



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

MARIANA BARBOSA DETONI

**NANOPARTÍCULA BIOGÊNICA DE PRATA INDUZ MORTE
DE ESQUISTOSSÔMULOS E VERMES ADULTOS DE
Schistosoma mansoni E REDUZ CARGA PARASITÁRIA NA
ESQUISTOSSOMOSE MANSÔNICA EXPERIMENTAL**

Londrina
2020

MARIANA BARBOSA DETONI

**NANOPARTÍCULA BIOGÊNICA DE PRATA INDUZ MORTE
DE ESQUISTOSSÔMULOS E VERMES ADULTOS DE
Schistosoma mansoni E REDUZ CARGA PARASITÁRIA NA
ESQUISTOSSOMOSE MANSÔNICA EXPERIMENTAL**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Ciências Patológicas, Centro de Ciências Biológicas, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito à obtenção do título de Mestre em Patologia Experimental.

Orientador: Prof. Dr. Wander R. Pavanelli
Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Milena
Menegazzo Miranda-Sapla

Londrina
2020

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Detoni, Mariana Detoni.

Nanopartícula biogênica de prata induz morte de esquistossômulos e vermes adultos de *Schistosoma mansoni* e reduz carga parasitária na esquistossomose mansônica experimental / Mariana Detoni Detoni. - Londrina, 2020.

72 f. : il.

Orientador: Wander Rogério Pavanelli.

Coorientador: Milena Menegazzo Miranda-Sapla.

Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental, 2020.

Inclui bibliografia.

1. *Schistosoma mansoni* - Tese. 2. Tratamento alternativo - Tese. 3. Nanotecnologia - Tese. I. Pavanelli, Wander Rogério . II. Miranda-Sapla, Milena Menegazzo . III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental. IV. Título.

CDU 576.8::61

MARIANA BARBOSA DETONI

**NANOPARTÍCULA BIOGÊNICA DE PRATA INDUZ MORTE
DE ESQUISTOSSÔMULOS E VERMES ADULTOS DE
Schistosoma mansoni E REDUZ CARGA PARASITÁRIA NA
ESQUISTOSSOMOSE MANSÔNICA EXPERIMENTAL**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Ciências Patológicas, Centro de Ciências Biológicas, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito à obtenção do título de Mestre em Patologia Experimental.

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr. Wander R. Pavanelli
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof^a. Dr^a. Danielle Lazarin Bidoia
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof^a. Dr^a. Vanessa Carregaro Pereira
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto -
Universidade de São Paulo – FMRP/USP

Londrina, 27 de Novembro de 2020.

Dedico este trabalho aos meus pais, por todo apoio, dedicação e por sempre acreditarem em mim.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por Ele estar comigo em todos os momentos e se fazer presente através de pessoas incríveis que tiver o prazer de conhecer. E por me amparar e me fazer chegar até aqui.

Aos meus queridos pais Vera e José, que sempre estiveram ao meu lado, me apoiando em todas as minhas decisões e dando palavras de apoio e gestos de carinho quando mais precisei. Obrigada por serem os melhores, e por me ensinar valores que irei levar por toda a vida. Também agradeço à minha irmã Fernanda, e meus avós Elvira e Rubens que me incentivam em todos os momentos e escolhas.

Ao meu orientador Prof. Dr. Wander Rogério Pavanelli, por abrir as portas do seu laboratório desde o primeiro momento, me aceitando como Iniciação Científica e incentivando a sempre continuar nesse mundo da pesquisa.

À minha co-orientadora Profa. Dra. Milena Menegazzo Miranda Sapla, pois mesmo distante sempre esteve presente em todos os momentos. Obrigada por aceitar comigo todos os desafios e me ensinar e vencê-los da melhor maneira, com o coração. Serei eternamente grata por tê-la em minha vida. O Romeo ainda não deve imaginar a supermãe que ele tem.

Ao Prof. Dr. Francisco José de Abreu Oliveira, por também abrir as portas do seu laboratório e me ensinar com maestria a desenvolver um modelo tão lindo e importante, não medindo esforços para transmitir conhecimentos.

À Prof^a. Dr^a. Ivete Conchon Costa, por me receber tão bem em seu laboratório e transmitir tantos conhecimentos sobre parasitos, demonstrando sempre muito amor pela profissão.

À Prof^a. Dr^a. Idessânia Nazareth Costa, por também auxiliar no conhecimento sobre parasitos e nos instigar a buscar coisas novas desde a Iniciação Científica.

