tratamento. Os demais grupos receberam a droga teste Licochalcona A por via intraperitoneal (ip.), nas doses de 25mg/Kg ou 50mg/Kg de peso, em dois esquemas distintos: dose única e dose dupla, sendo este último intercalado por um período de quatorze dias

Droga	Dose em mg/Kg	Esquema de doses	Nº de animais	Média de vermes	Mediana	% de distribuição		% de redução da carga parasitária **
						Mesentério	Fígado	
PZQ	200	Única	10	5,4	3,0	51,9	48,1	18,6
LicoA	25	Única	6	5,17	6,0	48,4	51,6	22,0
LicoA	25	Duplo	6	7,67	6,0	67,4	32,6	---
LicoA	50	Única	5	6,2	6,0	90,3	9,7	6,5
LicoA	50	Duplo	6	5,3	4,5	25,0	75,0	20,1
CT	-	-	8	6,63	6,0	43,4	56,6	-

Fonte: Elaboração própria. * CT = grupo controle.

** Calculado em relação à média de recuperação dos vermes ($p < 0,05$).

*** Neste grupo, houve aumento de 15,7% na carga parasitária em relação ao grupo não tratado.

Desta forma, no grupo tratado com praziquantel, a máxima recuperação de vermes em um animal foi igual a vinte, ao mesmo tempo em que para dois animais deste mesmo grupo houve cura parasitológica aparentemente total (nenhum verme recuperado). Em contrapartida, no grupo controle não tratado, havia um animal com recuperação máxima de doze vermes enquanto em outro apenas um foi recuperado.

Comparando estes dois grupos, a mediana revela uma tendência a favor de uma redução significativa (50%) da carga parasitária a partir do tratamento com PZQ.

Dentre os grupos tratados com Licochalcona A, os animais que receberam esquemas de dose única e dose dupla de 25mg/Kg de peso, tiveram uma variação na recuperação de vermes entre dois a nove e três a dezoito, respectivamente. Nos esquemas que contemplaram dose única e dose dupla de 50mg/Kg de peso, a amplitude na recuperação variou entre zero a doze e zero a treze, respectivamente. Salvo para o esquema de LicoA 25mg/Kg dose única, em que o limite inferior de recuperação (dois vermes) foi obtido em dois animais, os demais valores mínimos/máximos relatados foram encontrados em apenas um animal. De acordo com o exposto, a LicoA foi capaz de promover a cura parasitológica em dois animais, cada um pertencente a um dos esquemas que utilizou a dose de 50mg/kg de peso.

Nas condições experimentais testadas, o cálculo da mediana dos vermes recuperados após a perfusão destes grupos revelou que o esquema de dose dupla de 50mg/Kg foi o mais promissor na redução da carga parasitária, promovendo também o maior percentual de deslocamento (75%) dos vermes para o fígado.

Não houve diferença significativa entre a proporção de machos e fêmeas recuperados durante a perfusão dos grupos (dados não mostrados).

4.2.2 Leucometria global

Em animais imunocompetentes, oscilações na mobilização de granulócitos para o sangue periférico são esperadas à medida que o sistema imune combate infecções causadas por diversos agentes etiológicos. A Tabela 3 destaca a influência direta da Licochalcona A sobre esta proliferação, principalmente quando é utilizada em uma única dose de 50 mg/Kg. Efeitos similares foram obtidos com o uso do praziquantel, que exerce seu efeito esquistossomicida e influencia diretamente na resposta imune do hospedeiro. A maior atividade celular pode ser o reflexo da sobrecarga de antígenos liberada na corrente sanguínea em decorrência da destruição de vermes pelas drogas administradas.

Tabela 3 - Contagem média global de leucócitos em amostras de sangue de animais infectados por *Schistosoma mansoni* e tratados com as drogas Licochalcona A ($\times 10^3/\text{mm}^3$ de sangue). Aliquotas de sangue total heparinizado foram submetidas à contagem manual em câmara de Neubauer e os valores foram ajustados para unidade mm^3 de sangue

Grupos	Esquema de doses		Leucometria ($\times 10^3/\text{mm}^3$ de sangue)
	1 dose	2 doses	
Controle infectado	-	-	$3,79 \pm 0,70$
Praziquantel	x	-	$5,37 \pm 0,90^*$
Licochalcona 25 mg/Kg	x	-	$3,0 \pm 0,39$
Licochalcona 25 mg/Kg	-	x	$3,86 \pm 1,72$
Licochalcona 50 mg/Kg	x	-	$8,05 \pm 3,20^*$
Licochalcona 50 mg/Kg	-	x	$4,43 \pm 0,72$

Fonte: Elaboração própria. Aumento significativo da leucometria global em relação ao grupo não tratado ($p < 0,05$).

4.2.3 Peso Hepático e Esplênico

Na esquistossomose, a reação imunológica incitada pela presença dos ovos no tecido é bem conhecida, repercutindo no aumento de órgãos como o baço e o fígado (CHEN, FOSTER e BENNETT, 1990). Como demonstrado na Tabela 4, não houve variação significativa ($p < 0,05$) nas massas desses órgãos entre os tratamentos adotados e o controle não tratado. Sob a análise macroscópica, os fígados extraídos apresentavam-se com formações granulomatosas como consequência da presença de ovos.

Tabela 4 - Peso médio dos órgãos removidos após eutanásia dos animais infectados por *Schistosoma mansoni* e tratados com duas doses da substância Licochalcona A e com praziquantel

Grupos	Órgãos	
	Fígado	Baço
Controle Infecção	$2,84 \pm 0,25$	$0,50 \pm 0,01$
Praziquantel	$2,59 \pm 0,34$	$0,422 \pm 0,10$
Licochalcona 25mg/Kg	$2,95 \pm 0,46$	$0,58 \pm 0,14$
Licochalcona 50mg/Kg	$2,77 \pm 0,32$	$0,59 \pm 0,12$

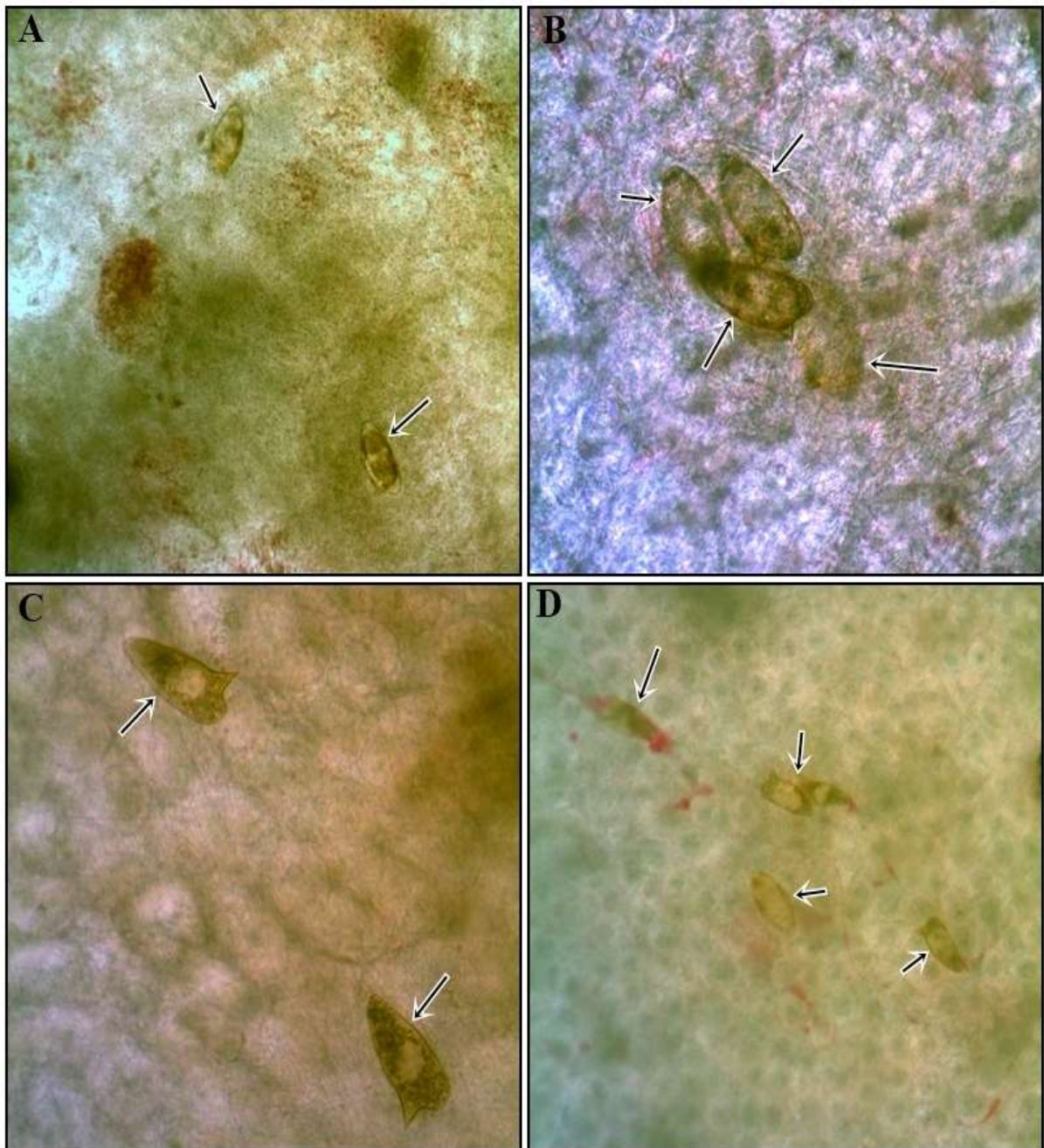
Fonte Elaboração própria. ($p < 0,05$).

4.2.4 Oograma Qualitativo

Dentre as drogas disponíveis para o tratamento da esquistossomose, não há relato de ação direta sobre os ovos maduros ou imaturos *in vivo*, mas sim para os diversos estágios pós-eclosão. Por outro lado, substâncias com potencial de interromper temporariamente a oviposição pelas fêmeas são descritas, como os inibidores da enzima 3-hidroxi, 3-metilglutaril, coenzimaA e a nicarbazina (HILLYER, REYES e HERNÁNDEZ-ALMENAS, 1975; CHEN, FOSTER e BENNETT, 1990; ARAÚJO et al., 2002) além da ação de alguns glicocorticoides em induzir o bloqueio parcial da excreção dos ovos para o lúmen intestinal (HERMETO et al., 1994; MATI, FREITAS e MELO, 2010).

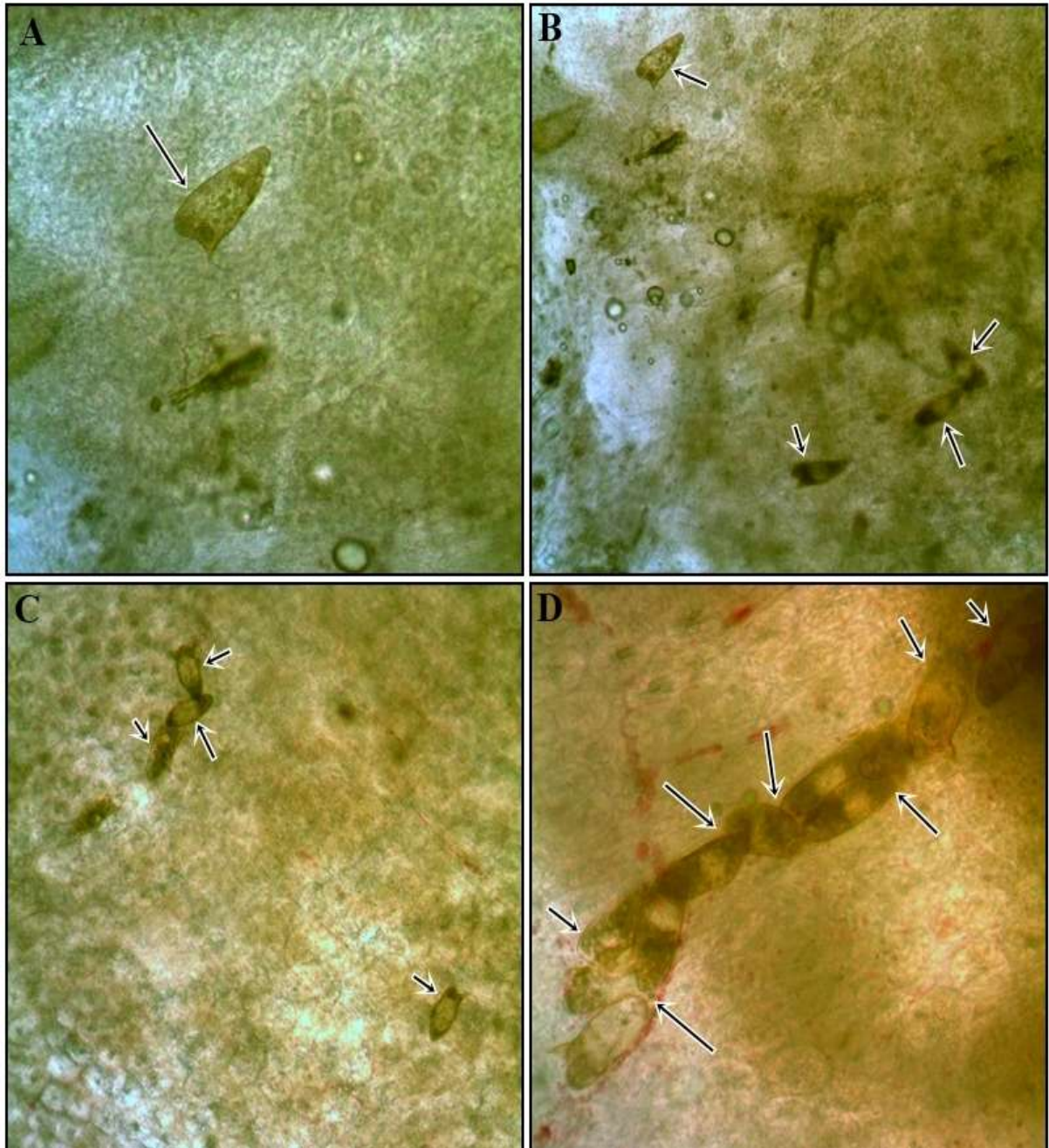
De modo a visualizar a influência dos efeitos da LicoA sobre o desenvolvimento dos ovos *in vivo*, realizou-se uma análise qualitativa dos oogramas dos animais sacrificados, o qual foi considerado alterado na ausência de um ou mais estágios imaturos (BOTROS et al., 1989; ARAÚJO et al., 1996). Os fragmentos intestinais observados detinham ovos em todos os estágios de maturação independente do animal ter recebido as drogas em teste, indicando que nenhum dos tratamentos alterou o desenvolvimento dos ovos ou a cinética de oviposição. Fotos ilustrativas destas observações estão mostradas nas Figuras 12 e 13.

