
Pesquisa Acadêmica

ATIVIDADE ANTI-HELMINTICA DO ÁCIDO MEFENÂMICO EM *SCHISTOSOMA MANSONI*

AUTORES

1. MARCOS PAULO NASCIMENTO DA SILVA

ESTUDANTE DE DOUTORADO

NÚCLEO DE PESQUISA EM DOENÇAS NEGLIGENCIADAS, UNIVERSIDADE
GUARULHOS

marcos.npdn@gmail.com

2. ELOI MARCOS DE OLIVEIRA LAGO

DOUTOR EM CIÊNCIAS

UNIVERSIDADE GUARULHOS

emolago@yahoo.com.br

3. DR. JOSUÉ DE MORAES

ORIENTADOR

NÚCLEO DE PESQUISA EM DOENÇAS NEGLIGENCIADAS, UNIVERSIDADE
GUARULHOS

moraesnpdn@gmail.com

**UNIVERSIDADE UNIVERSUS VERITAS GUARULHOS (UNIVERITAS
UNG)**

RESUMO

O tratamento da esquistossomose, doença parasitária que afeta mais de 200 milhões de pessoas, depende de um único medicamento, o praziquantel. Considerando os revires para o desenvolvimento de um novo fármaco, sobretudo no tocante às “doenças da pobreza”, o reposicionamento de fármacos é uma estratégia promissora. Nesse sentido, estudos prévios do nosso grupo mostraram que o diclofenaco de sódio, um anti-inflamatório não esteroide, possui propriedade anti-helmíntica contra *Schistosoma mansoni*. No presente estudo avaliamos a atividade antiparasitária de diferentes anti-inflamatórios não esteróides (AINEs) em *S. mansoni*. Inicialmente, 73 AINEs foram triados utilizando a estratégia de rastreio fenotípico contra vermes adultos ex vivo. Subsequentemente, os compostos ativos ($< 50 \mu\text{M}$) foram testados in vivo em camundongos infectados com *S. mansoni* nos estágios juvenil e adulto. Cinco AINEs (ácido mefenâmico, ácido tolfenâmico, ácido meclofenâmico, celecoxibe e diclofenaco) afetaram a viabilidade e causaram alterações morfológicas no tegumento dos helmintos. Em conjunto, ácido mefenâmico foi o AINE mais ativo, com concentração letal 50% (CL50) $\sim 10 \mu\text{M}$. Em camundongos, ácido mefenâmico ($5 \times 100 \text{ mg/kg}$) reduziu a carga parasitária (83,9%), o número de ovos (93,6%), assim como a hepatoesplenomegalia. Ademais, o regime posológico utilizado neste estudo para o ácido mefenâmico está em acordo com a posologia comumente utilizada na prática clínica, o que demonstra o potencial de reaproveitamento clínico como um agente antiparasitário na terapia da esquistossomose.

PALAVRAS-CHAVE: Esquistossomose, Anti-inflamatórios não esteroides, Ácido mefenâmico, Reposicionamento de fármacos.

1. INTRODUÇÃO:

As “doenças da pobreza”, formalmente denominadas “doenças negligenciadas”, acometem mais de 1 bilhão de pessoas no mundo. Essas enfermidades são causadas por agentes infecciosos e parasitários que ocorrem nas camadas sociais pobres, sem condições adequadas de moradia, de trabalho, de educação, de serviços sanitários onde contribuem para a manutenção do quadro de desigualdade (WHO, 2017a). Particularmente, as esquistossomoses, denominadas também esquitossomíases ou bilharzioses, são doenças causadas por helmintos

do Gênero *Schistosoma* que, para o homem, têm como os principais agentes etiológicos as espécies *Schistosoma mansoni*, *S. haematobium*, *S. japonicum*, *S. intercalatum* e *S. mekongi*. A esquistossomose é endêmica em mais de 70 países. Estima-se a existência, em todo mundo, de mais de 200 milhões de indivíduos infectados e 800 milhões de pessoas estão expostas ao risco de contrair infecção. Esta helmintose é responsável por 280.000 a 500.000 mortes anualmente (WHO, 2017b., STEINMANN et al., 2016). Atualmente, existe apenas um fármaco utilizado no controle da esquistossomose: o praziquantel (WHO, 2017a., CIOLI et al., 2014). O tratamento com praziquantel é eficaz na redução da morbidade, porém os resultados com o uso deste fármaco têm sido menos promissores do que o esperado; de fato, em alguns locais a taxa de cura tem atingido entre 70% e 90% (GRYSEELS et al, 2009). Além de não atuar nas formas jovens do parasita, existem preocupações quanto à resistência ao fármaco (CIOLI et al, 2014; FENWICH & WEBSTER, 2006). Desta forma, considerando as limitações existentes de apenas um medicamento disponível, justifica-se a pesquisa de novas moléculas para tratamento e profilaxia da esquistossomose. Nesse contexto, a busca por novos compostos com propriedades esquistossomicidas tem aumentado nos últimos anos (DE MORAES J, 2015; SILVA et al 2017; Guerra et al., 2019). Não obstante, fica claro que o desenvolvimento de novos fármacos é dispendioso e pode demorar muitos anos para atingir o mercado. Nesse sentido, uma das alternativas pode estar no “reposicionamento de fármacos”. Esta abordagem consiste basicamente na busca por um novo uso de fármacos já aprovados e disponíveis no mercado. Estudos recentes mostraram o efeito anti-helmíntico do anti-inflamatório não esteroide diclofenaco de sódio (CARVALHO et al ,2014). No caso, partindo de estruturas cristalográficas e utilizando técnicas de bioinformática nota-se que existe uma similaridade estrutural de aproximadamente 70% entre os fármacos praziquantel e diclofenaco, apesar de pertencerem a classes químicas diferentes. Considerando a alta correlação estrutural de um anti-inflamatório com praziquantel, associado a atividade anti-helmíntica relatada com o diclofenaco, destaca-se a necessidade de avaliar o efeito antiparasitário de anti-inflamatórios. Ante o exposto, o presente trabalho tem como objetivo avaliar o efeito de anti-inflamatórios não esteróides em *S. mansoni*.