À Prof^a. Dr^a. Francine Nesello Melanda, por me instigar à pesquisa desde a Iniciação Científica e por contribuir com as primeiras ideias para a realização deste projeto. Samuel e sua nova irmã também não imaginam a supermãe que eles têm.

Ao Prof. Dr. Gerson Nakazato, por ceder gentilmente o composto nanopartícula biogênica de prata para a realização de todos os experimentos.

Agradeço imensamente ao técnico Pedro Sebastião da Silva Dionízio, por me auxiliar em todos os momentos e não medir esforços. Obrigada por toda dedicação, paciência, compreensão, ensinamentos e momentos de descontração. Obrigada também por puxar minha orelha quando precisava e por ensinar todas as técnicas que sabe. Serei eternamente grata.

A todos os meus amigos do Laboratório de Imunoparasitologia de Doenças Negligenciadas e Câncer (LIDNC), por deixarem meus dias mais felizes e deixarem mais leve a rotina de trabalho. Agradeço à Virgínia M. C., Manoela D. G., Fernanda T. P., Taylon F. S., Ana C. J. R., Elaine S. S., Amanda C. M. C., João P. A., Raquel A., Laís F. M., Thaís P. S., Ana Flávia G. Em especial, à Bruna T. S. B., que também esteve presente em todos os momentos com sua energia contagiante, me auxiliando em todos os processos deste trabalho.

Às alunas de Iniciação Científica que fizeram parte deste trabalho Luryan S. F. O. e Amanda C. G., por sempre se mostrarem dispostas e ajudar quando podiam.

A todos os demais professores e funcionários do Departamento de Ciências Patológicas pelo suporte. Aos técnicos da Microscopia Eletrônica, por contribuírem com a beleza do trabalho. Aos alunos e professores do Laboratório de Patologia Animal por auxiliar com as análises histopatológicas.

Aos integrantes da banca de qualificação e defesa, Prof^a. Dr^a. Danielle Lazarin Bidoia, Prof. Dr. Francisco José de Abreu Oliveira e Prof^a. Dr^a. Vanessa Carregaro Pereira, pelo tempo concedido e dedicação para a correção deste trabalho.

Agradeço à CAPES, ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental e CNPq pela bolsa concedida e financiamento de meu projeto.

Agradeço ao meu namorado Lutiano, que acompanhou de perto meus passos e essa etapa em minha vida. Obrigada por todo apoio, paciência, amor, carinho e compreensão. E também por sempre acreditar em mim.

Às minhas amigas de graduação e companheiras de projetos que a UEL me apresentou e também a todos os meus amigos da minha cidade natal Três Lagoas.

Á todos que diretamente ou indiretamente acreditaram neste trabalho e contribuíram para sua realização, meu muito obrigada.

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”.

Madre Teresa de Calcutá

DETONI, Mariana Barbosa. **Nanopartícula biogênica de prata induz morte de esquistossômulos e vermes adultos de *Schistosoma mansoni* e reduz carga parasitária na esquistossomose mansônica experimental**. 2020. 98 p. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) – Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2020.