Figura 12 – Efeitos do tratamento em dose única com Licochalcona A sobre o oograma de camundongos da linhagem Swiss infectados com *Schistosoma mansoni*.



Fonte: Elaboração própria. Camundongos infectados com 50 cercárias foram submetidos ao tratamento com praziquantel, Licochalcona A (25 e 50mg/Kg) aos 26 dias pós-infecção. Cinquenta dias após a infecção, os animais foram eutanasiados e fragmentos do intestino foram removidos para análise a fresco do oograma. Em (A), fragmento de intestino do grupo controle; (B) grupo tratado com praziquantel. Em (C) e (D), grupos que receberam dose única de Licochalcona A de 25 e 50mg/Kg, respectivamente. Em nenhuma das amostras foi observada diferença nos estágios de maturação dos ovos, sendo todos os estágios imaturos encontrados, independente dos animais terem sido tratados ou não. Os ovos estão destacados pelas setas.

Figura 13 – Efeitos do tratamento em duas doses com Licochalcona A sobre o oograma em camundongos da linhagem Swiss infectados com *Schistosoma mansoni*.



Fonte: Elaboração própria. Camundongos infectados com 50 cercárias foram submetidos ao tratamento com praziquantel, por via oral, ou com duas doses de Licochalcona A (25 e 50mg/Kg) aos 26 dias após a infecção. Cinquenta dias após a infecção, os animais foram eutanasiados e os fragmentos do intestino foram removidos para análise do oograma a fresco. Em (A) e (B), fragmentos de intestino do grupo controle; Em (C) e (D), grupos que receberam duas dose de Licochalcona A de 25 e 50mg/Kg, respectivamente. Em nenhuma das amostras foi observada diferença nos estágios de maturação dos ovos observados nos fragmentos de intestino dos animais tratados. Os ovos estão destacados pelas setas.

4.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DA LICOCHALCONA A SOBRE AS ISOFORMAS DE ATP DIFOSFOHIDROLASE

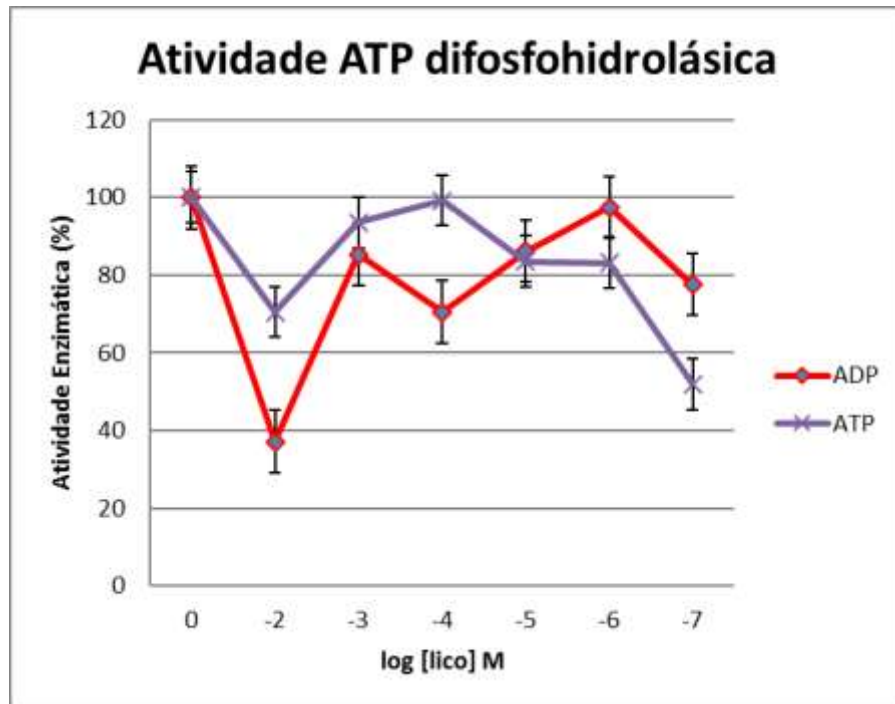
O potencial de inibição da atividade ATP difosfohidrolásica - derivada das isoenzimas SmATPDase 1 e 2 do homogeneizado de verme adulto obtido - foi o modelo enzimático de avaliação proposto na tentativa de presumir a influência da droga sobre os esquistossomos. Os valores dos controles foram similares e o padrão para comparação escolhido foi a medida da atividade hidrolítica da amostra preparada com DMSO, cujas atividades basais foram: 29,545 nmol de Pi/mg/min para atividade ATPásica e 23,496 nmol de Pi/mg/min para atividade ADPásica. Como mostrado na Tabela 5 e no Gráfico 1, não se pode estabelecer uma relação de dependência entre a concentração da licochalcona A no meio reacional e a inibição das atividades testadas. Além disso, ao se comparar à hidrólise ATPásica e ADPásica, percebe-se as maiores inibições parciais em um padrão de concentração inverso: para a atividade ATPásica a máxima inibição alcançada (48%) relativa ao controle foi à 0,1 μ M de LicoA; em contrapartida, na atividade ADPásica a inibição máxima de 63% foi obtida com LicoA 10mM, seguida da inibição de 39% a partir da concentração de 100 μ M.

Tabela 5 – Potencial de inibição da Licochalcona A sobre a atividade ATPásica e ADPásica das isoformas de ATP difosfohidrolase de *Schistosoma mansoni*. A hidrólise de ATP ou ADP foi mensurada por meio de análise espectrofotométrica do fosfato inorgânico liberado e comparada aos obtidos com o controle contendo DMSO 1%

Concentração Licochalcona A	ATP	%Inibição	ADP	%Inibição
Controle	100	0	100	0
10mM	73,83	26,16	37,14	62,86
1mM	93,89	6,11	85,32	14,68
100μM	100	0	70,54	29,46
10μM	84,72	15,28	100	0
1μM	83,19	16,81	97,5	2,5
0,1μM	51,88	48,12	93,59	6,41

Fonte: Elaboração própria.

Gráfico 1 - Inibição da atividade ATP difosfohidrolásica do homogeneizado do tegumento de *S. mansoni* por diferentes concentrações de Licochalcona A.



Fonte: Elaboração própria. Concluída a incubação nas condições reacionais padrão, 3mM de substrato (ATP ou ADP) foi adicionado ao meio contendo cada concentração correspondente da droga (0,1 μ M a 10 mM) em conjunto com a alíquota de homogeneizado de verme adulto (0,05mg proteína / ml) dando início à reação enzimática, a qual perdurou por 60min a 37°C e foi interrompida pela adição de HCl 0,1N. Ao final deste período, a hidrólise de ATP ou ADP foi mensurada por meio de análise espectrofotométrica do fosfato inorgânico liberado e comparada aos obtidos com o controle contendo DMSO 1%.

5 DISCUSSÃO

Na medida em que plantas medicinais são valorizadas como recursos para obtenção de novos medicamentos e produtos farmacêuticos, a pesquisa científica aplicada à área destaca-se como ferramenta capaz de validar a eficácia e segurança de seu uso (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1993a; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2002), bem como de permitir a descoberta de novos fármacos em si. Isto é válido especialmente no campo das doenças negligenciadas, em que não há um investimento efetivo por parte das grandes corporações farmacêuticas, ficando boa parte da produção científica a cargo das instituições de ensino/pesquisa (NDJONKA et al., 2013). Neste contexto, para a esquistossomose mansônica outro agravante reforça a necessidade de se incorporar novas drogas esquistossomicidas: o limitado arsenal terapêutico cada vez mais ameaçado pela emergência de cepas resistentes ao tratamento de escolha com praziquantel (FALLON e DOENHOFF, 1994; STELMA et al., 1995; LIANG et al., 2002; MELMAN et al., 2009; CASTRO et al., 2013). Considerando as premissas anteriores, a aparente toxicidade mínima relatada no trabalho de CHEN et al. (1994b) e os resultados preliminares observados *in vitro* por Carvalho (2013), o flavonoide Licochalcona A de uma variedade de *Glycyrrhiza spp.* foi desafiado no presente estudo quanto ao seu potencial esquistossomicida *in vivo* e *in vitro*.

Em ensaios *in vitro*, o prejuízo às funções vitais do parasito pode ser revelado pela perda da transparência habitual do tegumento, redução da motilidade em diversos níveis, além da incapacidade de fixação das ventosas oral/ventral à superfície dos poços (HOLTFRETER et al., 2011; ALMEIDA et al., 2012; FABRI et al., 2014). Com efeito, a LicoA a partir de 50µM é capaz de induzir lesões que refletem tanto na cor do tegumento quanto na motilidade dos vermes, além de produzir, de forma consistente (Figura 10; B), áreas de intumescimento corporal. Almeida et al. (2012) também denotaram o escurecimento do tegumento dos vermes quando submetidos aos extratos hexânico e diclorometânico de *Eremanthus erythropappus* em concentrações subletais, lesão aparentemente irreversível por persistir após 24 horas da substituição do meio por RPMI isento de tais extratos. Já para o extrato etanólico de *E. erythropappus*, que reduziu levemente a motilidade e

provocou um ligeiro escurecimento do tegumento, observou-se uma reversão parcial destas lesões com a substituição do meio que o continha. Assim, mais estudos devem ser desenvolvidos a fim de avaliar a reversibilidade das ações observadas *in vitro* para a LicoA, além daqueles que avaliem a atividade da droga sobre a neurotransmissão ou alterações ultraestruturais do tegumento.

Diversamente ao observado por Carvalho 2013, a LicoA não apresentou efeito letal nas concentrações de 50 e 100 μ M ao final de 24 horas de incubação. No decorrer deste período, Moraes et al. (2011) observaram que a pirplatina em concentrações superiores a 15,8 μ M mata a totalidade de vermes adultos expostos, o que, de outro modo, não foi apreciado por Holtfreter et al. (2011) ao testarem a ação esquistossomicida do antimalárico primaquina à 2 μ g/mL, mesmo estendendo o período de incubação por mais de 168 horas.

As alterações motoras e tegumentares refletem o estado geral dos parasitos no meio de cultura, mas nem sempre se correlacionam diretamente com o mecanismo de ação da droga, de modo que critérios adicionais são desejáveis para avaliar a origem da atividade esquistossomicida de um extrato ou uma droga (NDJONKA et al., 2013). O artifício de marcar o sistema excretor protonefridial de vermes adultos de *S. mansoni* - com substâncias que formam complexos com a glutatona ou substratos fluorescentes de proteínas transportadoras ATP dependentes - consiste em uma ferramenta útil para o conhecimento mais profundo da ação da droga sobre uma importante via de regulação de seu metabolismo (SATO, KUSEL e THORNHILL, 2002; SATO, KUSEL e THORNHILL, 2004; KUSEL, MCVERGH e THORNILL, 2009), sendo explorada neste estudo através da aplicação da sonda de resorufin sobre os vermes adultos tratados em cultura. O resorufin é um substrato para glicoproteína - P (gp-P) em mamíferos e seu transporte no parasito tem sido atribuído à SMDR2, uma proteína constitutiva homóloga à gp-P (BOSCH et al., 1994; SATO, KUSEL e THORNHILL, 2002; JAMES, HUDSON e DAVEY, 2009; MESSERLI et al., 2009; KASINATHAN et al., 2010). Em nosso estudo, a LicoA parece interferir no fluxo do sistema protonefridial (Figura 11; B e C), uma vez que pontos de acúmulo de resorufin evidenciaram a manutenção da marcação dos principais túbulos e ramos excretores dos vermes adultos. Irregularidades e manutenção da marcação do sistema excretor do verme adulto pelo resorufin puderam ser observadas sob a influência de substâncias reconhecidamente

moduladoras da gp-P, como verapamil e nifedipina (SATO, KUSEL e THORNHILL, 2002), além do praziquantel (OLIVEIRA et al., 2006).

A interação com a gp-P é bem conhecida para alguns flavonóides (HAYESHI et al., 2006; JAGANATHAN, 2011; YU et al., 2011). Em estudo recente (CHOI, CHOI e CHOI, 2014), a LicoA entre 3 e 10 μ M promoveu o acúmulo relativo e crescente de rodamina – um substrato da gp-P – em uma linhagem celular; além de aparentemente inibir o efluxo de nifedipina mediado pela gp-P em modelo experimental utilizando ratos. Em conjunto, esses dados assinalam que a LicoA influencia na homeostase excretora do parasito por uma potencial interação com a SMDR2.

Embora a velocidade de acasalamento se intensifique com a extensão do tempo de cultura, um período de 24 horas é razoável para que machos e fêmeas isolados se acasalem (MICHAELS, 1969; SHAW, 1977), fato esse que não foi percebido durante a manutenção dos vermes expostos a LicoA *in vitro* e excepcionalmente, para os controles negativos (contendo meio RPMI ou meio RPMI mais DMSO 1%). A droga também não induziu a separação dos casais previamente estabelecidos, semelhante ao observado por Moraes et al. (2013) ao testarem a maior concentração subletal de um derivado de carvacol. Por outro lado, compostos tais como curcumina, (\pm) - licarina e pirplatina, bem como, óleo essencial de *Plectranthus neochilus* e das folhas de *Bracharis dracunculifolia* causam a separação dos machos e fêmeas inicialmente acasalados (MAGALHÃES et al., 2009; PARREIRA et al., 2010; CAIXETA et al., 2011; MORAES et al. 2011; PEREIRA et al.; 2011).

Sob a ação da droga, os casais mostraram-se inativos para oviposição, no entanto, nenhuma inferência pode ser feita em relação à atividade da LicoA sobre a oviposição nestas condições. Isto porque a produção de ovos *in vitro* é passível de ocorrer dentro das primeiras 24 horas de incubação, mas pode permanecer temporariamente suprimida como resultado da adaptação dos vermes ao microambiente de cultura (SHIRAZIAM et al., 1986; EL RIDI et al., 1997; SANDERSON, BARTLETT e WHITFIELD, 2002).

Em síntese, o potencial de interação da LicoA com a SMDR2 evidenciado neste estudo sugere que o acúmulo de escórias metabólicas no meio interno do parasito pode ser responsável pela ocorrência de áreas corporais intumescidas,

além do próprio escurecimento do tegumento. Até mesmo a redução da motilidade pode ser em função de alterações iônicas induzidas por um “estado de retenção” proveniente deste acúmulo. No entanto, apenas com a extensão do tempo de cultura seria possível dimensionar até que ponto estas lesões são letais ao parasito, além de tornar a avaliação da ação da droga sobre a oviposição e o comportamento dos casais em cultura mais confiável.