2. OBJETIVOS:

Avaliar a atividade antiparasitária dos anti-inflamatórios não esteróides em *Schistosoma mansoni*.

3. METODOLOGIA:

2. Materiais e métodos

2.1 Medicamentos e reagentes

Todos os anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) testados (n=73) foram adquiridos na Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). Praziquantel foi adquirido da Merck (São Paulo, SP, Brasil). As soluções de estoque para uso em bioensaios *in vitro* foram preparadas em dimetilsulfóxido (DMSO) a uma concentração de 10 mM. Meio de cultura RPMI 1640, meio M199, soro fetal bovino (FBS) inativado, penicilina G / sulfato de estreptomicina e tampão HEPES foi obtido na Vitrocell (Campinas, SP, Brasil). DMSO e solução de glutaraldeído foram obtidos da Sigma-Aldrich.

2.3 Manutenção do parasita

O ciclo de vida de *Schistosoma mansoni* (linhagem BH) foi mantido usando camundongos e caramujos *Biomphalaria glabrata*, seguindo os procedimentos padrão de nosso laboratório (de Moraes J., 2012). Camundongos Swiss fêmeas, com três semanas de idade, foram inoculados com aproximadamente 120 cercárias coletadas de caramujos *B. glabrata* hospedeiros intermediários infectados por *S. mansoni*.

2.4 Ensaio de fármaco de esquistossomos adulto *in vitro*

Os fármacos foram testados em uma concentração inicial de 50 μ M em RPMI 1640 suplementado com 10% de FBS (Soro Fetal Bovino), 100 U / ml de penicilina e 100 μ g / ml de estreptomicina, dispostos em uma placa de cultura de 24 poços (TPP, St. Louis, MO) com um par de vermes por poço. Os parasitas foram mantidos por 72 h (37 ° C, 5% de CO₂) e sua viabilidade monitorada por avaliação microscópica (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemanha). Os fármacos altamente ativos (efeito $\geq$ 90%) após 72 h a 50 μ M, foram subsequentemente testados em diferentes concentrações variando de 50 a 0,78 μ M para determinação da concentração letal máxima (CL₅₀) (MAFUD et al., 2018).

2.5 Análise por microscopia eletrônica de varredura

Para microscopia eletrônica de varredura, os parasitas grupos controle e tratados foram fixados em glutaraldeído a 2,5% à temperatura ambiente. (GUIMARÃES MA., 2018). As amostras foram metalizadas com ouro usando um revestidor de pulverização Desk II (Denton Vacuum LLC, Moorestown, NJ, EUA) e depois observadas usando microscopia eletrônica de varredura JEOL SM -6460LV de alta resolução (JEOL Ltd., Tokyo, Japão)

2.6 Estudos in vivo

Camundongos fêmeas Swiss com três semanas de idade foram usados para estudos de eficácia de drogas in vivo. Em todos os tratamentos, os camundongos foram infectados subcutaneamente com uma suspensão contendo 80 cercarias de *S. mansoni*. Os medicamentos foram administrados via oral 21 dias (infecção pré-patente) ou 42 dias (infecção patente) em grupos de cinco camundongos. Para o tratamento, os medicamentos foram dissolvidos em etanol a 2% em água (v / v) e administrados em dose única de 400 mg / kg ou em uma dose diária de 100 mg/kg por cinco dias consecutivos, dependendo das informações farmacológicas e toxicológicas do medicamento. Grupos controle infectado por *S. mansoni* receberam uma quantidade correspondente do veículo. Todos os camundongos foram eutanasiados e dissecados 56 dias após a infecção. Os vermes foram então coletados, separados por sexo e contados (PELLEGRINO, 1962). A avaliação da eficácia terapêutica foi posteriormente baseada na técnica de oogramas quantitativos e qualitativos usando um fragmento (10 mm) do cólon ascendente (KATZ et al., 1972), bem como o método Kato Katz para o exame fecal quantitativo (DE MORAES J, 2014).