RESUMO

A esquistossomose constitui uma doença parasitária aguda e crônica causada por trematódeos do gênero *Schistosoma*, a qual está incluída na lista de Doenças Tropicais Negligenciadas (DTNs) pela Organização Mundial de Saúde (OMS). Atualmente, a quimioterapia representa o principal recurso para minimizar a prevalência e incidência desta doença no mundo. O tratamento atual é baseado na administração do Praziquantel (PZQ), quimioterápico ineficaz contra formas imaturas do parasito, tampouco durante a formação dos granulomas, além de demonstrar que é capaz de induzir resistência do parasito ao medicamento em casos de uso constante. Desta forma, é necessário a busca por novas alternativas terapêuticas que atuem nas diferentes formas evolutivas do parasito bem como durante a patologia. Em vista disso, este estudo buscou avaliar a ação esquistossomicida *in vitro* e *in vivo* de nanopartículas biogênicas de prata (AgNp-Bio) produzidas extracelularmente utilizando fungo filamentoso *Fusarium oxysporum*. Inicialmente, esquistossômulos de *S. mansoni* foram expostos a diferentes concentrações de AgNp-Bio (0.2-10 µg/mL) e avaliados quanto à viabilidade, sendo determinada a concentração letal para 50% dos parasitos (LC₅₀) de 0,84 µg/mL e avaliada alteração de integridade de membrana. Vermes adultos foram avaliados quanto à motilidade, viabilidade, metabolismo mitocondrial, alterações morfológicas, além de parâmetros de estresse oxidativo, como avaliação de espécies reativas de oxigênio (ERO), determinação dos níveis de óxido nítrico (NO), e malondialdeído (MDA). Em relação aos mecanismos envolvidos na morte de vermes adultos, o estudo também avaliou alteração do potencial de membrana mitocondrial e da membrana celular, formação de vacúolos autofágicos, além da produção de corpos lipídicos. Como resultado, foi determinada LC₅₀ de 12,62 µg/mL, com perda de motilidade e indução de danos tegumentares. Quanto aos possíveis mecanismos envolvidos na morte do parasito AgNp-Bio foi capaz de promover estresse oxidativo nos vermes adultos tratados através do aumento da produção ERO, bem como aumento de NO e MDA. Também foi avaliado que o composto induziu despolarização da membrana mitocondrial, formação de vacúolos autofágicos e perda da integridade da membrana plasmática. Em relação a infecção experimental, camundongos BALB/c tratados por via oral com AgNp-Bio nas doses de 0,25; 0,5 e 1 mg/kg não apresentaram toxicidade significativa. Posteriormente, o tratamento com 0,5 mg/kg de AgNp-bio em camundongos infectados por *S. mansoni* demonstrou redução total de vermes perfundidos do sistema porta-hepático e da contagem de ovos retidos no fígado, bem como diminuição da hepatoesplenomegalia, com resultados semelhantes aos tratados com PZQ. Em vista disso, os resultados demonstraram que AgNp-Bio apresenta ação esquistossomicida, induzindo a morte de formas imaturas e de vermes adultos, e contribuindo para a redução da patologia associada à doença.

Palavras-chave: *Schistosoma mansoni*. Nanotecnologia. Tratamento. Estresse oxidativo.

DETONI, Mariana Barbosa. **Biogenic silver nanoparticle induces death of schistosomules and adult worms of *Schistosoma mansoni* and reduces parasitic burden in experimental schistosomiasis mansoni.** 2020. 98 p. Dissertation (Master's degree in Experimental Pathology) – Center of Biological Sciences, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2020.

ABSTRACT

Schistosomiasis is an acute and chronic parasitic disease caused by *Schistosoma* genus trematodes, which is included in the list of Neglected Tropical Diseases (NTDs) by the World Health Organization (WHO). Chemotherapy is now the main resource to minimize the prevalence and incidence of this disease worldwide. Current treatment is based on the administration of Praziquantel (PZQ) which is ineffective against immature forms and during the granulomas formation. Also, the constant use of PZQ is capable of inducing parasite resistance. Thus, it is necessary to search for new therapeutic alternatives that act on the different evolutionary forms of the parasite as well as during the pathology. Thereby, this study evaluated the *in vitro* and *in vivo* schistosomicidal action of biogenic silver nanoparticles (Bio-AgNp) produced extracellularly using filamentous fungus *Fusarium oxysporum*. Initially, schistosomules of *S. mansoni* were exposed to different concentrations of Bio-AgNp (0.2-10 µg/mL) and assessed for viability, establishing a lethal concentration of 50% of the parasites (LC₅₀) of 0.84 µg/mL, with membrane integrity rupture. Adult worms Bio-AgNp-treated (1-100 µg/mL) were evaluated for motility, viability, mitochondrial metabolism, morphological changes, in addition to oxidative stress parameters, such as determination of reactive oxygen species (ROS), nitric oxide (NO) levels, and malondialdehyde (MDA). Regarding the adult worms death mechanisms, the study also evaluated the changes in mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$) and cell membrane, production of lipid droplets (LD), and autophagic vacuoles formation. As result, an LC₅₀ of 12.62 µg/mL was determined, causing loss of motility and inducing tegumentary damage. As for the possible mechanisms involved in the death of the parasite Bio-AgNp was able to promote oxidative stress in adult worms treated by increasing ROS production, as well as increasing NO and MDA. We also evaluated that the compound induced depolarization of the mitochondrial membrane, formation of autophagic vacuoles, and loss of integrity of the plasma membrane. Regarding the experimental infection, BALB/c mice were first treated orally with Bio-AgNp at doses of 0.25; 0.5 and 1 mg/kg, however, no significant toxicity in animals was evaluated. Subsequently, treatment with only one dose of Bio-AgNp (0.5 mg/kg) in mice infected with *S. mansoni* demonstrated a reduction in the worm burden and egg load and ameliorated hepato- and splenomegaly with similar results to those treated with PZQ. Given this, the results demonstrated that Bio-AgNp has a schistosomicidal action, inducing the death of immature forms and adult worms, as well as contributing to the reduction of pathology associated with the disease.