No ensaio *in vivo*, a progressão da doença mostrou-se bastante heterogênea no nível intragrupo, o que pode estar relacionado a uma imunidade inata efetiva na destruição inicial do inoculo, na medida em que se pressupõe que os hospedeiros não exibem uma imunidade concomitante para a doença. Outro fato é a limitação própria do processo de perfusão, que pode ter sido falho na recuperação da totalidade de vermes albergados por cada animal. A este respeito, vale ressaltar ainda que nos diversos grupos tratados com LicoA, a baixa solubilidade da droga no veículo empregado pode ter contribuído para uma oscilação na dose efetivamente administrada, e conseqüentemente, na extensa variação observada na recuperação dos vermes. Apesar destas questões, houve uma aparente cura parasitológica para dois animais entre os distintos esquemas de tratamento com LicoA. Ademais, o cálculo das medianas mostrou que o esquema de LicoA dose dupla de 50mg/kg de peso via intraperitoneal foi o mais promissor na redução da carga parasitária, além de alcançar a maior porcentagem no deslocamento hepático dos vermes, indicando-o como o ponto de partida para estudos posteriores com a droga.

Independente da dose utilizada para o praziquantel (PZQ) ser considerada subcurativa, tal tratamento apresentou uma boa margem de redução da carga parasitária em relação ao grupo controle. Este achado condiz com muitos trabalhos na literatura (ANDREWS 1985; SHAW e ERASMUS, 1988; LIANG et al., 2001; CHAIWORAPORN et al., 2005; ROFATTO et al., 2013) que afirmam que doses subcurativas de PZQ são capazes de expor antígenos de forma secundária aos danos causados sobre o tegumento do verme adulto, possibilitando assim, a redução da carga parasitária por meio da ação sinérgica com o sistema imune do hospedeiro.

Com efeito, o despertar do sistema imune para uma resposta predominantemente celular está bem estabelecido após interação do PZQ com o verme adulto (WU, WANG E HUANG, 2011; ROFATTO et al., 2013), o que de igual

modo, pode ser esperado para outras drogas que causem algum nível de dano ao esquistossomo. Nestes casos, a leucometria global tende a aumentar em concomitância a maior suscetibilidade dos vermes deteriorados ao ataque imune. Por outro lado, o aumento do recrutamento de células pode estar associado ao combate de comorbidades existentes nos animais tratados. No presente estudo, aumentos significativos nas médias de leucometria global 25 dias após a administração das drogas foram observados apenas para os esquemas de PZQ e de LicoA dose única 50mg/kg, podendo ser reflexo de uma ação residual destes tratamentos. Fabri et al. (2014) encontraram um decréscimo da leucometria global tanto para os grupos que receberam PZQ (200mg/Kg peso) quanto para aqueles que receberam extratos de *Mitracarpus frigidus* em concentrações diversas, análise que foi realizada 40 dias após os tratamentos e foi relacionada ao sucesso no combate à infecção pelas drogas mencionadas.

Alterações no padrão do oograma refletem a fecundidade de *S. mansoni*, sendo um forte indício de eficácia de uma droga esquistossomicida (PELEGRINO 1977; HERMETO et al., 1994; ABDUL-GHANI et al., 2011). Do ponto de vista qualitativo, a LicoA parece não induzir mudanças na cinética de oviposição das fêmeas, uma vez que todos os estágios imaturos foram visualizados na parede intestinal dos animais sacrificados. Abdul-Ghani et al. (2011) observaram uma ausência completa no oograma de dois estágios imaturos após os animais infectados por uma cepa egípcia de *S. mansoni* serem tratados com artemeter. De outro modo, todos os estágios de desenvolvimento foram encontrados para β -lapachona e fitol - em modelos que utilizaram a cepa BH em camundongos Swiss e Balb/c, respectivamente, porém tais drogas provocaram mudanças no oograma quantitativo, sendo consideradas indutoras de alterações na cinética de oviposição em algum nível (AIRES et al., 2014; MORAES et al., 2014).

A progressão da esquistossomose experimental é por vezes acompanhada de um achado patológico comum: o aumento da massa visceral de órgãos como o baço e o fígado, seja pela intensa atividade imunológica (baço) ou pela presença das formações granulomatosas (baço e fígado) (GRYSEELS et al., 2006). Presumivelmente, compostos capazes de interferir na viabilidade dos ovos preveniriam tal desfecho, além daqueles que demonstrassem atividade sobre a fecundidade da fêmea ou mesmo que eliminassem as formas jovens do verme,

impossibilitando assim o alcance da maturidade sexual plena (LEE e MICHAELS, 1968; ABDUL-GHANI et al. 2011). Chen, Foster e Bennett (1990) demonstraram que as massas destes órgãos foram relativamente menores quando extraídas de animais que receberam mevinolin, uma droga que interrompe temporariamente a oviposição no parasito. Alguns esquemas de artemeter também foram capazes de reduzir o peso relativo hepático e esplênico dos animais tratados (LESCANO et al., 2004). Nossos achados corroboram as afirmativas anteriores, uma vez que não há relatos acerca da capacidade das drogas testadas (LicoA e PZQ) em impedir/prevenir as repercussões relativas aos ovos aprisionados nos tecidos.

A princípio, como um estudo piloto, os achados reunidos aqui encorajam o prosseguimento de pesquisas que contemplem um maior número de animais por grupo e a obtenção de um grupo controle com animais saudáveis. Entre os grupos tratados com a LicoA, o esquema de dose dupla de 50mg/Kg de peso intraperitoneal pode ser inicialmente contemplado, já que dados farmacocinéticos sobre a droga ainda não estão disponíveis para uma eventual mudança de via de administração. Outro ponto é a concepção de uma forma farmacêutica que mantenha a LicoA em solução, visando garantir a homogeneidade da dose administrada, e assim, tentar eliminar esta fonte de incerteza do estudo.

No decurso da migração do *S. mansoni* pela circulação sanguínea, percebe-se uma aparente refratariedade do verme em relação à agregação plaquetária e eliminação imune, devido à suposta contribuição de ecto-apirases no metabolismo de moléculas associadas ao dano, como o ATP e seu derivado ADP (VASCONCELOS et al., 1993; BHARDWAJ e SKELLY, 2009; DA'DARA et al., 2014). Isto pode ser explorado na descoberta de novas drogas esquistossomicidas e neste estudo foi idealizado para tal. Como mostrado no Gráfico 1, não houve uma relação concentração dependente para as inibições parciais alcançadas e a atividade ADPásica foi mais sensível à inibição (68% de inibição na concentração de 10mM). Penido et al. (2007) também denotaram um efeito sobre as isoformas de ATP difosfohidrolases de *S. mansoni* dos Ácidos N-alquilamino-alcanotiosulfúricos, os quais alcançaram uma inibição parcial média maior para a atividade ATPásica. Em ambos os casos, não houve um bloqueio integral da atividade enzimática, mas a inibição proporcionada pela LicoA pode contribuir para a sua ação

esquistossomicida *in vivo*, considerando a influência da ATP difosfohidrolase sobre o metabolismo purinérgico de mediadores pró-trombóticos e pró-inflamatórios.

Neste contexto, a padronização de uma metodologia que estimasse a inibição proporcionada por uma droga sobre cada isozima totalmente purificada de *Schistosoma mansoni* tornaria a inferência sobre a ação desta droga mais consistente, na medida em que o homogeneizado do verme fornece atividades enzimáticas basais bastante variáveis em cada ensaio.

Em conjunto, os dados aqui relacionados demonstram a potencial atividade esquistossomicida da Licochalcona A nos modelos *in vitro* e *in vivo* testados e proporcionam observações preliminares sobre a forma com que a droga interage sobre determinados sistemas intrínsecos ao parasito, como a influência sobre a homeostase excretora dos vermes adultos, bem como, a inibição parcial das SmATPDases.

6 CONCLUSÃO

Em face da inexistência de uma vacina eficaz, a quimioterapia na esquistossomose permanece ainda como único recurso disponível de controle da morbidade. Aliado a isso, a iminência de resistência ao praziquantel tem justificado a busca por novos agentes esquistossomicidas, que pode ser viabilizada através da exploração de produtos naturais.

Por meio deste estudo foi possível verificar a existência de um efeito esquistossomicida da Licochalcona A *in vitro* – um flavonoide extraído de uma espécie de *Glycyrrhiza spp.* - que se traduziu em alterações tegumentares, prejuízo na motilidade dos vermes, formação de áreas intumescidas sobre o corpo e na perturbação da homeostase excretora do parasito pela virtual interação com a SMDR2. Esta última pode ser ainda a origem dos demais efeitos, contribuindo para o entendimento das potenciais influências da droga sobre receptores e/ou enzimas presentes nos esquistossomos. Além disso, a suposta inibição parcial das SmATPDases pode contribuir para o insucesso do parasitismo, levando em consideração o comprometimento nos mecanismos de evasão do verme ao sistema imune do hospedeiro.

Apesar da heterogeneidade na infecção, a LicoA mostrou-se eficaz na redução da carga parasitária do hospedeiro e no deslocamento hepático dos vermes em um dos esquemas em teste, abrindo caminho para o prosseguimento dos estudos *in vivo* que possam contemplar um número maior de animais por grupo – com a adição de um grupo controle saudável - e de parâmetros analisados, tais como o perfil de citocinas e quimiocinas, análises histológicas dos granulomas, além de outras vias de administração. Ademais, o aprimoramento das técnicas *in vitro* utilizadas podem fornecer mais detalhes sobre a influência da LicoA sobre determinados sistemas intrínsecos ao parasito.

REFERÊNCIAS

- ABDUL-GHANI, Rashad et al. Artemether shows promising female schistosomicidal and ovicidal effects on the Egyptian strain of *Schistosoma mansoni* after maturity of infection. **Parasitology Research**. [Heidelberg], v.108, n.9, p. 1199–1205, mai. 2011. Disponível em: < doi: 10.1007/s00436-010-2163-9 >. Acesso em: 4 mar. 2014.
- AIRES, André de Lima et al. β -Lapachone: A naphthoquinone with promising antischistosomal properties in mice. **Phytomedicine**. [Stuttgart], v. 21, n. 3, p. 261-267, fev. 2014. Disponível em: < doi: 10.1016/j.phymed.2013.08.012 >. Acesso em: 4 mar. 2014.
- ALLEN, Henrietta E. et al. New policies for using anthelmintics in high risk groups. **Trends in Parasitology**. [Oxford], v. 18, n. 9, p. 1-2, 2002. Disponível em: < doi: 10.1016/S1471-4922(02)02386-3 >. Acesso em: 6 mar. 2014.
- ALMEIDA, Luísa M. S. et al. *In vitro* evaluation of the schistosomicidal potential of *Eremanthus erythropappus* (DC) McLeisch (Asteraceae) extracts. **Natural product research**. [Londres], v.26, n. 22, p. 2137-2143, 2012. Disponível em: < doi: 10.1080/14786419.2011.631135 >. Acesso em: 14 mar. 2014.
- ALMEIDA, Marília S. et al. Vaccination against *Fasciola hepatica* infection using a *Schistosoma mansoni* defined recombinant antigen, Sm14. **Parasite Immunology**. [Oxford], v. 25, p. 135–137, 2003. Disponível em: < doi: 10.1046/j.1365-3024.2003.00619.x >. Acesso em: 14 jul. 2013.
- ALY, Hanan F.; MANTAWY, Mona. M. Efficiency of ginger (*Zingbar officinale*) against *Schistosoma mansoni* infection during host–parasite association. **Parasitology International**. [Amsterdam], v. 62, p. 380–389, 2013. Disponível em: < doi: 10.1016/j.parint.2013.04.002 >. Acesso em: 3 abr. 2014.
- ANDREWS, Peter. Praziquantel: Mechanisms of antischistosomal activity. **Pharmacology and Therapeutics**. [Oxford], v.29, p. 129-156, 1985. Disponível em: < doi:10.1016/0163-7258(85)90020-8 >. Acesso em: 8 mar. 2013.
- ARAGON, Anthony D. et al. Towards an understanding of the mechanism of action of praziquantel. **Molecular and Biochemical Parasitology**. [Amsterdam], v.164, p. 57-65, 2009. Disponível em: < doi: 10.1016/j.molbiopara.2008.11.007 >. Acesso em: 14 mai. 2013.
- ARAÚJO, Neuza; KOHN, Anna; KATZ, Naftale. Activity of the artemether in experimental schistosomiasis mansoni. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. Rio de Janeiro, v.86, Suppl. 2, p.185–188, 1991. Disponível em: < doi: 10.1590/S0074-02761991000600042 >. Acesso em: 11 set. 2013.

ARAÚJO, Neuza et al. *Schistosoma mansoni*: ação da lovastatina no modelo murino. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. São Paulo, v.35, n.1, p. 35-38, jan./ fev., 2002. Disponível em: < 10.1590/S0037-86822002000100007 >. Acesso em: 18 mar. 2013.

ARAÚJO Neuza et al. Suscetibilidade aos agentes quimioterápicos de isolados de *Schistosoma mansoni* oriundos de pacientes tratados com oxaminiquine e praziquantel e não curados. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. São Paulo, v. 29, n. 5, p. 467-476, set./ out. 1996. Disponível em: <doi: 10.1590/S0037-86821996000500010 >. Acesso em: 18 mar. 2013.

ASL, Marjan Nassiri; HOSSEINZADEH, Hosseinzadeh. Review of pharmacological effects of *Glycyrrhiza* sp. and its bioactive compounds. **Phytotherapy Research**. [Londres], v. 22, n. 6, p. 709–724, jun. 2008. Disponível em: < doi:10.1002/ptr.2362 >. Acesso em: 23 jan. 2014.

BALUNAS, Marcy. J.; KINGHORN, A. Douglas. Drug discovery from medicinal plants. **Life Sciences**. [Oxford], v. 78, p. 431 – 441, 2005. Disponível em: < doi:10.1016/j.lfs.2005.09.012 >. Acesso em: 15 mar. 2013.

BARBOSA, Maria Aparecida et al. Quantitative aspects of the migration and evolutive asynchronism of *Schistosoma mansoni* in mice. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**. São Paulo, v. 20, n. 3, p. 121-132, 1978.

BARFORD, Lea et al. Chalcones from Chinese liquorice inhibit proliferation of T cells and production of cytokines. **International Immunopharmacology**. [Amsterdam], v. 2, n. 4, p. 545– 555, mar. 2002. Disponível em: < doi:10.1016/S1567-5769(01)00202-8 >. Acesso em: 9 mai. 2013.

BARSOUM, Rashad S.; ESMAT, Gamal; EL-BAZ, Tamer. Human Schistosomiasis: Clinical Perspective: Review. **Journal of Advanced Research**. [Giza], v.4, n.5, p. 433–444, set. 2013. Disponível em: < doi:10.1016/j.jare.2013.01.005 >. Acesso em: 8 mar. 2014.