2.7 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas por Prism 7.0 (GraphPad Software, La Jolla, CA). Todos os dados do ensaio anti-esquistossomático *in vitro* são apresentados como média $\pm$ DP de pelo menos três experiências independentes. Os valores de IC50 foram calculados usando curvas sigmóides de dose-resposta (CAMPELO et al 2017; DE BRITO et al 2017). Para análise experimental in vivo, foi aplicado um teste paramétrico de comparação múltipla de Dunnett. Os gráficos experimentais in vivo representam dados de camundongos individuais e são

expressos como gráficos de dispersão (GUERRA et al 2019). Um valor de $P < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

3.1 RESULTADOS

3.2. Triagem fenotípica *in vitro*

Na primeira etapa, adotando uma estratégia fenotípica de rastreamento de drogas, 73 AINEs (anti-inflamatorios não esteroides) de diferentes classes foram avaliados contra esquistossomos adultos. Desses, identificamos cinco drogas que exibiram atividade esquistossomicida contra vermes adultos a 50 μM , ácido mefenâmico, ácido tolfenâmico, ácido meclofenâmico, celecoxib e diclofenaco. Dessa forma, testamos os medicamentos em uma faixa de concentrações e foram determinados os valores de 50% da concentração letal (CL50). As drogas mais ativas foram: ácido mefenâmico, ácido tolfenâmico e ácido meclofenâmico, com CL50 de 11,01; 20,6 e 24,5 μM , respectivamente, enquanto o celecoxibe e o diclofenaco apresentaram atividade esquistossomicida moderada (LC50 N 25 μM). Além das propriedades físico-químicas e anti-helmínticas, avaliamos o efeito dos cinco fármacos no tegumento dos esquistossomos por microscopia eletrônica de varredura conforme efeitos demonstrados na (Figura 1).

3.2.1 Tratamento usando uma dose oral única de ácido mefenâmico, ácido tolfenâmico e celecoxibe

Grupos de camundongos portadores de *S. mansoni* adulto (infecção patente) foram tratados por via oral com uma dose única de 400 mg / kg de peso corporal 42 dias após a infecção. Como mostrado na Figura 3, o ácido mefenâmico possui as mais altas propriedades esquistossomicidas, com redução da carga de vermes de 75,5% ($p < 0,001$). Ácido tolfenâmico e celecoxibe demonstraram um efeito moderado, com redução da carga de vermes de 62,4% e 45,3%, respectivamente ($p < 0,01$ e $p < 0,05$). Em todos os tratamentos experimentais, foi observada uma redução significativa na carga de ovos, principalmente com ácido mefenâmico (Fig. 4). O oograma mostrou que ácido mefenâmico levou a uma redução de 70,2% ($p < 0,001$) no número de ovos imaturos (Fig. 4A), enquanto que o celecoxibe e

ácido tolfenâmico induziu uma redução de 57,4% e 50,1 %, respectivamente. Nas amostras fecais coletadas de camundongos, os ácido mefenâmico, ácido tolfenâmico e celecoxibe reduziram significativamente ($p < 0,05$ a $p < 0,001$) o número de ovos, com uma redução de 73,6%, 60,6%, 51% e 3%, respectivamente (**Fig. 4B**). O tratamento com AINEs diminuiu significativamente a massa do fígado e do baço ($p < 0,05$ para $p < 0,001$) em relação aos controles não tratados. Em camundongos tratados com ácido mefenâmico, a massa do fígado e do baço diminuiu significativamente em 34,3% e 32,1% ($p < 0,01$), respectivamente. O tratamento com ácido meclofenâmico ou celecoxib levou a uma redução de 22,7% a 34,3% na massa do órgão (**fig. 5**).

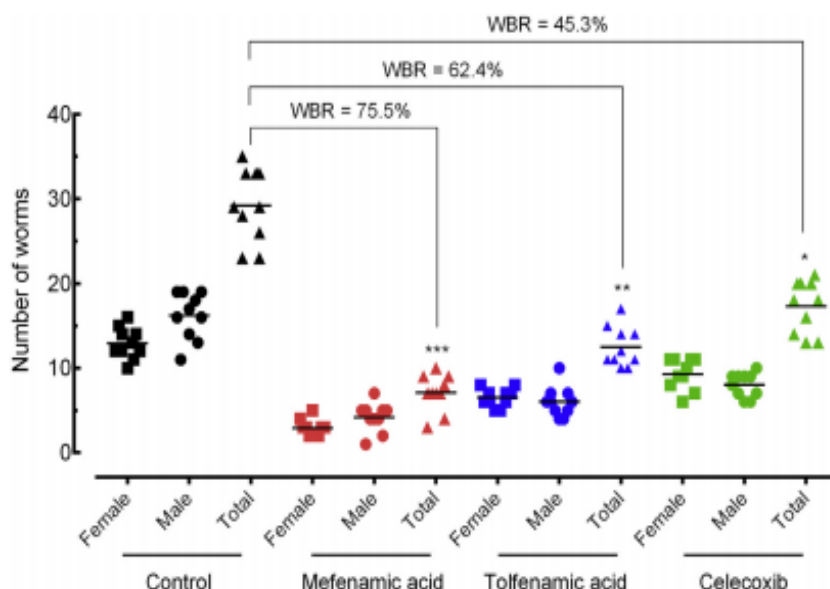


Fig. 3. Efeito do ácido mefenâmico, ácido tolfenâmico e celecoxib na carga parasitária em camundongos com infecção patente. Os pontos representam dados de camundongos individuais e são a combinação de dois experimentos independentes ($n = 5$ por grupo). Barras horizontais representam mediana valores. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$