Key-words: *Schistosoma mansoni*. Nanotechnology. Treatment. Oxidative stress.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Ciclo biológico de *Schistosoma* spp.

Figura 2. Estrutura química do Praziquantel

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

1		
2		
3	Ag ⁺	íon prata
4	AgCl	Cloreto de Prata
5	AgNO ₃	Nitrato de Prata
6	AgNp	Nanopartícula de Prata
7	AgNp-Bio	Nanopartícula Biogênica de Prata
8	APC	do inglês <i>Antigen-Presenting Cells</i>
9	ATP	do inglês <i>Adenosine TriPhosphate</i>
10	AuNp	Nanopartícula de Ouro
11	BCS	do inglês <i>Biopharmaceutics Classification System</i>
12	BH	Belo Horizonte
13	Bio-AgNp	do inglês <i>Biogenic Silver Nanoparticles</i>
14	CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
15	CD86	do inglês <i>Cluster of Differentiation 86</i>
16	CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
17	CuSO ₄	Sulfato de Cobre
18	DALYs	do inglês <i>Disability-Adjusted Life-Years</i>
19	DCF	Dichlorofluorescein
20	DMSO	Dimetilsulfóxido
21	DNA	do inglês <i>Deoxyribonucleic acid</i>
22	DTNs	Doenças Tropicais Negligenciadas
23	ERO	Espécies Reativas de Oxigênio
24	E/S	Excretado/Secretado
25	FBS	do inglês <i>Fetal Bovine Serum</i>
26	GBD	do inglês <i>Global Burden of Disease</i>
27	GPCR	do inglês <i>G Protein-Coupled Receptor</i>
28	HEPES	N-(2- hidroxietil)piperazina-N'-(2-ácido etanosulfônico)
29	HPLC	do inglês <i>High Performance Liquid Chromatography</i>
30	H ₂ O ₂	peróxido de hidrogênio
31	H ₂ DCFDA	2',7'- diacetato de diclorodihidrofluoresceína
32	iNOS	do inglês <i>inducible Nitric Oxide Synthase</i>
33	IL	Interleucina
34	ILC2s	do inglês <i>type 2 Innate Lymphoid Cells</i>

1	IFN- γ	Interferon-gama
2	IgE	Imunoglobulina E
3	iTregs	do inglês <i>induced T regulatory</i>
4	KH ₂ PO ₄	Fosfato monopotássico
5	KO	do inglês <i>Knockout</i>
6	KOH	hidróxido de potássio
7	OMS	Organização Mundial da Saúde
8	LC ₅₀	do inglês <i>Lethal Concentration 50%</i>
9	MDA	do inglês <i>Malondialdehyde</i>
10	MDC	do inglês <i>Monodansilcadaverine</i>
11	MET	Microscopia Eletrônica de Transmissão
12	MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
13	MHC	do inglês <i>Major Histocompatibility Complex</i>
14	MTT	brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2il)-2,5-difeniltetrazólio
15	NaCl	cloreto de sódio
16	Nps	Nanopartículas
17	NR	do inglês <i>Nile Red</i>
18	NTA	do inglês <i>Nanoparticle Tracking Analysis</i>
19	NTS	do inglês <i>Newly Transformed Schistosomula</i>
20	NO	do inglês <i>Nitric Oxide</i>
21	NOS	do inglês <i>Nitric Oxide Oynthase</i>
22	NO ₂ ⁻	dióxido de nitrogênio
23	nTregs	do inglês <i>natural T regulatory</i>
24	OMS	Organização Mundial da Saúde
25	OXA	Oxamniquina
26	PBS	do inglês <i>Phosphate-Buffered Saline</i>
27	PDA	do inglês <i>Photodiode Array</i>
28	PG	Prostaglandina
29	PI	do inglês <i>Propidium Iodide</i>
30	PZQ	Praziquantel
31	ROS	do inglês <i>Reactive Oxygen Species</i>
32	RNA	do inglês <i>Ribonucleic Acid</i>
33	RPMI 1640	do inglês <i>Roswell Park Memorial Institute 1640</i>
34	SAC	do inglês <i>School-Aged Children</i>