BERHE, Nega et al. Variations in helminth faecal counts in Kato–Katz thick smears and their implications in assessing infection status with *Schistosoma mansoni*. **Acta Tropica**. [Amsterdam], v. 92, n. 3, p. 205– 212, nov./dec. 2004. Disponível em: < doi:10.1016/j.actatropica.2004.06.011 >. Acesso em: 8 mai. 2013.

BHARDWAJ, Rita; SKELLY, Patrick J. Purinergic signaling and immune modulation at the schistosome surface? **Trends in Parasitology**. [Oxford], v.25, n.6, p. 256–260, 2009. Disponível em: < doi:10.1016/j.pt.2009.03.004 >. Acesso em: 14 mar. 2014.

BOISSIER, Jérôme et al. *In Vitro* Activities of Trioxaquines against *Schistosoma mansoni*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**. [Washington], v. 53, n.11, p. 4903–4906, nov. 2009. Disponível em: < doi: 10.1128/AAC.00640-09 >. Acesso em: 23 jan. 2013.

BOSCH, Irene B. et al. Two *Schistosoma mansoni* cDNAs encoding ATP-binding cassette (ABC) family proteins. **Molecular and Biochemical Parasitology**. [Amsterdam], v. 65, n. 2, p. 351–356, jun. 1994. Disponível em: < doi:10.1016/0166-6851(94)90085-X >. Acesso em: 18 mar. 2013.

BOTROS, Sanna et al. Efficacy of mirazid in comparison with praziquantel in Egyptian *Schistosoma mansoni* – infected school children and households. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. [Northbrook], v. 72, n. 2, p. 119–123, 2005.

BOTROS, Sanna et al. Effect of combined low dose praziquantel and oxamniquine on different stages of schistosome maturity. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine Hygiene**. [Londres], v. 83, n. 1, p. 86-89, jan.-fev. 1989.

BOTROS, Sanna et al. Lack of evidence for an antischistosomal activity of myrrh in experimental animals. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. [Northbrook], v. 71, n. 2, p. 206–210, 2004.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 104/GM de 25 de Janeiro de 2011. Define as terminologias adotadas em legislação nacional, conforme o disposto no Regulamento Sanitário Internacional 2005 (RSI 2005), a relação de doenças, agravos e eventos em saúde pública de notificação compulsória em todo o território nacional e estabelece fluxo, critérios, responsabilidades e atribuições aos profissionais e serviços de saúde. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 26 jan. 2011. Seção 1, p. 37.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portal da Saúde. SUS. **Casos positivos de Esquistossomose por mês**. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. Brasília, DF, 2011. Disponível: <http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/area.cfm?id_area=1551>. Acesso em: 02 set 2013.

BRINDLEY, Paul J. Drug resistance to schistosomicides and other anthelmintics of medical significance. **Acta Tropica**. [Basel], v. 56, n. 2-3, p. 213-231, 1994. Disponível em: < doi:10.1016/0001-706X(94)90064-7 >. Acesso em: 12 mar. 2014.

BRINDLEY, Paul J.; SHER, Alan. Immunological involvement in the efficacy of Praziquantel. **Experimental parasitology**. [Nova York], v. 71, p. 245-248, ago. 1990. Disponível em: < doi:10.1016/0014-4894(90)90028-B >. Acesso em: 12 mar. 2014.

CAFFREY, Conor R. Chemotherapy of schistosomiasis: present and future. **Current Opinion of Chemistry and Biology**. [Londres], v. 11, n. 4, p. 433-439, ago. 2007, il. Disponível em: < doi:10.1016/j.cbpa.2007.05.031 >. Acesso em: 14 mar. 2014.

CAIXETA, Soraya C. et al. Chemical composition and *in vitro* schistosomicidal activity of the essential oil of *Plectranthus neochilus* grown in southeast Brazil. **Chemistry and Biodiversity**. Zürich, v. 8, n. 11, p. 2147–2157, nov. 2011. Disponível em: < doi: 10.1002/cbdv.201100167 >. Acesso em: 14 mar. 2014.

CARVALHO, Lara Soares Aleixo de. **Avaliação da atividade esquistossomicida *in vitro* do extrato bruto e chalconas isoladas das raízes de *Glycyrrhiza inflata* (Fabaceae) frente a vermes adultos de *Schistosoma mansoni***. 2013. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) – Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2013.

CASTRO, Aline Pereira et al. Medicinal plants and their bioactive constituents: A review of bioactivity against *Schistosoma mansoni*. **Journal of Medicinal Plants Research**. [Victoria Island], v. 7, n. 21, p. 1515-1522, jun. 2013. Disponível em: < doi: 10.5897/JMPR12.0750 >. Acesso em: 12 mar. 2013.

CAVALCANTI, Marta et al. Schistosomiasis in areas of low endemicity: a new era in diagnosis. **Trends in Parasitology**. [Oxford], v. 29, n. 2, p. 75-82, fev. 2013. Disponível em: < doi:10.1016/j.pt.2012.11.003 >. Acesso em: 18 mar. 2013.

CHAIWORAPORN, Ruangyuth et al. Therapeutic effect of subcurative dose praziquantel on *Schistosoma mansoni* infected mice and resistance to challenge infection after treatment. **The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health**. [Bangkok], v. 36, n. 4, p. 846-852, jul. 2005.

CHEN, Guo-Zhong; FOSTER, Lewys; BENNETT, James L. Antischistosomal action of mevinolin: evidence that 3-hydroxy-methylglutaryl-coenzyme a reductase activity in *Schistosoma mansoni* is vital for parasite survival. **Naunyn Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**. [Berlim], v. 342, n.4, p. 477 – 482, out. 1990. Disponível em: < doi: 10.1007/BF00169467 >. Acesso em: 09 mar. 2014.

CHEN, Ming et al. Licochalcone A, a novel antiparasitic agent with potent activity against human pathogenic protozoan species of *Leishmania*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**. [Washington], v. 37, n.12, p. 2550-2556, dez. 1993. Disponível em: < doi: 10.1128/AAC.37.12.2550 >. Acesso em: 14 mar. 2014.

CHEN, Ming et al. Antileishmanial activity of licochalcone A in mice infected with *Leishmania major* and in hamsters infected with *Leishmania donovani*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**. [Washington], v. 38, n. 6, p. 1339-1344, jun. 1994a. Disponível em: < doi: 10.1128/AAC.38.6.1339 >. Acesso em: 21 mai. 2013.

CHEN, Ming et al. Licochalcone A, a new antimalarial agent, inhibits *In Vitro* growth of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* and protects mice from *P. yoelii* infection. **Antimicrobial agents and chemotherapy**. [Washington], v. 39, n. 7, p. 1470-1475, jul. 1994b. Disponível em: < doi: 10.1128/AAC.38.7.1470 >. Acesso em: 21 mai. 2013.

CHOI, Jin-Seok; CHOI, Jin-Shik; CHOI, Dong-Hyun. Effects of licochalcone A on the bioavailability and pharmacokinetics of nifedipine in rats: Possible role of intestinal CYP3A4 and P-gp inhibition by licochalcone A. **Biopharmaceutics and Drug Disposition**. Chichester, v. 35, n.7, p. 382 – 390, set. 2014. Disponível em: < doi: 10.1002/bdd.1905 >. Acesso em: 14 jun. 2014.

CHRISTOPHERSON, John Brian. The successful use of antimony in bilharziosis. Administered as intravenous injections of antimonium tartaratum (tartar emetic). **The Lancet**. [Londres], v. 2, n. 4958, p. 325-327, set. 1918. Disponível em: < doi:10.1016/S0140-6736(01)02807-0 >. Acesso em: 14 mar. 2013.

CHU, Xiao et al. Licochalcone A Inhibits Lipopolysaccharide-Induced Inflammatory Response *in vitro* and *in vivo*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. [Washington], v. 60, n. 15, p. 3947–3954, mar. 2012. Disponível em: < doi:10.1021/jf2051587 >. Acesso em: 28 set. 2013.

CICHEWICZ, Robert et al. Kwanzoquinones A–G and other constituents of *Hemerocallis fulva* “Kwanzo” roots and their activity against the human pathogenic trematode *Schistosoma mansoni*. **Tetrahedron**. [Oxford], v. 58, n. 42, p. 8597–8606, out. 2002. Disponível em: < doi:10.1016/S0040-4020(02)00802-5 >. Acesso em: 14 mar. 2014.

CIOLI, Donato; PICA-MATTOCCIA Livia; ARCHER, Sydney. Antischistosomal drugs: past, present . . . and future? **Pharmacology and Therapeutics**. [Oxford], v. 68, n. 1, p. 35–85, 1995. Disponível em: < doi:10.1016/0163-7258(95)000267 >. Acesso em: 14 mar. 2014.

CIOLI, Donato; PICA-MATTOCCIA Livia; ARCHER, Sydney. Drug resistance in schistosomes. **Parasitology Today**. [Amsterdam], v. 9, n. 5, p. 162-166, mai.1993. Disponível em: < doi:10.1016/0169-4758(93)90138-6 >. Acesso em: 14 mar. 2014.

COURA, José Rodrigues; CONCEIÇÃO, Maria José. Specific schistosomiasis treatment as a strategy for disease control. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. Rio de Janeiro, v. 105, n. 4, p. 598-603, jul. 2010. Disponível em: < doi:10.1590/S0074-02762010000400040 >. Acesso em: 14 mar. 2014.

CUI, Yongming et al. Anti-Inflammatory Activity of Licochalcone A Isolated from *Glycyrrhiza inflata*. **Verlag der Zeitschrift für Naturforschung, Tübingen**. [Baden-Württemberg], v. 63, n. 5-6, p. 361-365, mai./ jun. 2008.

CUNHA, Valéria M. N.; NOEL, François. Praziquantel has no direct effect on (Na⁺-K⁺)-ATPases AND (Ca²⁺- Mg²⁺) ATPases *Schistosoma mansoni*. **Life Sciences**. [Oxford], v. 60, n. 20, p. 289-294, 1997.

DA'DARA, Akran A. et al. Schistosome tegumental ecto-apyrase (SmATPDase1) degrades exogenous pro-inflammatory and pro-thrombotic nucleotides. **PeerJ**. [Corte Madera], v. 2, e316, mar. 2014. Disponível em: < doi: 10.7717/peerj.316 >. Acesso em: 14 mar. 2014.

DAO, Trong Tuan et al. Chalcones as novel influenza A (H1N1) neuraminidase inhibitors from *Glycyrrhiza inflata*. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**. [Oxford], v. 21, n. 1, p. 294–298, jan. 2011. Disponível em: < doi:10.1016/j.bmcl.2010.11.016 >. Acesso em: 14 mar. 2014.

DE OLIVEIRA, Rosimeire Nunes et al. Anthelmintic activity *in vitro* and *in vivo* of *Baccharis trimera* (Less) DC against immature and adult worms of *Schistosoma mansoni*. **Experimental Parasitology**. [Orlando], v. 137, p. 63-72, abr. 2014. Disponível em: < doi:10.1016/j.exppara.2014.02.010 >. Acesso em: 14 mar. 2014

DE OLIVEIRA, Rosimeire Nunes et al. *Schistosoma mansoni*: *In vitro* schistosomicidal activity of essential oil of *Baccharis trimera* (less) DC. **Experimental Parasitology**. [Orlando], v.132, n. 2, p.135–143, out. 2012. Disponível em: < doi:10.1016/j.exppara.2012.06.005 >. Acesso em: 14 mar. 2014.

DEMARCO, Ricardo et al. Molecular characterization and immunolocalization of *Schistosoma mansoni* ATP diphosphohydrolase. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. [São Diego], v. 307, n. 4, p. 831–838, ago. 2003. Disponível em: < doi:10.1016/S0006-291X(03)01268-3 >. Acesso em: 14 mar. 2014.

DEWICK, Paul M. The shikimate pathway: aromatic amino acids and phenylpropanoids. In: _____ **Medicinal natural products: a biosynthetic approach**. 2. ed. Chichester: John Wiley & Sons, 2002. p. 121 – 166.

DOENHOFF, Michael J. Evidence for an immune-dependent action of praziquantel on *Schistosoma mansoni* in mice. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine Hygiene**. [Londres], v. 81, n. 6, p. 947-951, nov./ dec.1987. Disponível em: < doi: 10.1016/0035-9203(87)90360-9 >. Acesso em: 11 mar. 2014.

EL-BESHBISHI, Samar N. et al. *In vivo* effect of single oral dose of artemether against early juvenile stages of *Schistosoma mansoni* Egyptian strain. **Experimental Parasitology**. [Orlando], v.135, n. 2, p. 240–245, out. 2013. Disponível em: < doi:10.1016/j.exppara.2013.07.006 >. Acesso em: 28 mar. 2014.

EL RIDI, Rashika et al. *Schistosoma mansoni* oviposition *in vitro* reflects worm fecundity *in vivo*: individual-, parasite age- and host-dependent variations. **International Journal for Parasitology**. [Oxford], v. 27, n. 4, p. 381-387, abr. 1997. Disponível em: < doi:10.1016/S0020-7519(96)00191-9 >. Acesso em: 14 mar. 2014.

EL RIDI, Rashika F. A.; TALLIMA, Hatem A. M. Novel therapeutic and prevention approaches for schistosomiasis: Review. **Journal of Advanced Research**. [Giza], v. 4, n. 5, p. 467–478, set. 2013. Disponível em: < doi:10.1016/j.jare.2012.05.002 >. Acesso em: 14 mar. 2014.

ENK, Martin Johannes et al. A combined strategy to improve the control of *Schistosoma mansoni* in areas of low prevalence in Brazil. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. [Northbrook], v. 78, n. 1, p. 140–146, jan. 2008.

ERKO, Berhanu et al. Efficacy and side effects of praziquantel in the treatment of Schistosomiasis mansoni in schoolchildren in Shesha Kekele Elementary School, Wondo Genet, Southern Ethiopia. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**. Singapore, v. 2, n. 3, p. 235-239, mar. 2012. Disponível em: < doi: 10.1016/S2221-1691(12)60049-5 >. Acesso em: 24 ago. 2013.

FABRI, Rodrigo L. et al. Chromatographic Fingerprint Analysis and Effects of the Medicinal Plant Species *Mitracarpus frigidus* on Adult *Schistosoma mansoni* Worms. **BioMed Research International**. [Nova York], v. 2014, p. 1-10, mai. 2014. Disponível em: < doi: 10.1155/2014/941318 >. Acesso em: 08 mai. 2014.

FALLON, Padraic G.; DOENHOFF, Michael J. Drug-resistant schistosomiasis: resistance to praziquantel and oxamniquine induced in *Schistosoma mansoni* in mice is drug specific. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. [Northbrook], v. 51, p. 83–88, jul. 1994.

FARIA-PINTO, Priscila et al. ATP diphosphohydrolase from *Schistosoma mansoni* egg: characterization of a new antigen. **Parasitology**. [Londres], v. 129, n. 1, p. 51–57, jan. 2004. Disponível em: < doi: 10.1017/S0031182004005244 >. Acesso em: 30 nov. 2013.