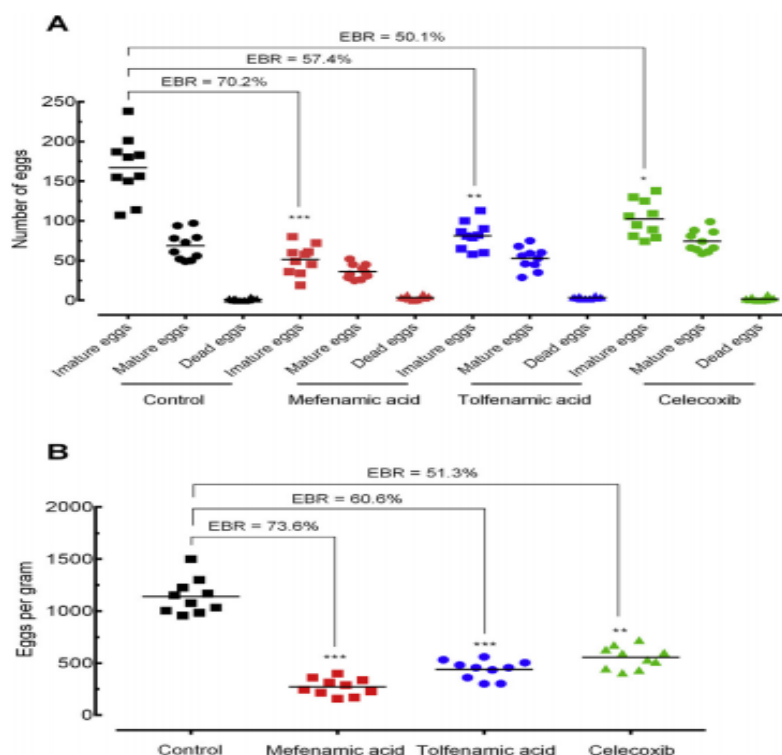


Fig. 4. Efeito do ácido mefenâmico, ácido tolfenâmico e celecoxib na carga de ovos de camundongos com infecção patente. Fases de desenvolvimento do ovo, oograma (A). Carga de ovos nas fezes (B). Os pontos representam dados de camundongos individuais e são a combinação de duas experiências independentes (n = 5 por grupo). Barras horizontais representam valores medianos. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$ em comparação com grupos não tratados pelo teste paramétrico de comparação múltipla de Dunnett. EBR: Redução da carga de ovos.

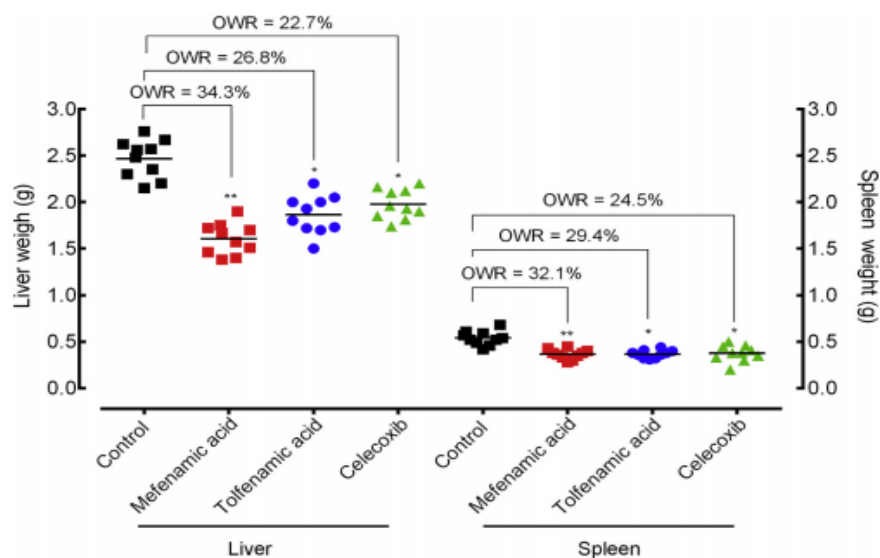


Fig. 5. Efeito do ácido mefenâmico, ácido tolfenâmico e celecoxib na patologia do fígado e baço de camundongos com infecção patente. Os pontos representam dados de camundongos individuais e são a combinação de duas experiências

independentes ($n = 5$ por grupo). Barras horizontais representam valores medianos. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$ comparado com grupos não tratados pelo teste paramétrico de comparação múltipla de Dunnett. OWR: Redução da massa dos órgãos