1	SEA	do inglês <i>Soluble Egg Antigens</i>
2	SEM	do inglês <i>Scanning Electron Microscopy</i>
3	SOD-3	Superóxido Dismutase-3
4	TEP	do inglês <i>1,1,3,3-tetraethoxypropane</i>
5	Tfh	do inglês <i>T follicular helper</i>
6	TGR	do inglês <i>Thioredoxin Glutathione Reductase</i>
7	Th	do inglês <i>T helper</i>
8	TLR4	do inglês <i>Toll-Like Receptors</i>
9	TLSP	do inglês <i>Thymic Stromal Lymphopoietin</i>
10	TMRE	do inglês <i>Tetramethylrhodamine Ethyl Ester</i>
11	TNF- α	do inglês <i>Tumor Necrosis Factor-alpha</i>
12	Tregs	do inglês <i>T regulatory</i>
13	WHO	do inglês <i>World Health Organization</i>
14	5-HT _{2B}	do inglês <i>5-Hydroxytryptamine receptor 2B</i>
15	$\Delta\Psi_m$	do inglês <i>Mitochondrial Membrane Potential</i>

SUMÁRIO

1		
2		
3	1. INTRODUÇÃO	14
4	1.1 Doenças tropicais negligenciadas e esquistossomose.....	14
5	1.2 Distribuição geográfica e dados epidemiológicos.....	15
6	1.3 Agente etiológico	16
7	1.4 Ciclo biológico	18
8	1.5 Mecanismos imunopatogênicos	21
9	1.6 Tratamentos disponíveis	27
10	1.6.1 Praziquantel.....	27
11	1.6.2 Oxamniquina e outros medicamentos.....	31
12	1.7 Avaliação de novos compostos esquistossomicidas	31
13	1.8 Nanopartículas biogênicas de prata	32
14	1.9 Mecanismos de ação de nanopartículas de prata	35
15	1.10 Nanopartículas no modelo de esquistossomose	36
16		
17	2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	41
18		
19	3. OBJETIVOS	54
20	3.1 Objetivo geral	54
21	3.2 Objetivos específicos.....	54
22		
23	4. PRODUÇÃO CIENTÍFICA.....	55
24	4.1 Artigo: Biogenic silver nanoparticle exhibits schistosomicidal activity <i>in vitro</i> and	
25	reduces the parasitic burden in experimental schistosomiasis mansoni	55
26		
27	5. CONCLUSÃO.....	71
28		
29	6. ANEXOS.....	72
30	6.1 Anexo 1. Parecer CEUA-UEL.....	72

1. INTRODUÇÃO

1.1 Doenças Tropicais Negligenciadas e Esquistossomose

As Doenças Tropicais Negligenciadas (DTNs) constituem um grupo diversificado de doenças causadas por agentes infecciosos, que prevalecem em condições climáticas tropicais e subtropicais, sendo reconhecidas pelo subfinanciamento e baixo reconhecimento pelas indústrias farmacêuticas. As DTNs afetam, em sua maioria, populações de baixa renda, cujas condições de moradia, saneamento básico e serviços à saúde são precárias. Assim, a limitação de recursos para o tratamento, controle e eliminação, associado a fatores como clima e condições de pobreza, têm favorecido a propagação dessas doenças (WHO, 2012; HOTEZ et al., 2014).

Essas doenças representam uma carga substancial na saúde e economia de populações pobres e marginalizadas que habitam principalmente a África, Ásia e Américas, podendo causar a morte de mais de 500 mil pessoas, além de resultar numa perda de 57 milhões de anos de vida ajustados por incapacidade (do inglês: DALYs, *disability-adjusted life-years*), anualmente (HOTEZ et al., 2007). Uma das principais características das DTNs é a cronicidade e incapacidade, podendo levar a deformações no indivíduo afetado e acarretar efeitos econômicos, sociais e psicológicos (HOTEZ; BROWN, 2009). Assim, essas doenças são capazes de condicionar as pessoas afetadas à viverem longos anos com deficiência e estigma, mantendo crianças fora da escola, adultos desempregados e sobrecarregando as famílias com custos consideráveis em cuidados de saúde, mantendo-as na situação de pobreza (FITZPATRICK et al., 2017; REES et al., 2019)

Dentre as DTNs mais importantes está a esquistossomose (também conhecida como bilharzíase, doença do caramujo ou barriga d'água), que constitui uma infecção parasitária causada por vermes sanguíneos do gênero *Schistosoma*, descrita primeiramente por Theodor Bilharz no ano de 1851 (JORDAN, 2000; STEINMANN et al., 2006). A esquistossomose é considerada a segunda principal causa de morbidade e mortalidade dentre as doenças parasitárias, depois da malária, responsável por desenvolver estágios agudo e crônico no indivíduo afetado, associados a fatores como intensidade parasitária, duração da infecção e desenvolvimento de reações granulomatosas (STEINMANN et al., 2006; GRYSSELS,

2012). A natureza crônica e debilitante da doença resulta em altos custos para saúde pública e perdas de produtividade em países em desenvolvimento, comprometendo, principalmente, o crescimento e desenvolvimento cognitivo de crianças com idade entre 5 e 14 anos e levando à interrupção da frequência escolar (EZEAMAMA et al., 2012).

