

Pesquisa Acadêmica

REPOSICIONAMENTO CLÍNICO DA DESLORATADINA COMO AGENTE ANTIPARASITÁRIO: ESTUDO *IN VITRO* EM VERMES ADULTOS DE *SCHISTOSOMA MANSONI*

DANIEL BRENNEISEN ROQUINI

ESTUDANTE DE DOUTORADO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENFERMAGEM

UNIVERSIDADE GUARULHOS – UNG

Daniel.roquini@outlook.com

JOSUÉ DE MORAES

ORIENTADOR

UNIVERSIDADE GUARULHOS

moraesnpgdn@gmail.com

**NÚCLEO DE PESQUISA EM DOENÇAS NEGLIGENCIADAS - NPDN,
UNIVERSIDADE GUARULHOS – UNG**

REPOSICIONAMENTO CLÍNICO DA DESLORATADINA COMO AGENTE ANTIPARASITÁRIO: ESTUDO *IN VITRO* EM VERMES ADULTOS DE *SCHISTOSOMA MANSONI*

RESUMO:

Introdução: O praziquantel é o único fármaco disponível para o tratamento da esquistossomose, Doença Negligenciada causada por helmintos do gênero *Schistosoma*. Considerando que os neurotransmissores são importantes alvos para drogas antiparasitárias, associada a presença de receptores para aminas biogênicas em helmintos a desloratadina tornou-se um fármaco promissor para os testes. De fato, a desloratadina interage com muitos receptores diferentes. Destarte, faz-se necessária novas alternativas terapêuticas contra helmintíases. Uma abordagem para acelerar a descoberta de medicamentos é o "reposicionamento de fármacos".

Objetivo: Avaliar o efeito anti-helmíntico da desloratadina *in vitro* em vermes adultos de *Schistosoma mansoni*. **Método:** Atividade antiparasitária da desloratadina foi avaliada *in vitro* frente aos adultos de *S. mansoni*. **Resultados:** *In vitro*, desloratadina apresentou atividade esquistossomicida ($LC_{50} = 9.56 \mu M$). **Conclusão:** Em conjunto, considerando a importância do reposicionamento de fármacos para Doenças Negligenciadas, os resultados deste estudo indicam o potencial da desloratadina para tratamento da esquistossomose.

Palavras chave: Antiparasitário; Anti-histamínico; Desloratadina; *Schistosoma mansoni*.

1. INTRODUÇÃO:

As doenças causadas por helmintos ocorrem principalmente nas camadas sociais pobres, sem condições adequadas de moradia, de trabalho, de educação e de serviços sanitários. (STEINMANN P, 2006) Consideradas “Doenças Negligenciadas”, também conhecidas como “doenças da pobreza”, essas enfermidades acometem mais de um bilhão de pessoas em um universo de aproximadamente 150 países. (COLLEY DG, 2014) As Doenças Negligenciadas não só prevalecem em condições de pobreza, mas também representam forte entrave ao desenvolvimento dos países e são determinantes na manutenção do quadro de desigualdade. (GRYSEELS B, 2006)

Em particular, a esquistossomose é a helmintíase mais importante em termos de morbidade. Globalmente, estima-se que mais de 200 milhões de pessoas são acometidas pela esquistossomose, especialmente crianças e jovens em fase escolar. (ROSS AG, 2002). Descrita em 1852 por Theodor Bilharz, a doença é causada por trematódeos digenéticos sanguíneos do gênero *Schistosoma*. Hodiernamente, é cediço que seis espécies parasitam humanos. Especificamente, três espécies têm importância global (*Schistosoma mansoni*, *S. japonicum* e *S. haematobium*), enquanto infecções com outras espécies são limitadas a locais específicos (*S. guineenses*, *S. mekongi* e *S. intercalatum*). (BLANCHARD TJ, 2004). No Brasil, Pirajá da Silva fez a descrição completa do *S. mansoni* em 1908, cuja doença, esquistossomose mansônica, também ficou popularmente conhecida como xistose, xistossome, doença do caramujo e, sobretudo, barriga d` água.