3.2.3 Tratamento com doses orais múltiplas de ácido mefenâmico

Como mencionado acima, uma dose oral única de 400 mg / kg é o tratamento recomendado para a esquistossomose murina experimental. No entanto, o ácido mefenâmico é rapidamente absorvido após a administração oral e possui uma meia-vida curta (duas horas), o que consideramos uma desvantagem para matar os parasitas que residem na corrente sanguínea. Decidimos então administrar o ácido mefenâmico uma vez ao dia por cinco dias consecutivos (100 mg / kg / dia), que também é usado em programas de descoberta de medicamentos para o modelo murino de esquistossomose (GUERRA et al 2019; BOTROS et al., 2004). Com base nos notáveis efeitos in vivo do ácido mefenâmico em camundongos infectados com parasitas adultos, testamos se o ácido mefenâmico exibia eficácia como tratamento contra infecções imaturas, em que o praziquantel é ineficaz. Portanto, investigamos as propriedades anti-esquistossomáticas do ácido mefenâmico (100 mg / kg / dia) em camundongos que abrigavam estágios adulto (42 dias após a infecção, infecção patente) ou juvenil (21 dias após a infecção, infecção pré-patente) de *S. mansoni*. Conforme mostrado na **Fig. 6**, o tratamento com ácido mefenâmico alcançou uma alta redução total da carga de vermes de 82,1% e 67,2% em camundongos portadores de vermes adultos e juvenis, respectivamente. Com relação à carga de ovos, o uso de ácido mefenâmico resultou em uma diminuição de 92% ($P < 0,0001$) e 78% ($P < 0,001$) em ovos imaturos na infecção patente e pré-patente, respectivamente (**Fig. 7A**). Da mesma forma, a frequência dos ovos nas amostras fecais foi drasticamente reduzida, com uma redução de 94,3% e 71,2% nos estágios adulto e juvenil, respectivamente (**Fig. 7B**). Em relação às patologias do fígado e do baço, o ácido mefenâmico reduziu o aumento da massa hepática promovido por infecção em 42,1% e a massa do baço em 48,8% em camundongos adultos infectados com *S. mansoni*, em comparação aos controles tratados com veículo. Hepato e esplenomegalia foram reduzidos mais acentuadamente em camundongos infectados com *S. mansoni* juvenis, com uma redução de 52,3% e 56,7% na massa de fígado e baço, respectivamente (**Fig. 8**).

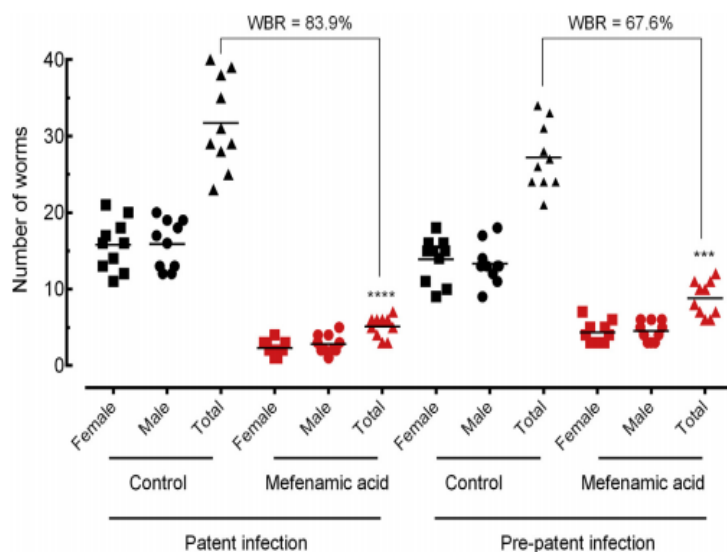


Fig. 6. Efeito do ácido mefenâmico na carga parasitária de camundongos com infecções patentes ou pré-patentes. Os pontos representam dados de camundongos individuais e são a combinação de duas experiências independentes (n = 5 por grupo). Barras horizontais representam valores medianos. * P < 0, 05, ** P < 0, 01, *** P < 0, 001 comparado com grupos não tratados pelo teste paramétrico de comparação múltipla de Dunnett. WBR: Redução da carga de vermes