1.2 Distribuição geográfica e dados epidemiológicos

A infecção por helmintos do gênero *Schistosoma* está diretamente associada a corpos de água (lagos, rios, riachos e represas) infestados por cercárias, bem como o contato destas com pés descalços, natação, lavagem de roupas, além de atividades de pesca e irrigação (KABATEREINE et al., 2004). Fatores como temperatura da água, presença de hospedeiro intermediário, movimento populacional e construção de barragens de água para irrigação e energia hidrelétrica também constituem determinantes importantes para distribuição e transmissão destes parasitos (BRASIL, 2008).

Anteriormente, a transmissão da esquistossomose ocorria principalmente nas áreas rurais, no entanto, como resultado das transformações demográficas e ecológicas que ocorreram nas últimas décadas, a distribuição da doença tem sido alterada. A expansão rural, o intenso fluxo migratório de pessoas de áreas endêmicas rurais para áreas urbanas e a rápida urbanização, tem disseminado cada vez mais as doenças parasitárias para áreas urbanas. Em vista disso, devido à falta de saneamento adequado, esgoto lançado em corpos de água doce e reaproveitamento de águas servidas na agricultura, a esquistossomose persiste como problema de saúde pública (NETO et al., 2012; GOMES et al., 2012; OLIVEIRA et al., 2013).

A ampla distribuição dos moluscos (hospedeiros intermediários) do gênero *Biomphalaria* também favorece a expansão territorial desta doença por meio do estabelecimento de focos de transmissão. No Brasil, foram descritas 11 espécies de *Biomphalaria*, das quais, três dessas são consideradas hospedeiras naturais de *S. mansoni*: *B. glabrata*, *B. tenagophila* e *B. straminea* (BRASIL, 2008). Em vista disso, a distribuição do vetor tem sido diretamente correlacionada com a distribuição dos casos de esquistossomose no país (SCHOLTE et al., 2012).

1 De acordo com a Organização Mundial da Saúde, a transmissão da
2 doença já foi relatada em 78 países de regiões tropicais e subtropicais, no entanto, a
3 quimioterapia preventiva é necessária em 52 países considerados endêmicos para a
4 doença com transmissão moderada e alta. Globalmente, estima-se que 700 milhões
5 de pessoas estejam sob-risco de infecção e cerca de 240 milhões de pessoas sejam
6 infectadas com a doença anualmente (WHO, 2017; MCMANUS et al., 2018). Em 2017,
7 a carga global da esquistossomose foi estimada em 1,43 milhões de anos de vida
8 ajustados por incapacidade, a terceira maior carga entre as DTNs (GBD, 2017).

9 No Brasil, a forma prevalente da doença é a esquistossomose
10 mansônica, cujo agente etiológico constitui o parasito *S. mansoni*, estando presente
11 em 19 estados (BRASIL, 2014). Segundo dados obtidos pelo Inquérito Nacional de
12 Prevalência da Esquistossomose mansoni e Geo-helmintoses (2010–2015), estima-
13 se que 1,5 milhões de pessoas tenham sido infectadas no Brasil (quase 1% da
14 população) (KATZ, 2018). Em estudo de âmbito nacional realizado durante o período
15 de 2000-2011, foi avaliado que das 12.491.280 mortes registradas no país, 76.847
16 (0,62%) foram causadas por DTNs. A esquistossomose foi a segunda causa de morte
17 dentre as DTNs, constituindo 8,2% (6.319 óbitos) (MARTINS-MELO et al., 2016). Em
18 outro estudo realizado no período de 2009-2013, foi avaliado que do total de 64.567
19 casos de DTNs (leishmaniose, malária, esquistossomose e doença de Chagas), a
20 esquistossomose representou 34,61% (22.348) dos casos, sendo a segunda infecção
21 parasitária mais notificada no país (BRANDÃO et al., 2017).