Entre os vários fatores associados à patogenia da esquistossomose, os mais importantes são a carga parasitária, o que, por conseguinte, influencia diretamente no número de ovos, e a resposta do sistema imunológico de cada hospedeiro. (MORGAN JAT, 2001) No geral, a esquistossomose é uma doença que possui diversos mecanismos, como lesões diretamente ligadas à presença local do agente etiológico (cercárias, esquistossômulos, vermes adultos e ovos), alterações hemodinâmicas e reatividade imunológica, além de interagir e potencializar outras patologias por agentes infecciosos em geral. Os ovos de *S. mansoni* são os precursores das reações granulocíticas causadoras da morbidade. Por sua vez, nas formas mais graves há predominância de hepatoesplenomegalia e fibrose periportal. (PARAENSE WL, 2001)

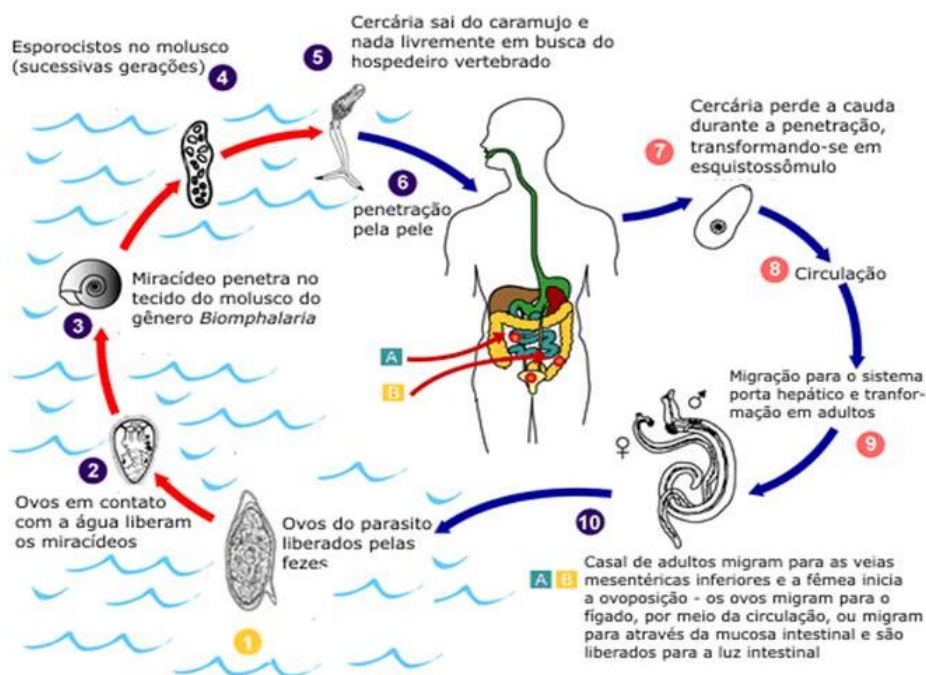


Figura 1. Ciclo de vida do *Schistosoma mansoni*. Fonte: CVE (2005).

Infelizmente, a quimioterapia é a principal forma de controle da esquistossomose. (SECOR WE, 2006) Neste caso, o tratamento é baseado apenas em um fármaco, o 2-(ciclohexilcarbonil)-1,2,3,6,7,11b-hexa-hidro-4H-pirazino[2,1-a]isoquinolin-4-ona, praziquantel. Administrado oralmente em dose única, praziquantel atua contra todas as espécies do gênero *Schistosoma* que infectam o homem. (WILSON MS, 2007) O praziquantel tem sido estudado experimentalmente em animais desde a década de 1970, mostrando-se eficaz contra infestações de várias espécies de trematódeos e cestódeos. (DOENHOFF MJ, 2000) A ação anti-helmíntica do praziquantel ainda não foi totalmente elucidada. (CIOLI D, 2003) Sabe-se que o fármaco causa alteração dos canais de Ca^{2+} dos esquistossomos, aumentando a permeabilidade da membrana do helminto a certos cátions monovalentes e divalentes, principalmente o cálcio que leva à intensificação da atividade muscular, seguida por contração e paralisia. (BENNETT JL, 1997).