FARIA-PINTO, Priscila et al. Cross-immunoreactivity between anti-potato apyrase antibodies and mammalian ATP diphosphohydrolases: potential use of the vegetal protein in experimental schistosomiasis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. Rio de Janeiro, v. 101, suppl.1, p. 359–363, out. 2006. Disponível em: < doi:10.1590/S0074-02762006000900059 >. Acesso em: 30 nov. 2013.

FARIA-PINTO, Priscila et al. Detection of IgG1 and IgG4 subtypes reactive against potato apyrase in schistosomiasis patients. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. Rio de Janeiro, v.105, n. 4 ,p. 370-373, jul. 2010. Disponível em: < doi: 10.1590/S0074-02762010000400004 >. Acesso em: 30 nov. 2013.

FARIA-PINTO, Priscila et al. Mapping of the conserved antigenic domains shared between potato apyrase and parasite ATP diphosphohydrolases: potential application in human parasitic diseases. **Parasitology**. [Londres], v. 135, n. 8, p. 943-953, 2008. Disponível em: < doi: 10.1017/S0031182008004538. Acesso em: 30 nov. 2013.

FENWICK, Gruffydd Roger; LUTOMSKI, Jerzy; NIEMAN, C. Liquorice, *Glycyrrhiza glabra* L. composition, uses and analysis. **Food Chemistry**. [Barking], v. 38, n. 2, p. 119-143, 1990. Disponível em: < doi:10.1016/0308-8146(90)90159-2 >. Acesso em: 14 mar. 2014.

FONTES, Lívia Beatriz de Almeida et al. Immunomodulatory effects of licochalcone A on experimental autoimmune encephalomyelitis. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**. [West Sussex], v. 66, n. 6, p. 886-894, jun. 2014. Disponível em: < doi: 10.1111/jphp.12212 >. Acesso em: 18 mar. 2014.

FOSTER, Robert; CHEETHAM, B. L. Studies with the schistosomicide oxamniquine (UK-4271). I: activity in rodents and *in vitro*. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine Hygiene**. [Londres], v. 67, n. 5, p. 674-684, 1973. Disponível em: < doi: 10.1016/ 0035-9203(73)900382 >. Acesso em: 14 mar. 2014.

FREZZA, Tarsila Ferraz et al. Tegumentary changes in two different strains of *Schistosoma mansoni* treated with arteminisin and artesunic acid. **Revista de Patologia Tropical**. Goiás, v.42, n. 3, p. 309-321, jul./ set. 2013. Disponível em: < doi: 10.5216/rpt.v42i3.26930 >. Acesso em: 14 mar. 2014.

FROTA, Sabrina Menezes da et al. Combination of Kato–Katz faecal examinations and ELISA to improve accuracy of diagnosis of intestinal schistosomiasis in a low-endemic setting in Brazil. **Acta Tropica**. [Amsterdam], v.120, Suppl. 1, p. S138–S141, set. 2011. Disponível em: < doi:10.1016/j.actatropica.2010.05.007 >. Acesso em: 14 mar. 2014.

FU, Boqiang et al. Isolation and identification of flavonoids in licorice and a study of their inhibitory effects on tyrosinase. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. [Washington], v. 53, n. 19, p. 7408-7414, set. 2005. Disponível em: < doi: 0.1021/jf051258h >. Acesso em: 14 mar. 2014.

FU, Yue et al. Licochalcone-A, a novel flavonoid isolated from licorice root (*Glycyrrhiza glabra*), causes G2 and late-G1 arrests in androgen-independent PC-3 prostate cancer cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. [Nova York], v. 322, n. 1, p. 263–270, set. 2004. Disponível em: < doi:10.1016/j.bbrc.2004.07.094 >. Acesso em: 14 mar. 2014.

FUKAI, Toshio et al. Anti-*Helicobacter pylori* flavonoids from licorice extract. **Life Sciences**. [Oxford], v. 71, n. 12, p.1449–1463, ago. 2002. Disponível em: < doi:10.1016/S0024-3205(02)01864-7 >. Acesso em: 18 mai. 2013.

FUNAKOSHI-TAGO, Megumi et al. Licochalcone A is a potent inhibitor of TEL-Jak2-mediated transformation through the specific inhibition of Stat3 activation. **Biochemical pharmacology**. [Oxford], v. 76, n. 12, p. 1681 – 1693, dez. 2008. Disponível em: < doi:10.1016/j.bcp.2008.09.012 >. Acesso em: 14 mai. 2013.

FUNAKOSHI-TAGO, Megumi et al. Licochalcone A potently inhibits TNFalpha-induced NF-kappaB activation through the direct inhibition of IKK activation. **Molecular Pharmacology**. [Nova York], v. 76, n. 4, p. 745–53, out. 2009b. Disponível em: < doi: 10.1124/mol.109.057448 >. Acesso em: 18 mai. 2013.

FUNAKOSHI-TAGO, Megumi et al. The fixed structure of Licochalcone A by α , β -unsaturated ketone is necessary for anti-inflammatory activity through the inhibition of NF- κ B activation. **International Immunopharmacology**. [Amsterdam], v.10, n. 5, p. 562–571, mai. 2009a. Disponível em: < doi: 10.1016/j.intimp.2010.02.003 >. Acesso em: 18 mai. 2013.

FURUHASHI, Ikue et al. Inhibition by licochalcone A, a novel flavonoid isolated from liquorice root, of IL-1 β -induced PGE2 production in human skin fibroblasts. **The Journal of Pharmacy and Pharmacology**. [Londres], v. 57, n. 12, p. 1661–1666, dez. 2005. Disponível em: < doi:10.1211/jpp.57.12.0017 >. Acesso em: 06 abr. 2013.

FURUSAWA, Jun-ichi et al. *Glycyrrhiza inflata*-derived chalcones, Licochalcone A, Licochalcone B and Licochalcone D, inhibit phosphorylation of NF- κ B p65 in LPS signaling pathway. **International Immunopharmacology**. [Amsterdam], v. 9, n. 4, p. 499–507, abr. 2009a. Disponível em: < doi:10.1016/j.intimp.2009.01.031 >. Acesso em: 01 jun. 2013.

FURUSAWA, Jun-ichi et al. Licochalcone A significantly suppresses LPS signaling pathway through the inhibition of NF- κ B p65 phosphorylation at serine 276. **Cellular signalling**. [Oxford], v. 21, n. 5, p.778–785, mai. 2009b. Disponível em: < doi: 10.1016/j.cellsig.2009.01.021>. Acesso em: 12 ago. 2013.

GAO, Ting et al. Identification of medicinal plants in the family *Fabaceae* using a potential DNA barcode ITS2. **Journal of Ethnopharmacology**. [Limerick], v. 130, n. 1, p. 116–121, jul. 2010. Disponível em: < doi: 10.1016/j.jep.2010.04.026 >. Acesso em: 08 jul. 2013.

GENDRON, Fernand-Pierre et al. Purine signaling and potential new therapeutic approach: possible outcomes of NTPDase inhibition. **Current Drug Targets**. [Hilversum], v. 3, n. 3, p. 229-245, jun. 2002. Disponível em: < doi: 10.2174/1389450013348227 >. Acesso em: 14 mar. 2014.

GONÇALVES, Margareth M. L. Et al. Immunoassays as an auxiliary tool for the serodiagnosis of *Schistosoma mansoni* infection in individuals with low intensity of egg elimination. **Acta Tropica**. [Oxford], v. 100, n. 1-2, p. 24–30, nov. 2006. Disponível em: < doi:10.1016/j.actatropica.2006.09.004 >. Acesso em: 14 mar. 2014.

GRAY, Darren J. et al. Clinical review: Diagnosis and management of schistosomiasis. **British medical journal**. [Londres], v. 342, p. d2651-d2661, mai. 2011. Disponível em: < doi: 10.1136/bmj.d2651>. Acesso em: 22 mar. 2013.

GRYSEELS, Bruno et al. Immune-epidemiology of *Schistosoma mansoni* infections in recently exposed community in Senegal. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. Rio de Janeiro, v. 90, n. 2, p. 271-276, mar./abr. 1995.

GRYSEELS, Bruno et al. Human schistosomiasis. **The Lancet**. [Londres], v.368, n. 9541, p. 1106–1118, set. 2006. Disponível em: < doi: 10.1016/S0140-6736(06)69440-3 >. Acesso em: 11 mar. 2013.

GURIB-FAKIM, Ameenah. Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. **Molecular Aspects of Medicine**. [Oxford], v. 27, n. 1, p.1–93, fev. 2006. Disponível em: < doi:10.1016/j.mam.2005.07.008 >. Acesso em: 14 mar. 2013.

HAMILTON, Joanne V.; KLINKERT, Mo-Quen; DOENHOFF, Michael J. Diagnosis of schistosomiasis: antibody detection, with notes on parasitological and antigen detection methods. **Parasitology**. [Londres], v. 117, Suppl., p. S41–S57, 1998.

HAMZA, Rania S.; METWALY, Ashraf S.; EL-MAATY, Dalia A. Abo. Effects of Artemether treatment on prepatent and patent *Schistosoma mansoni* infection in experimentally infected mice. **Parasitologists United Journal**. [Cairo], v.5, n.2, p.147-154, 2012.

HANDA, Masahisa; GUIDOTTI, Guido. Purification and cloning of soluble ATP diphosphohydrolase (apyrase) from potato tuber (*Solanum tuberosum*). **Biochemical and Biophysical Research Communications**. [Nova York], v. 218, n. 3, p. 916-923, jan. 1996. Disponível em: < doi:10.1006/bbrc.1996.0162 >. Acesso em: 01 dez. 2013.

HARAGUCHI, Haraguchi et al. Antioxidative and superoxide scavenging activities of retrochalcones in *Glycyrrhiza inflata*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**. [Oxford], v. 6, n. 3, p. 339–347, mar. 1998a. Disponível em: < doi:10.1016/S0968-0896(97)10034-7 >. Acesso em: 12 mar. 2013.

HARAGUCHI, Haraguchi et al. Mode of antibacterial action of retrochalcones from *Glycyrrhiza inflata*. **Phytochemistry**. [Oxford], v. 48, n. 1, p.125-129, mai. 1998b. Disponível em: < doi:10.1016/S0031-9422(97)01105-9 >. Acesso em: 06 mar. 2013.

HARNETT, William. The anthelmintic action of praziquantel. **Parasitology Today**. [Amsterdam], v.4, n.5, p.144 -146, mai. 1988. Disponível em: < doi:10.1016/0169-4758(88)90192-5 >. Acesso em: 08 mar. 2013.

HATANO, Tsutomu et al. Two new flavonoids and other constituents in licorice root: their relative astringency and radical scavenging effects. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**. [Tóquio], v. 36, n.6, p. 2090-2097, jun. 1988. Disponível em: < doi: 10.1248/cpb.36.2090 >. Acesso em: 14 mar. 2013.

HATANO, Tsutomu et al. Correlation of phenolic constituents and licorice specimens from various sources, and inhibitory effects of licorice extracts on xanthine oxidase and monoamine oxidase. **Journal of the Pharmaceutical Society of Japan**. [Tóquio], v. 111, n.6, p. 311-321, jun. 1991.

HAYESHI, Rose et al. The potential inhibitory effect of antiparasitic drugs and natural products on P-glycoprotein mediated efflux. **European journal of pharmaceutical sciences**. [Amsterdam], v. 29, n. 1, p. 70–81, set. 2006. Disponível em: < doi:10.1016/j.ejps.2006.05.009 >. Acesso em: 08 abr. 2014.

HEGNAUER, Robert; GRAYER-BARKMEIJ, Renée J. Relevance of seed polysaccharides and flavonoids for the classification of the *Leguminosae*: a chemotaxonomic approach. **Phytochemistry**. [Oxford], v. 34, n.1, p. 3-16, ago. 1993. Disponível em: < doi:10.1016/S0031-9422(00)90776-3 >. Acesso em: 24 mai. 2013.

HERMETO, Marco Victor et al. Oogram studies in mice infected with *Schistosoma mansoni* and treated with dexamethasone. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**. São Paulo, v. 36, n. 2, p. 99-104, mar./ abr. 1994. Disponível em: < doi 10.1590/S0036-46651994000200001 >. Acesso em: 19 mar. 2013.

HILLMAN, Gilbert R.; GIBLER, W. Brian; CHU, Shih-Hsi. Fluorescent probes of acetylcholine binding sites-indicators of drug action in *Schistosoma mansoni*. **Biochemical Pharmacology**. [Oxford], v. 25, n. 22, p. 2529–2535, nov. 1976. Disponível em: < doi:10.1016/0006-2952(76)90460-3 >. Acesso em: 01 abr. 2013.

HILLMAN, Gilbert R.; SENFT, Alfred W.; GIBLER, W. Brian. The mode of action of hycanthonne revisited. **Journal of Parasitology**. [Lawrence], v. 64, n. 4, p. 754-756, ago. 1978.

HILLYER, George V.; REYES, Clara N.; HERNÁNDEZ-ALMENAS, Nilda. Nicarbazin in schistosome infections: I. Antibody formation in mice and hamsters infected with *Schistosoma mansoni*. **Experimental Parasitology**. [Nova York], v. 37, n. 3, p. 442 – 448, jun. 1975. Disponível em: < doi:10.1016/0014-4894(75)90014-4 >. Acesso em: 19 mar. 2013.

HOLTFRETER, Martha Charlotte et al. *Schistosoma mansoni*: Schistosomicidal effect of mefloquine and primaquine *in vitro*. **Experimental Parasitology**. [Orlando], v. 127, n. 1, p. 270-276, jan. 2011. Disponível em: < doi:10.1016/j.exppara.2010.08.008 >. Acesso em: 12 mar. 2014.

IBRAHIM, Ragai K.; ANZELLOTTI, Dominique. The enzymatic basis of flavonoid biodiversity. In: ROMEO, J. T. **Integrative Phytochemistry: from ethnobotany to molecular ecology**. Oxford: Elsevier Science, 2003. p. 1- 36.

INSTITUTO OSWALDO CRUZ. Histórico da vacina Sm14. **Arquivo de Notícias**. Rio de Janeiro, jun. 2012. Disponível em: < <http://www.fiocruz.br/ioc/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?infoid=1495&sid=32>>. Acesso em: 20 set 2013.

ISMAIL, Magdi et al. Resistance to praziquantel: direct evidence from *Schistosoma mansoni* isolated from Egyptian villagers. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. [Northbrook], v. 60, n. 6, p. 932-935, jun. 1999.

JAGANATHAN, Saravana Kumar. Can flavonoids from honey alter multidrug resistance? **Medical Hypotheses**. [Nova York], v. 76, n. 4, p. 535–537, abr. 2011. Disponível em: < doi:10.1016/j.mehy.2010.12.011 >. Acesso em: 24 fev. 2014.