22 Embora a mortalidade tenha diminuído muito nos últimos anos, a
23 esquistossomose ainda é uma importante causa de mortes no Brasil, com diferenças
24 regionais consideráveis (MARTINS-MELO et al., 2014). Além disso, em estudo
25 realizado por Ferreira e colaboradores (2017), foi avaliado que formas clínicas graves
26 de esquistossomose podem estar presentes mesmo em áreas de baixa endemia
27 (FERREIRA et al., 2017).

29 **1.3 Agente etiológico**

30
31 Como resultado da co-evolução com o hospedeiro humano, o parasito
32 *S. mansoni* é atualmente bem adaptado a desenvolver infecções crônicas, refletindo
33 um tempo de vida estimado em 5,7-10,5 anos nestes hospedeiros (FULFORD et al.,
34 1995; WEBSTER; GOWER; BLAIR, 2004). Evidentemente, a adaptação bem-

1 sucedida estabeleceu uma relação parasito-hospedeiro de tal forma que a infecção
2 assintomática está presente em mais de 90% dos indivíduos, no entanto, alguns
3 infectados desenvolvem fibrose hepática, hepatoesplenomegalia grave e hipertensão
4 portal (COLLEY et al., 2014).

5 A doença tem como agente causador parasitas pertencentes ao filo
6 Platyhelminthes, classe Trematoda, subclasse Digenea, ordem Strigeiformes, família
7 Schistosomatidae e gênero *Schistosoma*. A família Schistosomatidae é representada
8 por parasitas dioicos, que apresentam acentuado dimorfismo sexual e heteroxênicos
9 (digenéticos). São responsáveis por parasitar vasos sanguíneos dos hospedeiros
10 definitivos, eliminarem ovos embrionados (com miracídio) e ter cercárias como formas
11 infectantes para o hospedeiro definitivo, que penetram por via transcutânea. As formas
12 larvais ocorrem em hospedeiros intermediários, que correspondem a caramujos
13 aquáticos do filo Mollusca, classe Gastropoda, família Planorbidae e gêneros
14 *Biomphalaria*, *Bulinus* ou *Oncomelania* (CARVALHO; COELHO; LENZI, 2008).

15 Atualmente existem três espécies principais pertencentes ao gênero
16 *Schistosoma*, sendo estas: *S. mansoni*, *S. japonicum* e *S. haematobium*, e três outras
17 espécies de menor distribuição geográfica: *S. intercalatum*, *S. mekongi* e *S.*
18 *guineensis* (MCMANUS et al., 2018). De maneira geral, os vermes adultos atingem de
19 1 a 2 cm de comprimento e 0,3 a 0,6 mm de largura, das quais vivem, acasalam e se
20 alimentam de sangue nos vasos portais e mesentéricos (*S. mansoni*, *S. japonicum*, *S.*
21 *intercalatum*, *S. mekongi* e *S. guineensis*) ou no plexo vesical (*S. haematobium*)
22 (STURROCK, 2001; MCMANUS et al., 2018).

23 Os vermes adultos absorvem grandes quantidades de eritrócitos, uma
24 vez que, vermes machos ingerem aproximadamente 100 nl, enquanto as fêmeas se
25 alimentam mais ativamente 900 nl, cerca de 4 vezes o volume corporal (SKELLY et
26 al., 2014). Além disso, estudos demonstram que as formas adultas também são
27 responsáveis por ingerir macromoléculas como albumina, dextrana, imunoglobulinas
28 e fosfolípidios por meio do aparato bucal (BARRETT, 2009; SKELLY et al., 2014).
29 Durante o acasalamento, o macho envolve a fêmea em seu canal ginecóforo e inicia-
30 se a produção de ovos, dos quais medem aproximadamente 150 µm de comprimento
31 por 65 µm de largura e são facilmente reconhecidos pela presença de um espículo
32 situado no pólo posterior lateral (*S. mansoni*). Em contato com água, os ovos
33 eclodem liberando uma larva ciliada de forma cilíndrica, também conhecida como
34 miracídio, que possui 160 µm de comprimento por 60 µm de largura. O miracídio

1 possui uma papila apical na região anterior conhecida como terebratorium,
2 responsável pela adesão e penetração no corpo do hospedeiro intermediário, onde se
3 multiplica assexuadamente (CARVALHO; COELHO; LENZI, 2008).