A dependência de apenas um fármaco é preocupante. Em 2016, por exemplo, 218 milhões de pessoas receberam tratamento farmacológico preventivo contra a esquistossomose. Ressalte-

se que 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; deveras, em alguns locais a taxa de cura tem atingido entre 70% e 90%. (CIOLI D. ET AL, 2014) Além de não atuar nas formas jovens do parasita, o que eleva a taxa de reinfecções, existem preocupações quanto à resistência ao fármaco. (LIANG YS, 2001; DOENHOFF MJ, 2002) Destarte, considerando a existência de apenas um medicamento, nosso grupo de pesquisa tem envidado esforços na busca por novos agentes esquistossomicidas. Revisão recente do nosso grupo mostra que desde o início do tratamento quimioterápico para a esquistossomose (década de 1910) até o ano 2017, menos de 100 compostos atingiram a fase para estudos em animais. (MORAES J, 2012)

Ante os fatos mencionados, a esquistossomose, assim como outras Doenças Negligenciadas, tem recebido pouco investimento em pesquisa sobre novos fármacos nos últimos anos. De fato, com pouco financiamento, o conhecimento produzido não se reverte em avanços para o desenvolvimento e ampliação de acesso a novos fármacos, métodos diagnósticos, vacinas ou outras tecnologias. (WHO, 1995; WHO 2012) Uma das razões para esse quadro é o baixo interesse da indústria farmacêutica, justificado pelo reduzido potencial de retorno lucrativo para a indústria, uma vez que a população atingida é de baixa renda.

Não obstante a importância de novos agentes anti-helmínticos, é noção cediça 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. Diversas drogas têm sido usadas com sucesso para quimioprofilaxia e tratamento de doenças infecciosas. Miltefosina, anfotericina B, cloroquina e quinina são exemplos de drogas reposicionadas com sucesso. (LAGO EM, 2018; FERNÁNDEZ RME, 2017; SINGH S, 2018; BRILHANTE RSN, 2018) No âmbito dos helmintos do gênero *Schistosoma*, estudos recentes do nosso grupo mostraram o efeito anti-helmíntico do anti-inflamatório não esteroide diclofenaco de sódio. Ademais, realizando uma triagem com fármacos diuréticos nosso grupo descreveu o efeito esquistossomicida *in vitro* e *in vivo* da espironolactona, um diurético poupador de potássio. (GUERRA, 2018)

Ainda no que concerne a busca e desenvolvimento de drogas, algumas estratégias de *drug design* para candidatos à fármacos fundamenta-se no conhecimento fisiopatológico e na consequente eleição do alvo terapêutico mais adequado. (MORAES JD, 2011 ; ANDREWS KT, 2014) Nesse contexto, o sistema neuromuscular dos helmintos é considerado importante alvo para drogas. Mais detalhadamente, no tocante a fisiologia da neurotransmissão, nos platelmintos existe um sistema de comunicação rápida envolvendo um sistema lento, que usa peptídeos como mensageiros. (JUTEL M, 2005)

Em particular, a histamina, é um potente mediador de numerosas reações de baixa massa molecular (aminas biogênicas e acetilcolina) e fisiológicas, pertence à classe das aminas biogênicas e é sintetizada a partir do aminoácido histidina, sob ação L-histidina decarboxilase (HDC). (ASHINA K, 2015) Essa amina biogênica foi identificada em extratos brutos de diversos platelmintos parasitas das classes Cestoda e Trematoda. Alguns trematoides têm excepcionalmente altos níveis de histamina endógena. Parasitas de anfíbios, como o *Haplometra cylindracea* (ZEDER, 1800) tem uma das maiores concentrações de histamina já relatadas no Reino Animal, cuja distribuição é generalizada no sistema nervoso central e periférico do verme. (RIBEIRO P, 2015) No geral, a maioria dos estudos até o momento sugere que histamina de parasitas é obtida a partir do hospedeiro através de transporte tegumental, possivelmente por simples difusão. (RIBEIRO P, 2015)