JAMES, Catherine E.; HUDSON, Amanda L.; DAVEY, Mary W. An update on P-glycoprotein and drug resistance in *Schistosoma mansoni*. **Trends in Parasitology**. [Oxford], v. 25, n.12, p. 538-539, dez. 2009. Disponível em: < doi: 10.1016/j.pt.2009.09.007 >. Acesso em: 02 fev. 2014.

- KAJIYAMA, Kiichiro et al. Two prenylated retrochalcones from *Glycyrrhiza inflata*. **Phytochemistry**. [Oxford], v. 31, n.9, p. 3229-3232, set. 1992. Disponível em: < doi: 10.1016/0031-9422(92)83481-D >. Acesso em: 06 mar. 2013.
- KALCKAR, Herman M. Adenylpyrophosphatase and myokinase. **The Journal of Biological Chemistry**. [Rockville], v. 153, p. 355–367, mai. 1944.
- KASINATHAN, Ravi S. et al. Modulation of a *Schistosoma mansoni* multidrug transporter by the antischistosomal drug praziquantel. **The FASEB Journal**. [Bethesda], v. 24, n.1, p. 128 – 135, jan. 2010. Disponível em: < doi: 10.1096/fj.09-137091 >. Acesso em: 11 jan. 2014.
- KASS, Ernst; WINK, Michael. Molecular evolution of the *Leguminosae*: phylogeny of the three subfamilies based on *rbcl*-sequences. **Biochemical Systematics and Ecology**. [Oxford], v. 24, n.5, p. 365-378, jul. 1996. Disponível em: < doi: 10.1016/0305-1978(96)00032-4 >. Acesso em: 12 mar. 2013.
- KATZ, Naftale, CHAVES, Adelú; PELLEGRINO, José. A simple device for quantitative stool thick-smear technique in schistosomiasis mansoni. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. São Paulo, v. 14, n. 6, p. 397–400, nov./ dec.,1972.
- KATZ, Naftale; COELHO, Paulo Marcos Zech. Clinical therapy of schistosomiasis mansoni: The brazilian contribution. **Acta Tropica**. [Amsterdam], v. 108, n. 2-3, p. 72–78, nov./ dec. 2008. Disponível em: < doi:10.1016/j.actatropica.2008.05.006 >. Acesso em: 14 mar. 2014.
- KATZ, Naftale. Esquistossomose. In: CIMERMAN, S. CIMERMAN, B. 2003. **Medicina Tropical**. São Paulo: Ed. Atheneu, 2003. p. 175 -183.
- KAYSER, Oliver; KIDERLEN, Albrecht F.; CROFT, Simon L. Natural products as potential antiparasitic drugs. **Parasitology Research**. [Berlim], v. 90, suppl. 2, p. S55 – S62, jun. 2003. Disponível em: < doi: 10.1007/s00436-002-0768-3 >. Acesso em: 30 abr. 2013.
- KIM, Soon Nam et al. Licochalcone A inhibits the formation and bone resorptive activity of osteoclasts. **Cell Biology International**. [Londres], v. 32, n. 9, p. 1064-1072, set. 2008. Disponível em: < doi: 10.1016/j.cellbi.2008.04.017 >. Acesso em: 04 abr. 2013.
- KIM, Yoon Hee et al. Antiangiogenic effect of licochalcone A. **Biochemical Pharmacology**. [Oxford], v. 80, n. 8, p. 1152–1159, out. 2010. Disponível em: < doi: 10.1016/j.bcp.2010.07.006 >. Acesso em: 14 mar. 2014.
- KLAYMAN, Daniel L. Qinghaosu (artemisinin): an antimalarial drug from China. **Science**. [Lancaster], v. 228, n. 4703, p. 1049-1055, mai. 1985. Disponível em: < doi:10.1126/science.3887571 >. Acesso em: 14 mar. 2014.

KONGS, Anne et al. The unreliability of the Kato–Katz technique limits its usefulness for evaluating *S. mansoni* infections. **Tropical Medicine and International Health**. [Oxford], v.6, n. 3, p. 163–169, mar. 2001. Disponível em: < doi: 10.1046/j.1365-3156.2001.00687.x >. Acesso em: 14 mar. 2014.

KUMAR, Vijay; GRYSEELS, Bruno. Use of praziquantel against schistosomiasis: a review of current status. **International Journal of Antimicrobial Agents**. [Amsterdam], v. 4, n. 4, p. 313-320, 1994. Disponível em: < doi: 10.1016/0924-8579(94)90032-9 >. Acesso em: 14 mar. 2014.

KUSEL, Jonh R.; MCVEIGH, Paul; THORNHILL, Joyce A. The schistosome excretory system: a key to regulation of metabolism, drug excretion and host interaction. **Trends in Parasitology**. [Oxford], v. 25, n.8, p. 353-358, ago. 2009. Disponível em: < doi: 10.1016/j.pt.2009.05.003 >. Acesso em: 14 mar. 2014.

LAWN, Stephen D.; LUCAS, Sebastian B.; CHIODINI Peter L. Case report: *Schistosoma mansoni* infection: failure of standard treatment with praziquantel in a returned traveler. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine Hygiene**. [Londres], v. 97, n. 1, p. 100-101, jan./ fev. 2003. Disponível em: < doi: 10.1016/S0035-9203(03)900381 >. Acesso em: 08 mar. 2013.

LE, Wen-Jing et al. Studies on the efficacy of artemether in experimental schistosomiasis. **Acta Pharmacologica Sinica**. [Beijing], v. 17, n. 3, p. 187-193, mar. 1982.

LEE, Chang Ki et al. Licochalcone A inhibits the growth of colon carcinoma and attenuates cisplatin-induced toxicity without a loss of chemotherapeutic efficacy in mice. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**. [Oxford], v. 103, n. 1, p. 48–54, jul. 2008. Disponível em: < doi: 10.1111/j.1742-7843.2008.00238.x >. Acesso em: 14 mar. 2014.

LEE, Harry G.; MICHAELS, Rhoda M. *In vitro* and *in vivo* effects of selected metabolic inhibitors and chemotherapeutic agents on adults and egg development of *Schistosoma mansoni*. **Experimental Parasitology**. Nova York, v. 22, n. 2, p. 256-263, abr. 1968. Disponível em: < doi:10.1016/0014-4894(68)90101-X >. Acesso em: 14 mar. 2014.

LEE, Yeon Sil et al. Aldose reductase inhibitory compounds from *Glycyrrhiza uralensis*. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**. [Tóquio], v. 33, n.5, p. 917–921, 2010. Disponível em: < doi: 10.1248/bpb.33.917 >. Acesso em: 14 mar. 2014.

LEGUME PHYLOGENY WORKING GROUP. Legume phylogeny and classification in the 21st century: progress, prospects and lessons for other species-rich clades. **Taxon**. [Berlim], v. 62, n. 2, p. 217–248, abr. 2013. Disponível em: < doi: 10.5061/dryad.r5k63 >. Acesso em: 21 jun. 2013.

LEGUME PHYLOGENY WORKING GROUP. Towards a new classification system for legumes: Progress report from the 6th International Legume Conference. **South African Journal of Botany**. [Somerset West], v. 89, p. 3 – 9, nov. 2013. Disponível em: < doi:10.1016/j.sajb.2013.07.022 >. Acesso em: 21 jun. 2013.

LESCANO, Susana Zevallos et al. Atividade antiparasitária do artemether na esquistossomose mansônica experimental. **Revista de Saúde Pública**. São Paulo, v.38, n.1, p. 71-75, fev. 2004. Disponível em: < doi: 10.1590/S0034-89102004000100010 >. Acesso em: 01 jul. 2013.

LEVANO-GARCIA, Júlio et al. Characterization of *Schistosoma mansoni* ATPDase2 gene, a novel apirase family member. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. São Diego, v. 352, n. 2, p. 384–389, jan. 2007. Disponível em: < doi:10.1016/j.bbrc.2006.11.023 >. Acesso em: 14 nov. 2013.

LIANG, You–Sheng et al. Adult worm tegumental damage and egg-granulomas in praziquantel-resistant and -susceptible *Schistosoma mansoni* treated *in vivo*. **Journal of Helminthology**. [Londres], v. 76, n. 4, p. 327–333, dez. 2002.

LIANG, You–Sheng et al. *In vitro* responses of praziquantel-resistant and –susceptible *Schistosoma mansoni* to praziquantel. **International Journal for Parasitology**. [Oxford], v. 31, n. 11, p. 1227-1235, set. 2001. Disponível em: < doi: 10.1016/S0020-7519(01)00246-6 >. Acesso em: 30 abr. 2013.

LIN, Dan-Dan et al. Routine Kato–Katz technique underestimates the prevalence of *Schistosoma japonicum*: A case study in an endemic area of the People's Republic of China. **Parasitology International**. [Amsterdam], v. 57, n. 3, p. 281–286, set. 2008. Disponível em: < doi:10.1016/j.parint.2008.04.005 >. Acesso em: 14 mar. 2014.

LIU, Mei et al. Structure–activity relationships of antileishmanial and antimalarial chalconas. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**. [Oxford], v. 11, n. 3, p. 2729–2738, jul. 2003. Disponível em: < doi:10.1016/S0968-0896(03)00233-5 >. Acesso em: 09 jul. 2013.

LOTFY, Wael M. et al. Application and evaluation of a molecular approach for detection of the schistosomicidal effect of Mirazid_ (myrrh) in the murine model. **Journal of Advanced Research**. [Giza], v. 4, n. 6, p. 563–567, nov. 2013. Disponível em: < doi:10.1016/j.jare.2012.08.012 >. Acesso em: 22 mai. 2013.

LOWRY, Oliver H. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **The Journal of Biological Chemistry**. [Baltimore], v. 193, n. 1, p. 265–275, nov. 1951.

MAGALHÃES, Lizandra G. et al. *In vitro* schistosomicidal activity of curcumin against *Schistosoma mansoni* adult worms. **Parasitology Research**. [Berlim], v. 104, n. 5, p. 1197–1201, abr. 2009. Disponível em: < doi: 10.1007/s00436-008-1311-y >. Acesso em: 09 abr. 2014.

MANTAWY, Mona Mohamed; ALI, Hanan Farouk; RIZK, Maha Zaki. Therapeutic effects of *Allium sativum* and *Allium cepa* in *Schistosoma mansoni* experimental infection. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. São Paulo, v. 53, n. 3, p. 155-163, mai./ jun. 2011. Disponível em: < doi: 10.1590/S0036-46652011000300007 >. Acesso em: 23 mar. 2013.

MANTAWY, Mona Mohamed et al. Antioxidant and schistosomicidal effect of *Allium sativum* and *Allium cepa* against *Schistosoma mansoni* different stages. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**. [Roma], v. 16, Suppl 3, p. 69-80, jul. 2012.

MATI, Vitor L.T.; FREITAS, Rivelilson M.; MELO, Alan L. Effects of pentoxifylline during *Schistosoma mansoni* infection in Swiss mice: an analysis of worm burden, fecundity and liver histopathology. **Journal of Helminthology**. [Londres], v. 84, n. 4, p. 348–354, dez. 2010. Disponível em: < doi: 10.1017/S0022149X09990733 >. Acesso em: 19 jul. 2013.

MELMAN, Sandra D. et al. Reduced susceptibility to praziquantel among naturally occurring Kenyan isolates of *Schistosoma mansoni*. **PLoS Neglected Tropical Diseases**. [São Francisco], v. 3, n. 8, p. e504, ago. 2009. Disponível em: < doi: 10.1371/journal.pntd.0000504 >. Acesso em: 08 mar. 2013.

MELO, Nathalya I. de et al. Schistosomicidal Activity of the Essential Oil of *Ageratum conyzoides* L. (Asteraceae) against Adult *Schistosoma mansoni* Worms. **Molecules**. [Basel], v. 16, n. 1, p. 762-773, jan. 2011. Disponível em: < doi: 10.3390/molecules16010762 >. Acesso em: 01 ago. 2013.

MESSERLI, Shanta M. et al. *Schistosoma mansoni* P-glycoprotein levels increase in response to praziquantel exposure and correlate with reduced praziquantel susceptibility. **Molecular and Biochemical Parasitology**. [Amsterdam], v. 167, n. 1, p. 54–59, set. 2009. Disponível em: < doi:10.1016/j.molbiopara.2009.04.007 >. Acesso em: 12 mar. 2013.

MESSIER Céline; GRENIER Daniel. Effect of licorice compounds licochalcone A, glabridin and glycyrrhizic acid on growth and virulence properties of *Candida albicans*. **Mycoses**. [Berlim], v. 54, n. 6, p. e801–806, nov. 2011. Disponível em: < doi: 10.1111/j.1439-0507.2011.02028.x >. Acesso em: 21 jun. 2013.

MICHAELS, Rhoda M. Mating of *Schistosoma mansoni* *in Vitro*. **Experimental Parasitology**. [Nova York], v. 25, n. 1, p. 58-71, ago. 1969. Disponível em: < doi:10.1016/0014-4894(69)90052-6 >. Acesso em: 08 mai. 2013.

MOLNAR, Janos; LORAND, Laszlo. Studies on Apirases. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. [Nova York], v. 93, p. 353–363, mai. 1961.

MORAES, Josué de et al. Anthelmintic activity of carvacryl acetate against *Schistosoma mansoni*. **Parasitology Research**. [Berlim], v. 112, n. 2, p. 603–610, fev. 2013. Disponível em: < doi: 10.1007/s00436-012-3172-7 >. Acesso em: 11 mar. 2014.

MORAES, Josué de et al. Phytol, a diterpene alcohol from chlorophyll, as a drug against neglected tropical disease Schistosomiasis mansoni. **PLOS Neglected Tropical Diseases**. [São Francisco], v. 8, n.1, p. e2617, jan. 2014. Disponível em: < doi : 10.1371/journal.pntd.0002617 >. Acesso em: 30 mai. 2014.

MORAES, Josué de et al. *Schistosoma mansoni*: In vitro schistosomicidal activity of piplartine. **Experimental Parasitology**. [Orlando], v.127,n. 2, p. 357–364, fev. 2011. Disponível em: < doi: 10.1016/j.exppara.2010.08.021 >. Acesso em: 04 ago. 2013.

MORAES, Josué de et al. *Schistosoma mansoni*: In vitro schistosomicidal activity and tegumental alterations induced by piplartine on schistosomula. **Experimental Parasitology**. [Orlando], v. 132, n. 2, p. 222–227, out. 2012. Disponível em: < doi: 10.1016/j.exppara.2012.07.004. >. Acesso em: 04 ago. 2013.

NAGAI, Hidemasa et al. Antispasmodic activity of licochalcone A, a species-specific ingredient of *Glycyrrhiza inflata* roots. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**. [Londres], v. 59, n. 10, p.1421–1426, out. 2007. Disponível em: < doi: 10.1211/jpp.59.10.001 >. Acesso em: 18 jun. 2013.