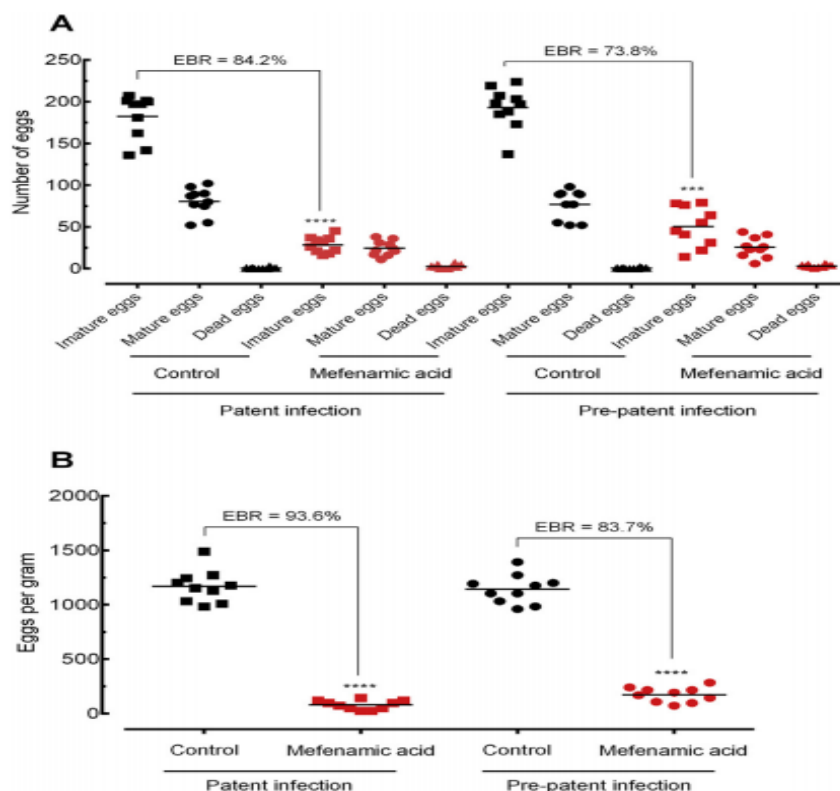


Fig. 7. Efeito do ácido mefenâmico na carga de ovos de camundongos com infecção patente ou pré-patente infecções. Fases de desenvolvimento do ovo, isto é, oograma (A). Carga de ovos nas fezes (B). Os pontos representam dados de camundongos individuais e são a combinação de duas experiências independentes (n = 5 por grupo). Barras horizontais representam mediana valores. * P < 0, 05, ** P < 0, 01, *** P < 0,001 em

comparação com grupos não tratados por teste paramétrico de comparação múltipla de Dunnett. EBR: Redução da carga de ovos.

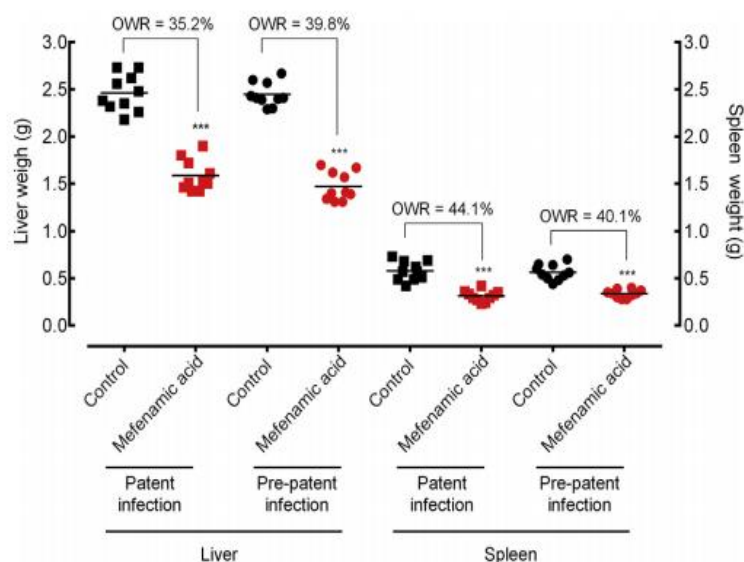


Fig. 8. Efeito do ácido mefenâmico na patologia do fígado e baço de camundongos com infecções patentes ou pré-patentes.. Os pontos representam dados de camundongos individuais e são a combinação de duas experiências independentes (n = 5 por grupo). Barras horizontais representam valores medianos. * P < 0, 05, ** P < 0, 01, *** P < 0, 001 comparado com grupos não tratados pelo teste paramétrico de comparação múltipla de Dunnett. OWR: Redução de peso de órgãos

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O redirecionamento de medicamentos já aprovados fornece um método alternativo para a identificação rápida de novos agentes terapêuticos. Neste estudo, a partir de uma triagem fenotípica de 73 AINEs, identificamos cinco (ácido mefenâmico, ácido tolfenâmico, ácido meclofenâmico, celecoxibe e diclofenaco) capaz de alterar a viabilidade do *S. mansoni* adulto. Em seguida, investigamos o efeito de três AINEs (ácido mefenâmico, ácido meclofenâmico e celecoxib) em um modelo de esquistossomose em camundongos. Em conjunto, o composto mais potente investigado neste estudo foi o ácido mefenâmico (menor LC50 e maior redução da carga de vermes). Tanto no modelo in vitro quanto no modelo murino da infecção por *S. mansoni*, a atividade anti-helmíntica do ácido mefenâmico supera os critérios estabelecidos pela Organização Mundial da Saúde (OMS) para potenciais compostos de esquistossomose. (NWAKA et al., 2006). Em todos os ensaios os resultados mostraram uma redução de pelo menos 82% na carga de vermes quando o ácido mefenâmico foi administrado em cinco doses