Embora presente nos platelmintos, o papel biológico da histamina ainda não foi elucidado. Não obstante, há evidências para sugerir uma função neuromuscular. Por exemplo, aplicado exogenamente, a histamina afeta a motilidade de alguns vermes, de maneira dose-dependente. Outrossim, receptores para histamina foram descritos em *S. mansoni* e foi sugerido um modelo para o papel da interação da histamina com o verme e seu hospedeiro. No caso, o aludido modelo sugere duas maneiras: uma é através de receptores responsivos localizado em terminações nervosas sensoriais da superfície do parasita, e a outra, por um mecanismo que envolve o transporte do tegumento e, em seguida, a captação para o parasita via transportadores específicos dos neurônios (**Figura 2**). (METTRICK DF, 1963 GUSTAFFSON, 1987)

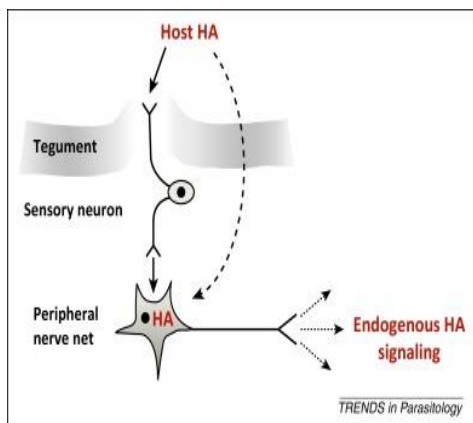


Figura 2. Modelo para o papel da histamina na relação parasito-hospedeiro. Fonte: Ribeiro (2015)

A desloratadina é um derivado de piperidina de ação prolongada com propriedades anti-histaminérgicas H1 e não sedativas seletivas. A desloratadina diminui os efeitos histaminérgicos típicos nos receptores H1 no músculo liso brônquico, capilares e músculo liso gastrointestinal, incluindo vasodilatação, broncoconstrição, aumento da permeabilidade vascular, dor, coceira e contrações espasmódicas do músculo liso gastrointestinal. A desloratadina é usada para proporcionar alívio sintomático dos sintomas alérgicos. A desloratadina é um antagonista dos receptores da histamina H1. O mecanismo de ação da desloratadina é como um antagonista dos receptores H1 da histamina .(PUBCHEM 2019)

Dessa forma, o conhecimento sobre sua farmacocinética e características farmacodinâmicas torna-se importante aos ensaios pré-clínicos realizados no presente estudo. (Tabela 1).

Tabela 1. Informações farmacológicas da desloratadina e praziquantel.

Fármaco	Massa (g/mol)	Log P	Biodisp. oral	Meia-Vida (T_{1/2})
Desloratadina	310,8	3.2	83% - 87%)	27 h
Praziquantel	312.413	2.5	80%	0.8-1.5 h

Fonte: PubChem Compound e DrugBank database.
DL 50 em camundongos(*).
Não Determinado (ND).

Devido à dificuldade de descobrir novas drogas esquistossomicidas, e a quantidade de tempo para serem liberadas para o consumidor, uma boa alternativa foi usar o reposicionamento de fármacos. Neste estudo foi demonstrado que o anti-histamínico desloratadina obteve atividade antiparasitária, tanto na mortalidade e motilidade quanto na redução da oviposição. Nesse sentido, é fundamental o uso dessas substâncias farmacológicas e toxicológicas já conhecidas e que já obtiveram a aprovação das agências reguladoras, para que, juntamente com o praziquantel, possam auxiliar no combate a essa doença que atinge grande parte da população mundial.

2. OBJETIVOS:

Avaliar o efeito Anti-helmíntico do fármaco Desloratadina em *Schistosoma mansoni*.

Determinar a Concentração Letal 50% (LC 50).

3. QUESTÃO DE PESQUISA:

Os resultados esperados nesse projeto trarão um melhor entendimento do processo de mecanismo de ação dos compostos com atividade antiparasitária, sendo de extrema importância essa abordagem, uma vez que corresponde a uma doença pouco estudada pelos grandes centros de Pesquisa e Desenvolvimento mundiais, contribuindo dessa forma, para o Desenvolvimento Científico e Tecnológico.