NDJONKA, Diedonné et al. Natural products as a source for treating neglected parasitic diseases. **International Journal of Molecular Sciences**. [Basel], v. 14, n. 2, p. 3395-3439, fev. 2013. Disponível em: < doi: 10.3390/ijms14023395 >. Acesso em: 30 abr. 2013.

NIELSEN, Simon Feldback et al. Synthesis of antiparasitic licorice chalconas. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**. [Oxford], v. 5, n.5, p. 449-452, mar. 1995. Disponível em: < doi:10.1016/0960-894X(95)00053-V >. Acesso em: 11 ago. 2013.

OKUDA, Takuo. Antioxidants in Herbs: Polyphenols. **Antioxidant Food Supplements in Human Health**. [Waltham], p. 393-410, 1999. Disponível em: < doi:10.1016/B978-012543590-1/50027-5>. Acesso em: 02 mar. 2013.

OLIVEIRA, Fabrícia Alvisi et al. Responses of the surface membrane and excretory system of *Schistosoma mansoni* to damage and to treatment with praziquantel and other biomolecules. **Parasitology**. [Londres], v. 132, n. 3, p. 321–330, mar. 2006. Disponível em: < doi: 10.1017/S0031182005009169 >. Acesso em: 13 mar. 2013.

PARK, Jin-Hee et al. Anti-proliferative effect of Licochalcone A on vascular smooth muscle cells. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**. [Tóquio], v. 31, n.11, p. 1996 – 2000, nov. 2008. Disponível em: < doi: 10.1248/bpb.31.1996 >. Acesso em: 23 mai. 2013.

PARREIRA, Natália A. et al. Antiprotozoal, schistosomicidal and antimicrobial activities of the essential oil from the leaves of *Baccharis dracunculifolia*. **Chemistry and Biodiversity**. [Zürich], v. 7, n. 4, p. 993-1001, abr. 2010. Disponível em: < doi: 10.1002/cbdv.200900292 >. Acesso em: 01 jun. 2014.

PELLEGRINO, José et al. Experimental chemotherapy of *Schistosomiasis mansoni*. **Parasitology Research**. [Berlim], v. 52, n. 2, p.151–168, jul. 1977. Disponível em: < doi: 10.1007/BF00389900 >. Acesso em: 11 jun. 2013.

PELLEGRINO, José; SIQUEIRA, A. F. Técnica de perfusão para colheita de *Schistosoma mansoni* em cobaias experimentalmente infestadas. **Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais**. Rio de Janeiro, v. 8, p. 589-597, 1956.

PENIDO, Marcus Luiz de Oliveira et al. A new series of schistosomicide drugs, the alkylaminoalkanethiosulfuric acids, partially inhibit the activity of *Schistosoma mansoni* ATP diphosphohydrolase. **European Journal of Pharmacology**. [Amsterdam], v. 570, n. 1-3, p. 10-17, set. 2007. Disponível em: < doi:10.1016/j.ejphar.2007.05.028 >. Acesso em: 30 abr. 2014.

PEREIRA, Ana Carolina et al. Schistosomicidal and trypanocidal structure-activity relationships for (+/-)-licarin A and its (-)- and (+)-enantiomers. **Phytochemistry**. [Londres], v. 72, n. 11 – 12, p. 1424–1430, ago. 2011. Disponível em: < doi:10.1016/j.phytochem.2011.04.007 >. Acesso em: 30 abr. 2014.

PHILLIPSON, J.David. Natural products as drugs. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine Hygiene**. [Londres], v. 88, suppl. 1, p. 17–19, 1994. Disponível em: < doi: 10.1016/0035-9203(94)90464-2 >. Acesso em: 13 mar. 2013.

PICA-MATTOCCIA, Livia; CIOLI, Donato. Sex- and stage-related sensitivity of *Schistosoma mansoni* to *in vivo* and *in vitro* praziquantel treatment. **International Journal for Parasitology**. [Oxford], v. 34, n. 4, p. 527 – 533, mar. 2004. Disponível em: < doi:10.1016/j.ijpara.2003.12.003 >. Acesso em: 01 mai. 2013.

PICA-MATTOCCIA Livia; CIOLI Donato. Studies on the mode of action of oxamniquine and related schistosomicidal drugs. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. [Baltimore], v. 34, n. 1, p. 112–118, jan. 1985.

PONTES, Luís André; DIAS-NETO; Emmanuel, RABELLO; Ana. Detection by polymerase chain reaction of *Schistosoma mansoni* DNA in human fecal and serum samples. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. [Northbrook], v. 6, n. 2, p. 157–162, fev. 2002.

PONTES, Luís André et al. Comparison of a polymerase chain reaction and the Kato–Katz technique for diagnosing infection with *Schistosoma mansoni*. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. [Northbrook], v. 68, n. 6, p. 652–656, jun. 2003.

PYRRHO, Alexandre S. et al. Dexamethasone treatment improves morphological and hematological parameters in chronic experimental schistosomiasis. **Parasitology Research**. [Berlim], v. 92, n. 6, p. 478-483, abr. 2004. Disponível em: < doi: 10.1007/s00436-004-1078-8 >. Acesso em: 11 mar. 2013.

QUAN, Hain-Yan; BAEK, Nam In; CHUNG, Sung Hyun. Licochalcone A prevents adipocyte differentiation and lipogenesis via suppression of peroxisome proliferator-activated receptor γ and sterol regulatory element-binding protein pathways. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. [Washington], v. 60, n. 20, p. 5112–5120, mai. 2012. Disponível em: < doi: 10.1021/jf2050763 >. Acesso em: 11 mar. 2013.

QUAN, Hain-Yan et al. Licochalcone A regulates hepatic lipid metabolism through activation of AMP-activated protein kinase. **Fitoterapia**. [Amsterdam], v. 86, p. 208–216, abr. 2013. Disponível em: < doi: 10.1016/j.fitote.2013.03.005 >. Acesso em: 28 ago. 2013.

RABELO, Ana Lúcia Teles et al. Stool examination and rectal biopsy in the diagnosis and evaluation of therapy of schistosomiasis mansoni. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. São Paulo, v. 34, n. 6, p. 601–608, nov./dez.1992. Disponível em: < 10.1590/S0036-46651992000600016 >. Acesso em: 06 mai. 2013.

RIBEIRO, Fabio et al. Synergistic action of praziquantel and host specific immune response against *Schistosoma mansoni* at different phases of infection. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. São Paulo, v. 46, n. 4, p. 231-233, jul./ago. 2004. Disponível em: < 10.1590/S0036-46652004000400010 >. Acesso em: 16 mar. 2013.

ROBSON, Simon C.; SEVIGNY, Jean; ZIMMERMANN, Herbet. The E-NTPDase family of ectonucleotidases: structure function relationships and pathophysiological significance. **Purinergic Signalling**. [Dordrecht], v. 2, n. 2, p. 409-430, jun. 2006. Disponível em: < doi: 10.1007/s11302-006-9003-5 >. Acesso em: 01 mar. 2014.

ROFATTO, Henrique K. et al. Immunization with tegument nucleotidases associated with a subcurative praziquantel treatment reduces worm burden following *Schistosoma mansoni* challenge. **PeerJ**. [Corte Madera], v. 1, p. e58, abr. 2013. Disponível em: < doi: 10.7717/peerj.58 >. Acesso em: 01 mar. 2014.

SABAH, Assim A. et al. *Schistosoma mansoni*: Reduced efficacy of chemotherapy in infected T-cell-deprived mice. **Experimental Parasitology**. [Nova York], v. 60, n. 6, p. 348-354, dez. 1985. Disponível em: < doi:10.1016/0014-4894(85)90041-4 >. Acesso em: 15 abr. 2013.

SABAH, Assim A. et al. *Schistosoma mansoni*: Chemotherapy of infections of different ages. **Experimental Parasitology**. [Nova York], v. 61, n. 3, p. 294-303, jun. 1986. Disponível em: < doi:10.1016/0014-4894(86)90184-0 >. Acesso em: 15 abr. 2013.

SAITOH, Tamotsu; SHIBATA, Shoji. New type chalcones from licorice root. **Tetrahedron Letters**. [Oxford], v. 16, n. 50, p. 4461 – 4462, 1975. Disponível em: < doi: 10.1016/S0040-4039(00)91092-X >. Acesso em: 15 mar. 2013.

SAITOH, Tamotsu; SHIBATA, Shoji; SANKAWA, Ushio. Biosynthesis of echinatin. A new biosynthetic scheme of retrochalcone. **Tetrahedron Letters**. [Oxford], v. 16, n. 50, p. 4463 – 4466, 1975. Disponível em: < doi:10.1016/S0040-4039(00)91093-1 >. Acesso em: 15 mar. 2013.

SANDERSON, Lisa; BARTLETT, Ann; WHITFIELD, Phil J. *In vitro* and *in vivo* studies on the bioactivity of a ginger (*Zingiber officinale*) extract towards adult schistosomes and their egg production. **Journal of Helminthology**. [Londres], v. 76, n. 3, p. 241-247, set. 2002. Disponível em: < doi: http://dx.doi.org/10.1079/JOH2002116 > . Acesso em: 14 mar. 2013.

SATO, Hideyuki; KUSEL, John Robert; THORNHILL, Joyce. Excretion of fluorescent substrates of mammalian multidrug resistance-associated protein (MRP) in the *Schistosoma mansoni* excretory system. **Parasitology**. [Londres], v. 128, n. 1, p. 43–52, jan. 2004. Disponível em: < doi: http://dx.doi.org/10.1017/S0031182003004177 >. Acesso em: 15 mai. 2014.

SATO, Hideyuki; KUSEL, John Robert; THORNHILL, Joyce. Functional visualization of the excretory system of adult *Schistosoma mansoni* by the fluorescent marker resorufin. **Parasitology**. [Londres], v. 125, n. 6, p. 527-535, dez. 2002. Disponível em: < doi: http://dx.doi.org/10.1017/S0031182002002536 >. Acesso em: 15 mai. 2014.

SHAW, John R. *Schistosoma mansoni*: Pairing *in vitro* and development of females from single sex infections. **Experimental parasitology**. [Nova York], v. 41, n. 1, p. 54-65, fev. 1977. Disponível em: < doi:10.1016/0014-4894(77)90129-1 >. Acesso em: 20 mar. 2014.

SHAW, Michael K.; ERASMUS, David A. *Schistosoma mansoni*: Praziquantel-induced changes to the female reproductive system. **Experimental parasitology**. [Nova York], v. 65, n. 1, p. 31-42, fev. 1988. Disponível em: < doi:10.1016/0014-4894(88)90104-X >. Acesso em: 20 mar. 2014.

SHIRAZIAN, Djamshid et al. Mating preference in *Schistosoma mansoni*. **Journal of Chemical Ecology**. [Nova York], v. 12, n.8, p.1713-1723, ago. 1986. Disponível em: < doi: 10.1007/BF01022376 >. Acesso em: 30 abr. 2014.

SILVA, Keyça Emanuelle Ramos et al. Alternativas terapêuticas no combate à Esquistossomose Mansônica. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**. São Paulo, v. 33, n.1, p. 9-16, jan./ mar. 2012.

SIQUEIRA, Liliane Maria Vidal et al. Evaluation of two coproscopic techniques for the diagnosis of schistosomiasis in a low-transmission area in the state of Minas Gerais, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. Rio de Janeiro, v. 106, n. 7, p. 844-850, nov. 2011. Disponível em: < doi: 10.1590/S0074-02762011000700010 >. Acesso em: 30 mar. 2013.

SOUZA, Felié Pereira Carlos de et al. Esquistossomose mansônica: aspectos gerais, imunologia, patogênese e história natural. **Revista da Sociedade Brasileira de Clínica Médica**. São Paulo, v. 9, n.4, p. 300-307, jul./ago. 2011.

STELMA, Foekje F. et al. Efficacy and side effects of praziquantel in an epidemic focus of *Schistosoma mansoni*. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. [Baltimore], v. 53, n. 2, p. 167–170, ago. 1995.

STELMA, Foekje F. et al. Oxamniquine cures *Schistosoma mansoni* infection in a focus in which cure rates with praziquantel are unusually low. **The Journal of Infectious Diseases**. [Chicago], v. 176, n. 1, p. 304–307, jul.1997.

TADIGOPPULA, Narender et al. Synthesis and insight into the structure–activity relationships of chalcones as antimalarial agents. **Journal of Medicinal Chemistry**. [Washington], v. 56, n. 1, p. 31–45, jan. 2013. Disponível em: < doi: 10.1021/jm300588j >. Acesso em: 24 ago. 2013.

TANIFUJI, Shota et al. Licochalcones suppress degranulation by decreasing the intracellular Ca^{2+} level and tyrosine phosphorylation of ERK in RBL-2H3 cells. **International Immunopharmacology**. [Amsterdam], v. 10, n. 7, p. 769–776, jul. 2010. Disponível em: < doi: 10.1016/j.intimp.2010.04.007 >. Acesso em: 14 mar. 2013.

TAO, Weiwei et al. Comparison of three officinal Chinese pharmacopoeia species of *Glycyrrhiza* based on separation and quantification of triterpene saponins and chemometrics analysis. **Food Chemistry**. [Barking], v. 141, n. 3, p. 1681–1689, dez. 2013. Disponível em: < doi: 10.1016/j.foodchem.2013.05.073 >. Acesso em: 21 mai. 2014.

TAUSSKY, Hertha M., SHORR, Ephrain. A microcolorimetric method for the determination of inorganic phosphorus. **The Journal of Biological Chemistry**. [Baltimore], v. 202, n. 2, p. 675–685, jun. 1953.

TENDLER, Miriam; SIMPSON, Andrew J. G. The biotechnology-value chain: Development of Sm14 as a schistosomiasis vaccine. **Acta Tropica**. [Amsterdam], v. 108, n. 2-3, p. 263–266, nov./dez. 2008. Disponível em: < doi: 10.1016/j.actatropica.2008.09.002 >. Acesso em: 14 mar. 2013.

TOMOSKY-SYKES, Thomas Keith; BUEDING, Ernest. Effects of hycanthonone on neuromuscular systems of *Schistosoma mansoni*. **Journal of Parasitology**. [Lawrence], v. 63, n. 2, p. 259-266, abr. 1977.

TRAVERSO-CORI, Aída; TRAVERSO, Sergio; REYES, Humberto. Different molecular forms of potato apyrase. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. [Nova York], v. 137, n. 1, p. 133–142, mar.1970.

TSUKIYAMA, Ryo-Ichi et al. Antibacterial activity of Licochalcone A against spore-forming bacteria. **Antimicrobial agents and chemotherapy**. [Washington], v. 46, n.5, p. 1226–1230, mai. 2002. Disponível em: < doi: 10.1128/AAC.46.5.1226-1230.2002 >. Acesso em: 01 dez. 2013.