a 100 mg / kg. No modelo animal, um teste inicial na dose recomendada para agentes anti-helmínticos (dose única de 400 mg / kg no dia 42 após a infecção) estabeleceu o ácido mefenâmico como um potente agente anti-esquistossomático. Em seguida, a melhoria significativa dos parâmetros da doença na dose diária (100 mg / kg por cinco dias) foi mais dramática do que a observada no tratamento com uma dose única. Juntos, os esquistossomos adultos pareciam mais sensíveis ao ácido mefenâmico (infecção patente) do que os estágios juvenis (infecção pré-paciente). Foi alcançada uma alta redução total da carga de vermes com ácido mefenâmico em infecções patentes (efeito N 80%), enquanto uma redução moderada total da carga de vermes foi observada em infecções pré-patentes (efeito ~ 65%), diferentemente do praziquantel, que é caracterizado por baixa atividade contra esquistossomos juvenis, produzindo apenas uma redução de 25 a 30% na carga de vermes (BERGQUIST, 2018), nossos resultados mostram que o ácido mefenâmico possui atividade significativa contra o estágio juvenil do parasita. Em relação à infecção por vermes adultos, o efeito anti-esquistossomático do mefenâmico é semelhante ao do praziquantel, que é conhecido por reduzir ~ 90% da carga de vermes (BERGQUIST & ELMORSHEDY, 2018). Como vantagem, o ácido mefenâmico é rapidamente absorvido após administração oral, possui uma meia-vida curta e é mais tolerante que outros AINEs (WINDER et al., 1966). O ácido mefenâmico apresenta um nível plasmático de pico relativamente alto (C_{max} : 20 μ g / mL ou 83 μ M) (WINDER 1966; GLAZKO, 1966). No presente trabalho, embora o perfil de exposição seja muito importante para a atividade antiparasitária, descobrimos que o ácido mefenâmico exibiu atividade esquistossomicida com valores de CL50 de ~ 10 μ M, que estão muito abaixo das concentrações plasmáticas clinicamente alcançáveis in vivo.. Usando uma fórmula de conversão de dose (REAGAN-SHAW 2008), uma dose diária eficaz de 100 mg / kg em nosso modelo de camundongo in vivo equivale a uma dose equivalente humana de 8 mg / kg, de acordo com o atual regime de tratamento para ácido mefenâmico oral (25 mg / kg / dia por sete dias). É importante enfatizar que, idealmente, a administração clínica de medicamentos anti-helmínticos se limita a uma ou poucas doses, que é um protocolo de tratamento recomendado para o ácido mefenâmico. Portanto, esses resultados sugerem que o ácido mefenâmico deve ter atividade anti-helmíntica sob seu atual regime anti-inflamatório. Além disso, ao comparar o custo entre os dois medicamentos, o praziquantel e o ácido mefenâmico, é notável uma variação substancial. Como mencionado anteriormente, embora geralmente seja eficiente contra a esquistossomose, há uma eficácia reduzida do tratamento com praziquantel e a resistência aos medicamentos continua sendo uma preocupação. Nesse

sentido, o ácido mefenâmico pode ser uma alternativa promissora para o controle da esquistossomose. Em conclusão, estudos *in vitro* e *in vivo* estabeleceram o ácido mefenâmico como um potente agente anti-esquistossomático. Considerando a importância do reposicionamento de medicamentos, principalmente para doenças negligenciadas, neste estudo, fornecemos fortes evidências do potencial do ácido mefenâmico como medicamento para o tratamento da esquistossomose. Ressalta-se, em última análise, que o presente estudo resultou em publicação no renomado periódico EBIOMEDICINE, by THE LANCET (Fator de Impacto 6,8, Qualis A1).

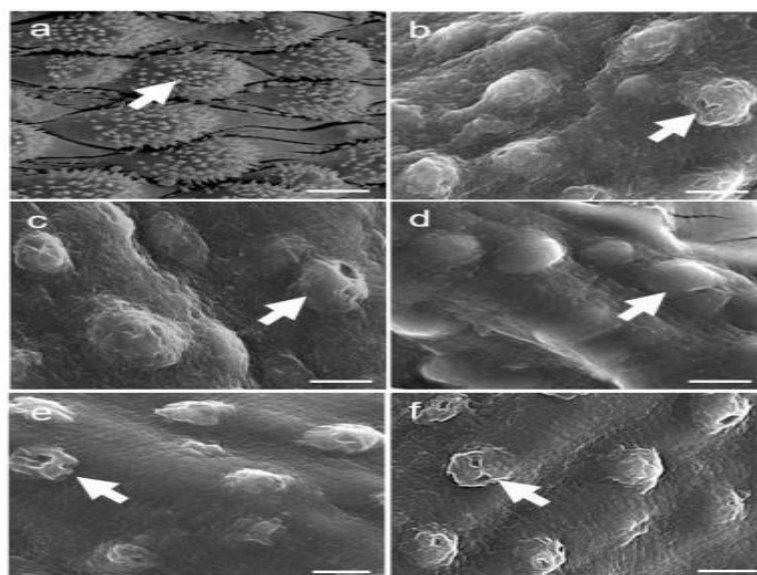


Figura 1. Investigação por microscopia eletrônica de varredura de *S. mansoni* adulto *ex vivo*. Controle de verme (a) mostrando tubérculos e espinhos na superfície (seta). Tegumento dos esquistossomos expostos ao ácido mefenâmico (b), ácido tolfenâmico (c), ácido meclofenâmico (d), celecoxibe (e) e diclofenaco (f), mostrando morfologia alterações na superfície (seta) como alterações nos tubérculos e perda de espinhos na superfície. Barras de escala, 10 μ M.