4. METODOLOGIA:

4.1 Animais

Mantém-se um ciclo de moluscos do gênero *Biomphalaria* em laboratório, onde são infectados com miracídios recém eclodidos de ovos, através de uma técnica de exposição à luz realizada no Núcleo de Pesquisa em Doenças Negligenciadas (NPDN). Os camundongos SWISS recém-desmamados foram obtidos da empresa ANILAB ® para manutenção do ciclo. Espera-se um dia até que os animais se adaptem ao ambiente e após esse tempo iniciamos o procedimento. Os caramujos são expostos à luz, realizando assim a liberação de cercárias para infecção nos camundongos. Os animais foram infectados com 80 cercárias de *S. mansoni*

(linhagem BH). Todos os camundongos foram mantidos sob condições ambientais controladas (temperatura 25 ° C, umidade 70%) e tiveram acesso à água filtrada e alimentada com ração para roedores. (MORAES, 2015).

4.2. Comitê de Ética

Procedimentos envolvendo animais foram realizados de acordo com a legislação brasileira. O protocolo de manutenção do ciclo de vida de *S. mansoni* foi aprovado pelo comitê de ética local em testes em animais.

4.3 Avaliação da desloratadina *in vitro*

Vermes adultos (49 dias), recém recuperados de hospedeiros roedores, foram colocados em pares e lavados cuidadosamente em meio RPMI 1640 mantido a pH 7,5 com 25 mM de HEPES suplementado com 10% de soro fetal bovino e contendo 200 UI / mL de penicilina e estreptomicina 200 µg / ml. Após a lavagem, os esquistossomas foram incubados em uma placa de cultura de células de 24 poços posteriormente colocados em estufa, contendo o mesmo meio a 37 ° C em atmosfera com 5% de CO₂. (MORAES, 2015).

Os fármaco descrito utilizado para obter concentrações de teste finais de 50 a 6,25 µM (50, 25, 12,5 e 6,25µM) em placas de cultura com um volume final de 1 ml. Os parasitas foram mantidos por 72 horas e monitorados a cada 24 horas usando um microscópio invertido. O efeito do medicamento foi avaliado com ênfase nas mudanças na atividade motora e morte dos vermes. Mudanças no acasalamento e produção de ovos também foram avaliadas. Todos esses testes foram realizados em triplicatas (MORAES, 2015).

4. RESULTADOS:

Os resultados serão apresentados a seguir em forma de tabelas e foram discutidos nas considerações finais:

Tabela 4. Atividade antiparasitária (CL₅₀) dos fármacos anti-histamínico em *Schistosoma mansoni* adulto.

Geração	Classes	Fármaco	CL ₅₀ (µM)	IC 95%
2°	Piperidina	Desloratadina	9,56	7,72 – 12,06

Concentração Letal 50% (CL₅₀).

Intervalo de Confiança 95% (IC).

Não Determinado (ND)

Table 1. Efeito *in vitro* da desloratadina contra verme adulto *Schistosoma mansoni* com idade de 42 dias de vida.

Grupo	Periodo de incubação (h)	Morte dos vermes (%) ^a		Redução de atividade motora (%) ^a			
				Moderada		Significante	
		M	F	M	F	M	F
Controle	24	0	0	0	0	0	0
	48	0	0	0	0	0	0
	72	0	0	0	0	0	0
0.5% DMSO	24	0	0	0	0	0	0
	48	0	0	0	0	0	0
	72	0	0	0	0	0	0
Praziquantel 2 µM	24	100	100	0	0	100	100
	48	100	100	0	0	100	100
	72	100	100	0	0	100	100
Desloratadina 50 µM	24	100	100	0	0	100	100
	48	100	100	0	0	100	100
	72	100	100	0	0	100	100
25 µM	24	0	0	60	60	0	0
	48	0	0	60	60	0	0
	72	60	0	100	60	60	0
12.5 µM	24	0	0	30	30	0	0
	48	0	0	60	30	0	0
	72	100	0	100	100	100	0

Experimento realizado em triplicata

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS:

O ensaio *in vitro* demonstrou que os esquistossomos incubados com o fármaco desloratadina apresentaram alterações em sua atividade motora e aumento na mortalidade de maneira dependente da concentração.