UTZINGER, Jürg et al. Effect of combined treatment with praziquantel and artemether on *Schistosoma japonicum* and *Schistosoma mansoni* in experimentally infected animals. **Acta Tropica**. [Amsterdam], v. 80, n. 1, p. 9–18, set. 2001a. Disponível em: < doi: 10.1016/S0001-706X(01)00138-3 >. Acesso em: 14 mar. 2014.

UTZINGER, Jürg et al. Comparative study of the effects of artemether and artesunate on juvenile and adult *Schistosoma mansoni* in experimentally infected mice. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine Hygiene**. [Londres], v. 96, n. 3, p. 318-323, mai./ jun. 2002. Disponível em: < doi: 10.1016/S0035-9203(02)90110-0 >. Acesso em: 24 mai. 2013.

UTZINGER, Jürg et al. Combination chemotherapy of schistosomiasis in laboratory studies and clinical trials. **Antimicrobial agents and chemotherapy**. [Washington], v. 47, n. 5, p. 1487–1495, mai. 2003. Disponível em: < doi: 10.1128/AAC.47.5.1487-1495.2003 >. Acesso em: 24 mai. 2013

UTZINGER, Jürg et al. From innovation to application: Social–ecological context, diagnostics, drugs and integrated control of schistosomiasis. **Acta Tropica**. [Amsterdam], v. 120, Suppl. 1, p. S121– S137, set. 2011. Disponível em: < doi: 10.1016/j.actatropica.2010.08.020 >. Acesso em: 01 mar. 2013.

UTZINGER, Jürg et al. Oral artemether for prevention of *Schistosoma mansoni* infection: randomised controlled trial. **The Lancet**. [Londres], v. 355, n. 9212, p. 1320–1325, abr. 2000a. Disponível em: < doi: 10.1016/S0140-6736(00)02114-0 >. Acesso em: 13 mar. 2014.

UTZINGER, Jürg et al. The potential of artemether for the control of schistosomiasis. **International Journal for Parasitology**. [Oxford], v. 31, n. 14, p. 1549–1562, dez. 2001b. Disponível em: < doi:10.1016/S0020-7519(01)00297-1 >. Acesso em: 04 mar. 2013.

VALLI, Marília et al. Development of a natural products database from the biodiversity of Brazil. **Journal of Natural Products**. [Cincinnati], v. 76, n. 3, p. 439–444, mar. 2013. Disponível em: < doi: 10.1021/np3006875 >. Acesso em: 29 mar. 2013.

VASCONCELOS Eveline Gomes et al. Potato apyrase: a new tool for parasitic disease research. **Fruit, vegetable and cereal science and biotechnology**. [Miki cho], v. 3, n. 1, p. 80-88, 2009.

VASCONCELOS, Eveline Gomes et al. Partial purification and immunohistochemical localization of ATP diphosphohydrolase from *Schistosoma mansoni*. Immunological cross-reactivities with potato apyrase and *Toxoplasma gondii* nucleoside triphosphate hydrolase. **The Journal of Biological Chemistry**. [Baltimore], v. 271, n. 36, p. 22139–22145, set. 1996. Disponível em: < doi: 10.1021/np3006875 >. Acesso em: 14 dez. 2013.

VASCONCELOS, Eveline Gomes et al. Characterization and localization of an ATP-diphosphohydrolase on the external surface of the tegument of *Schistosoma mansoni*. **Molecular and Biochemistry Parasitology**. [Amsterdam], v. 58, n. 2, p. 205–214, abr. 1993.

VAYA, Jacob; BELINKY, Paula A.; AVIRAM, Michael. Antioxidant constituents from licorice roots: isolation, structure elucidation and antioxidative capacity toward LDL oxidation. **Free Radical Biology and Medicine**. [Nova York], v. 23, n. 2, p. 302–313, 1997. Disponível em: < doi:10.1016/S0891-5849(97)00089-0 >. Acesso em: 14 mar. 2014.

WATSON, Megan B. S. Praziquantel. **Journal of Exotic Pet Medicine**. [Nova York], v. 18, n. 3, p. 229-231, jul. 2009. Disponível em: <doi: 10.1053/j.jepm.2009.06.005 >. Acesso em: 14 mar. 2013.

WILLIAM, Samia et al. Praziquantel-induced tegumental damage *in vitro* is diminished in schistosomes derived from praziquantel-resistant infections. **Parasitology**. [Londres], v. 122, n. 1, p. 63–66, jan. 2001. Disponível em: < doi: 10.1017/S0031182000007137 >. Acesso em: 24 mar. 2013.

WINK, Michael; MOHAMED, G. I. A. Evolution of chemical defense traits in the *Leguminosae*: mapping of distribution patterns of secondary metabolites on a molecular phylogeny inferred from nucleotide sequences of the *rbcL* gene. **Biochemical Systematic and Ecology**. [Cidade de Iowa], v. 31, n. 8, p. 897–917, ago. 2003. Disponível em: < doi: 10.1016/S0305-1978(03)00085-1 >. Acesso em: 14 mar. 2014.

WON, Se-Ra et al. Licochalcone A: A lipase inhibitor from the roots of *Glycyrrhiza uralensis*. **Food Research International**. [Londres], v. 40, n. 8, p. 1046–1050, out. 2007. Disponível em: < doi:10.1016/j.foodres.2007.05.005 >. Acesso em: 14 mar. 2014.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). The control of schistosomiasis. **Technical Report Series**. Genebra: World Health Organization, v. 728, 1985. 114p.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Regional office for the Western Pacific. **Research guidelines for evaluating the safety and efficacy of herbal medicines**. Manila: World Health Organization, 1993a. 86p.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. The control of schistosomiasis. **Technical Report Series**. Genebra: World Health Organization, v. 830, 1993b. 85p.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Bench aids for the diagnosis of intestinal parasites**. Geneva: World Health Organization, 1994. 23p.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Traditional Medicine: Growing Needs and Potential. **Policy Perspectives on Medicines**. Geneva: World Health Organization, v.2, mai. 2002. 6p

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Preventive chemotherapy in human helminthiasis**: coordinated use of anthelmintic drugs in control interventions: a manual for health professionals and programme managers. Geneva: World Health Organization, 2006. 63p.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Report of a WHO Informal Consultation**. Elimination of schistosomiasis from low transmission areas. Salvador, Bahia, Brazil, 18-19 August 2008. Geneva: World Health Organization, 2009. 24p.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Schistosomiasis**: progress report 2001 - 2011, strategic plan 2012 - 2020. Geneva: World Health Organization, 2013a. 64 p.
WORLD HEALTH ORGANIZATION. Schistosomiasis: number of people treated in 2011. **Weekly epidemiological record**. Geneva, v. 88, n. 8, 2013b. p. 81 – 88

WU, Wei; WANG, Wei; HUANG, Yi-Xin. New insight into praziquantel against various developmental stages of schistosomes. **Parasitology Research**. [Berlim], v. 109, n. 6, p. 1501–1507, dez. 2011. Disponível em: < doi: 10.1007/s00436-011-2670-3 >. Acesso em: 10 jun. 2013.

XIAO Shuhua et al. Tegumental changes in 21-day-old *Schistosoma mansoni* harboured in mice treated with artemether. **Acta Tropica**. [Amsterdam], v. 75, n. 3, p. 341–348, mai. 2000a. Disponível em: < doi:10.1016/S0001-706X(00)00067-X >. Acesso em: 14 mar. 2013.

XIAO, Shuhua; CATTO, Brian A. *In vitro* and *in vivo* studies of the effect of artemether on *Schistosoma mansoni*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**. [Washington], v. 33, n. 9, p.1557–1562, set. 1989.

XIAO, Shuhua; CATTO; Brian A.; WEBSTER, Leslie T. Effects of praziquantel on different developmental stages of *Schistosoma mansoni in vitro* and *in vivo*. **Journal Infectious Disease**. [Chicago], v. 151, n. 6, p. 1130 – 1137, jun. 1985. Disponível em: < doi: 10.1093/infdis/151.6.1130 >. Acesso em: 14 out. 2013.

XIAO, Shuhua et al. Therapeutic effect of praziquantel enantiomers in mice infected with *Schistosoma mansoni*. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine Hygiene**. [Londres], v. 93, n. 3, p. 324-325, mai./ jun. 1999. Disponível em: < doi: 10.1016/S0035-9203(99)90039-1 >. Acesso em: 14 mar. 2013.

XIAO, Shuhua et al. Artemether administered together with haemin damages schistosomes *in vitro*. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine Hygiene**. [Londres], v. 95, n. 1, p. 67–71, jan./ fev. 2001. Disponível em: < doi:10.1016/S0035-9203(01)90336-0 >. Acesso em: 17 mar. 2013.

XIAO Shuhua et al. Preventive effect of artemether in experimental animals infected with *Schistosoma mansoni*. **Parasitology International**. [Amsterdam], v. 49, n. 1, p. 19–24, mar. 2000b. Disponível em: < doi:10.1016/S1383-5769(00)00028-3 >. Acesso em: 17 mar. 2013.

XIAO, Xiu-ying et al. Licochalcone A inhibits growth of gastric cancer cells by arresting cell cycle progression and inducing apoptosis. **Cancer Letters**. [Limerick], v. 302, n. 1, p. 69–75, mar. 2011. Disponível em: < doi: 10.1016/j.canlet.2010.12.016 >. Acesso em: 04 mai. 2013.

YO, Yi-Te et al. Licorice and Licochalcone-A induce autophagy in LNCaP prostate cancer cells by suppression of Bcl-2 expression and the mTOR pathway. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. [Washington], v. 57, n. 18, p. 8266–8273, set. 2009. Disponível em: < doi: 10.1021/jf901054c >. Acesso em: 04 mai. 2013.

YOON, Goo; KANG, Bok Yun; CHEON, Seung Hoon. Topoisomerase I inhibition and cytotoxicity of licochalcones A and E from *Glycyrrhiza inflata*. **Archives of Pharmacal Research**. [Seoul], v. 30, n. 3, p. 313–316, mar. 2007. Disponível em: < doi: 10.1007/BF02977611 >. Acesso em: 04 mai. 2013.

YOON, Goo et al. Inhibitory effect of chalcones and their derivatives from *Glycyrrhiza inflata* on protein tyrosine phosphatase 1B. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**. [Oxford], v. 19, n. 17, p. 5155–5157, set. 2009. Disponível em: < doi: 10.1016/j.bmcl.2009.07.054 >. Acesso em: 04 jun. 2013.

YU, Chung –Ping et al. Quercetin and rutin reduced the bioavailability of cyclosporine from neoral, an immunosuppressant, through activating P-glycoprotein and CYP 3A4. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. [Washington], v. 59, n. 9, p. 4644–4648, mai. 2011. Disponível em: < doi: 10.1021/jf104786t >. Acesso em: 04 out. 2012.

YUAN, Xuan et al. Licochalcone A-induced human bladder cancer T24 cells apoptosis triggered by mitochondria dysfunction and endoplasmic reticulum stress. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**. [Nova York], v. 2013, p. 1-09, jul. 2013. Disponível em: < doi: 10.1155/2013/474272 >. Acesso em: 25 mai. 2013.

ZHAI, Lin et al. The Antileishmanial agent Licochalcone A interferes with the function of parasite mitochondria. **Antimicrobial Agents and chemotherapy**. [Washington], v. 39, n. 12, p. 2742–2748, dez. 1995.

ZHAI, Lin et al. The antileishmanial activity of novel oxygenated chalcones and their mechanism of action. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. [Londres], v. 43, n. 6, p. 793 – 803, jun. 1999. Disponível em: < doi: 10.1093/jac/43.6.793 >. Acesso em: 11 ago. 2013.

ZHANG, Hai-Chao et al. Up-regulation of licochalcone A biosynthesis and secretion by tween 80 in hairyroot cultures of *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. **Molecular Biotechnology**. [Totowa], v. 47, n. 1, p. 50–56, jan. 2011. Disponível em: <doi: 10.1007/s12033-010-9311-4 >. Acesso em: 24 mai. 2013.

ZHANG, Qingying; YE, Min. Chemical analysis of the Chinese herbal medicine Gan-Cao (licorice). **Journal of Chromatography A**. [Amsterdam], v. 1216, n. 11, p. 1954–1969, mar. 2009. Disponível em: < doi: 10.1016/j.chroma.2008.07.072 >. Acesso em: 25 mai. 2013.

ZHANG, Yuan-Yuan et al. Evaluation of Kato–Katz examination method in three areas with low-level endemicity of schistosomiasis japonica in China: a Bayesian modeling approach. **Acta Tropica**. [Amsterdam], v. 112, n. 1, p. 16–22, out. 2009. Disponível em: < doi: 10.1016/j.actatropica.2009.05.020 >. Acesso em: 14 mar. 2013.

ZIEGLER, Hanne L. et al. The antiparasitic compound licochalcone A is a potent echinocytogenic agent that modifies the erythrocyte membrane in the concentration range where antiplasmodial activity is observed. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. [Washington], v. 48, n.10, p. 4067–4071, out. 2004. Disponível em: < doi: 10.1128/AAC.48.10.4067-4071.2004 >. Acesso em: 30 abr. 2013.

ZUANAZZI, José Angelo Sileira; MONTANHA, Jarbas Alves. Flavonóides. In: SIMÕES, C.M.O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/Editora da UFSC, 2004. p. 577-614.

ANEXO

ANEXO A - Parecer nº 026/2012



UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
PRO-REITORIA DE PESQUISA
Comissão de Ética na Experimentação Animal

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 026/2012 – CEEA sobre “OBTENÇÃO E MANUTENÇÃO DE PARASITO SCHISTOSOMA MANSONI EM CAMUNDONGOS SWISS FÊMEOS PARA EXPERIMENTOS LABORATORIAIS”, projeto de pesquisa sob a responsabilidade de PRISCILA DE FARIA PINTO, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEA) da PRÓ-REITORIA DE PESQUISA/UFJF, em reunião realizada em 20/03/2012. Para o desenvolvimento da pesquisa foram liberados 360 animais, conforme solicitado.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 026/2012- CEEA about “OBTAINING AND MAINTAINING THE SCHISTOSOMA MANSONI PARASITE IN SWISS MICE FEMALES FOR LABORATORY EXPERIMENTS” - PRISCILA DE FARIA PINTO - is in agreement with the Ethical Principles in Animal Research adopted by Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) and was approved by the PRÓ-REITORIA DE PESQUISA/UFJF – ETHICAL COMMITTEE FOR ANIMAL RESEARCH (CEEA) in 20/03/2012. For the development of this research 360 animals were released, as requested

Juiz de Fora, 20 de março de 2012.

Presidente/CEEA

Secretário/CEEA