AGRADECIMENTOS

Esse trabalho foi financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BERGQUIST R, ELMORSHEDY H. Artemether and praziquantel: origin, mode of action, impact, and suggested application for effective control of human schistosomiasis. **Trop Med Infect Dis.** 1:118–25.2018
- BOTROS S, WILLIAM S, EBEID F, et al. Lack of evidence for an antischistosomal activity of myrrh in experimental animals. **Am J Trop Med Hyg.** 71:206–10. 2004
- CAMPELO YDM, MAFUD AC, VÉRAS LMC, et al. Synergistic effects of in vitro combinations of pipartine, epiisopiloturine and praziquantel against *Schistosoma mansoni*. **Biomed Pharmacother.**;88:488–99. 2017
- CARVALHO A.L. et al. Schistosomicidal effect of the anti-inflammatory drug diclofenac and its structural correlation with praziquantel. **Int. J. Antimicrob. Agents**, v. 44, p. 372- 374, 2014.
- COLLEY D. et al. Human schistosomiasis. **Lancet**, v. 383, p. 2253-2264, 2014.
- CIOLI D. et al. Schistosomiasis control: praziquantel forever? **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 195, p. 23-29, 2014.
- DE BRITO MRM, PELÁEZ WJ, FAILLACE MS, et al. Cyclohexene-fused 1,3-oxazines with selective antibacterial and antiparasitic action and low cytotoxic effects. **Toxicol In Vitro.** 44:273–9.2017
- DE MORAES J. Antischistosomal natural compounds: present challenges for new drug screens. In: Rodriguez-Morales AJ, editor. **Current topics in tropical medicine**. p. 333–58. <https://doi.org/10.5772/27740>. 2012
- DE MORAES J. Natural products with antischistosomal activity. **Future Med Chem.**, v. 7(6), p. 801-820, 2015.
- DE MORAES J, DE OLIVEIRA RN, COSTA JP, et al. A diterpene alcohol from chlorophyll, as a drug against neglected tropical disease schistosomiasis mansoni. **PLoS Negl Trop Dis** 2014;8:e2617
- FENWICH A.; WEBSTER J. P. Schistosomiasis: challenges for control, treatment, and drug resistance. **Curr. Opin. Infect. Dis.**, v. 19, p. 577-582, 2006.
- GLAZKO AJ. Experimental observations on flufenamic, mefenamic and meclofenamic acids. 3. Metabolic disposition. **Ann Phys Med.** (Suppl):23–36.1996
- GUERRA AR, SILVA MP, SILVA TC, et al. Spironolactone as an antischistosomal drug capable of clinical repurposing: in vitro and in vivo studies. **Antimicrob Agents Chemother.** 63:e01722-18. 2019
- GUIMARÃES MA, OLIVEIRA RN, ALMEIDA RL, et al. Epiisopilosine alkaloid has activity against *Schistosoma mansoni* in mice without acute toxicity. **Plos One** 2018;13: e0196667

- GRYSEELS E. et al. Are poor responses to praziquantel for the treatment of *Schistosoma mansoni* infections in Senegal due to resistance? An overview of the evidence. **Trop Med Int Health**. Nov;6(11):864-73. 2001
- KATZ N, CHAVES A, PELLEGRINO J. A simple device for quantitative stool thick-smear 366 technique in *Schistosoma mansoni*. **Rev Inst Med Trop**. 14:397–400.1972
- MAFUD A.C. et al. Discovery of Novel Antischistosomal Agents by Molecular Modeling Approaches. **Trends Parasitol.**, v. 32(11), p. 874-886, 2016.
- MAFUD AC, SILVA MPN, NUNES GBL, et al. Antiparasitic, structural, pharmacokinetic, and toxicological properties of riparin derivatives. **Toxicol In Vitro**. 50:1–10. 2018
- NWAKA S, HUDSON A. Innovative lead discovery strategies for tropical diseases. **Nat Rev Drug Discov**. 5:941–55.2006
- PELLEGRINO J, OLIVEIRA CA, FARIA J, CUNHA AS. New approach to the screening of drugs in experimental schistosomiasis mansoni in mice. **Am J Trop Med Hyg**. 11: 201–15.1962
- REAGAN-SHAW S, NIHAL M, AHMAD N. Dose translation from animal to human studies revisited. **FASEB J**;22:659–61. 2008
- SILVA, M.P.; DE OLIVEIRA, R.N.; MENGARDA, A.C.; ROQUINI, D.B et al. Antiparasitic activity of nerolidol in a mouse model of schistosomiasis **Int J Antimicrob Agents**. V.50(3), p.467-472, 2017
- STEINMANN P. et al. Schistosomiasis and water resources development: systematic review meta-analysis, and estimates of people at risk. **Lancet Infect. Dis**. v. 6, n. 7, p. 411-425, 2006.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. Neglected Tropical Diseases. Disponível em http://www.who.int/neglected_diseases/diseases/en/ Acesso em set/2017a.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. Schistosomiasis: The disease. Disponível em < <http://www.who.int/schistosomiasis/disease/en/> />. Acesso em set/2017b.
- WYNN et al. Immunopathogenesis of schistosomiasis. *Immunol. Rev.*, v. 201, p. 156- 167, 2004
- WILSON A.R. et al. Immunopathology of schistosomiasis. *Immunol. Cell Biol*. v. 85, p. 148-154, 2007.
- WINDER CV. Experimental observations on flufenamic, mefenamic, and meclofenamic acids. I. Pharmacology. **Ann. Phys. Med.** (7–16):1966.
- WINDER CV, KAUMP DH, GLAZKO AJ, HOLMES EL. Experimental observations on flufenamic, mefenamic, and meclofenamic acids. **Rheumatology** ;VIII:7–49. 1996