Imagens de microscopia eletrônica de varredura indicaram que a estrutura tegumentar estava alterada tanto em machos quanto em fêmeas de *S. mansoni* e intensificou-se progressivamente quando a concentração de desloratadina aumentou. Essas alterações morfológicas foram semelhantes às relatadas em estudos com outros compostos anti-helmínticos.

Esses resultados indicam que a desloratadina poderia ser um tratamento potencial para a esquistossomose, isoladamente ou em combinação com o praziquantel, e torná-lo promissor para o reposicionamento de farmacos.

6. AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi realizado com o apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP). Josué de Moraes é bolsista Produtividade em Pesquisa do CNPq.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

STEINMANN P, KEISER J, BOS R, TANNER M, UTZINGER J. Schistosomiasis and water resources development: systematic review meta-analysis, and estimates of people at risk. *Lancet Infect Dis.* 2006; 6(7):411-425.

COLLEY DG, BUSTINDUY AL, SECOR WE, KING CH. Human Schistosomiasis. *Lancet.* 2014; 383: 2253-2264.

GRYSEELS B, POLMAN K, CLERINX J, KESTENS L. Human Schistosomiasis. *Lancet.* 2006; 368(9541):1106-1118.

ROSS AG, BARTLEY PB, SLEIGH AC, OLDS GR, LI Y, WILLIAMS GM, MCMANUS DP. Schistosomiasis. *N Engl J Med.* 2002; 346(16):1212-1220.

BLANCHARD TJ. Schistosomiasis. *Travel Med Infect Dis.* 2004; 2(1):5-11.

MORGAN JAT, DEJONG RJ, SNYDER SD, MKOJI GM, LOKER ES. *Schistosoma mansoni* and *Biomphalaria*: past history and future trends. *Parasitology.* 2001; 123:S211-S228.

PARAENSE WL. The Schistosome vectors in Americas. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2001; 96(Suppl): 7-16.

SECOR WE. Interactions between schistosomiasis and infection with HIV-1. *Parasite Immunol.* 2006; 28(11): 597-603.

WILSON MS, MENTINK-KANE MM, PESCE JT, RAMALINGAM TR, THOMPSON R, WYNN TA. Immunopathology of schistosomiasis. *Immunol Cell Biol.* 2007; 85(2):148-154.

DOENHOFF MJ, KIMANI G, CIOLI D. Praziquantel and the control of schistosomiasis. *Parasitol Today.* 2000; 16(9):364-366.

CIOLI D, PICA-MATTOCCIA L. Praziquantel. *Parasitol Res.* 2003; 90(Suppl 1): S3-S9.

BENNETT JL1, DAY T, LIANG FT, ISMAIL M, FARGHALY A. The development of resistance to anthelmintics: a perspective with an emphasis on the antischistosomal drug praziquantel. *Exp Parasitol*. 1997; 87(3):260-7.

CIOLI D. ET AL. Schistosomiasis control: praziquantel forever? *Mol Biochem Parasitol*. 2014; 195: 23-29.

LIANG YS, COLES GC, DOENHOFF MJ, SOUTHGATE VR. In vitro responses of praziquantel-resistant and -susceptible *Schistosoma mansoni* to praziquantel. *Int J Parasitol*. 2001; 31(11):1227-1235.

DOENHOFF MJ, KUSEL JR, COLES GC, CIOLLI D. Resistance of *Schistosoma mansoni* to praziquantel: is there a problem? *Trans R Soc Trop Méd*. 2002; 96(5):465-469.

FENWICH A, WEBSTER JP. Schistosomiasis: challenges for control, treatment, and drug resistance. *Curr Opin Infect Dis*. 2006; 19(6):577-582.

World Health Organization. Prevention and control of schistosomiasis and soil-transmitted helminthiasis. *Tech Rep Ser*. 2002; 912:1-57.

MORAES J. Antischistosomal natural compounds: present challenges for new drug screens. In: RODRIGUEZ-MORALES, A J. ed. *Curr Top in Tropi Med*. InTech. Rijeka. 2012; 333-358.

LAGO, EM, XAVIER R, TEIXEIRA T, SILVA LM, DA SILVA FAA, DE MORAES J. Antischistosomal agents: state of art and perspectives. *Fut Med Chem*. 2018; 10: 89-120.

FERNÁNDEZ RME, DEL POZO JL, VALENTÍN A, FORNES V, MOLINA DE DIEGO A, PEMÁN J, CANTÓN E. Activity of amphotericin B and anidulafungin, alone and combined, against *Candida tropicalis* biofilms developed on Teflon® and titanium. *Rev Iberoam Micol*. 2017; Jul - Sep;34 (3):175-179.

SINGH S, SHARMA N, UPADHYAY C, KUMAR S, RATHI B, SINGH P. Small Molecules Effective against Liver and Blood Stage Malarial Infection. *Curr Top Med Chem*. 2018; Nov 29.

BRILHANTE RSN, SILVA MLQD, PEREIRA VS, DE OLIVEIRA JS, MACIEL JM, SILVA INGD, GARCIA LGS, GUEDES GMM, CORDEIRO RA, PEREIRA-NETO WA, DE CAMARGO ZP, RODRIGUES AM, SIDRIM JJC, CASTELO-BRANCO DSCM, ROCHA MFG. Potassium iodide and miltefosine inhibit biofilms of *Sporothrix schenckii* species complex in yeast and filamentous forms. *Med Mycol*. 2018; Nov 21.

GUERRA AR, SILVA MP, SILVA TC, SALVADORI MC, TEIXEIRA FS, OLIVEIRA RN, ROCHA JA, PINTO PLS, MORAES J. Spironolactone as an antischistosomal drug capable of clinical repurposing: in vitro and in vivo studies. *J of Antimic Chem*. 2018; in press.

MORAES JD, NASCIMENTO C, LOPES PO, NAKANO E, YAMAGUCHI LF, KATO MJ, KAWANO T. *Schistosoma mansoni*: In vitro schistosomicidal activity of pipartine. *Exp. Parasitol*. 2011; 127(2): 357-364.

ANDREWS KT, FISHER G, SKINNER-ADAMS TS. 2014. Drug repurposing and human parasitic protozoan diseases. *Int J Parasitol.* 2014; *Drugs Drug Resist* 4: 95-111.

JUTEL M, BBLASER K, AKDIS CA. Histamine in chronic allergic responses. *J Invest Allergy Clin Immunol.* 2005; 15:1-8.

ASHINA K, TSUBOSAKA Y, NAKAMURA T, OMORI K, KOBAYASHI K, HORI M, OZAKI H, MURATA T Histamine Induces Vascular Hyperpermeability by Increasing Blood Flow and Endothelial Barrier Disruption In Vivo. *Plos One.* 2015; 24: 9-17.

RIBEIRO P, EL-SHEBABI F, PATOCA N. Classical transmitters and their receptors in flatworms. *Parasitology.* 2005; 131:19–40. 2005 Cambridge University Press.

METTRICK DF, TELFORD JM. Histamine in the phylum Platyhelminthes. *J of Parasitol.* 1963; 49: 653–656.

GUSTAFSSON MKS, WIKGREN MC, KARHI TJ, SCHOT LPC. Immunocytochemical demonstration of neuropeptides and serotonin in the tapeworm *Diphyllbothrium dendriticum*. *Cell and Tiss Res.* 1987; 240: 255–260.

ERIKSSON KS, JOHNSTON RN, SHAW C, HALTON DW, PANULA PAJ. Widespread distribution of histamine in the nervous system of a trematode flatworm. *J of Comp Neurol.* 1996; 373: 220–227.

RIBEIRO P. Exploring the role of biogenic amines in schistosome host–parasite interactions. *Trends Parasitol.* 2015; 1–2.