4 Do hospedeiro intermediário emergem milhares de cercárias móveis
5 de cauda bifurcada, que possuem 500 µm de comprimento e duas ventosas: oral
6 (anterior) e ventral (acetábulo), especializadas na fixação e invasão no hospedeiro
7 definitivo (DORSEY et al., 2002). Ao encontrar a pele humana, as cercárias penetram
8 com a ajuda de suas secreções glandulares e, em poucos minutos, perdem a cauda
9 e passam para respiração anaeróbica, diferenciando-se em esquistossômulos. Essa
10 transformação de água doce para um ambiente intravascular no hospedeiro humano
11 está associada à formação de uma membrana heptalamina e a outras mudanças
12 na morfologia, metabolismo e fisiologia. Os esquistossômulos alcançam os pulmões,
13 medindo cerca de 400 µm, e em torno de uma semana atingem o fígado, onde sofrem
14 a transição para vermes adultos, com importantes mudanças fisiológicas e
15 morfológicas (CARVALHO; COELHO; LENZI, 2008).

16 17 **1.4 Ciclo biológico**

18
19 O ciclo de vida de *S. mansoni* é bastante complexo e inclui a presença
20 do homem como hospedeiro definitivo e caramujos do gênero *Biomphalaria* como
21 hospedeiros intermediários (CARVALHO; COELHO; LENZI, 2008). Inicia-se quando
22 pessoas infectadas com o parasito contaminam fontes de água doce com ovos
23 liberados junto ao material fecal ou urina do hospedeiro humano. Devido a estímulos
24 luminosos e temperatura ambiente elevada, ovos maduros eclodem liberando
25 miracídios, que através de mecanismos quimiotáticos detectam moléculas dos
26 caramujos e os infectam. Após 72 h de penetração os miracídios diferenciam-se em
27 esporocisto primário, que através de sucessivas multiplicações se desenvolve em
28 esporocisto secundário, e então evolui para as formas cercarianas. Após 30 dias de
29 infecção, as cercárias emergem dos caramujos, sendo estimado que a cada miracídio
30 capaz de infectar o caramujo, resulte na liberação de 300 mil cercárias (CARVALHO;
31 COELHO; LENZI, 2008; SCHWARTZ; FALLON, 2018).

32 As cercárias liberadas no ambiente aquático pelos caramujos são
33 capazes de sobreviver por até 72 horas, sendo estimuladas por meio de luz (fototaxia)
34 e orientadas para encontrar o hospedeiro humano através de gradiente térmico e

1 quimiotaxia, incluindo a presença de ceramidas e ácidos graxos (MCKERROW;
2 SALTER, 2002; GRYSEELS et al., 2006; MARTINS SILVA, 2016) No processo de
3 invasão ocorre a liberação de uma potente protease, denominada elastase cercariana,
4 presente nas secreções da glândula acetabular, responsável por degradar a elastina
5 dérmica (INGRAM et al., 2012).

6 O processo de penetração das cercárias ocorre em minutos, no
7 entanto, o parasito pode permanecer na pele por horas ou dias, onde sofrem
8 alterações morfológicas e bioquímicas e diferenciam-se em esquistossômulos, os
9 quais alcançam os vasos sanguíneos e linfáticos (MCKERROW; SALTER, 2002; HE;
10 CHEN; RAMASWAMY, 2002; CURWEN; WILSON, 2003). Grabe e Haas (2004)
11 mostraram em seus estudos que os esquistossômulos apresentam uma foto-
12 orientação negativa e podem responder a gradientes químicos do corpo humano como
13 L-arginina, D-glicose e a peptídeos presentes no soro e em células endoteliais como
14 fibronectina e bradicinina. Assim que vencem a barreira epidérmica, após 4-5 dias de
15 infecção os esquistossômulos atingem os pulmões, onde permanecem por 2-3 dias
16 (GRABE; HAAS, 2004). Acredita-se que através da rede vascular pulmonar e devido
17 a alterações no tegumento, dimensões e atividade, os esquistossômulos são capazes
18 de atingir facilmente o tecido hepático. Assim, em torno de uma semana pós-infecção
19 os primeiros esquistossômulos chegam ao fígado, e somente estes sofrem alterações
20 morfológicas e fisiológicas diferenciando-se em vermes adultos (GRABE; HAAS,
21 2004; CARVALHO; COELHO; LENZI, 2008).

22 Nos vermes adultos machos e fêmeas é possível observar a presença
23 de duas ventosas, uma oral utilizada para digestão de alimentos e eliminação de
24 materiais residuais do metabolismo, e outra ventral (acetábulo) importante para
25 fixação no hospedeiro. Entre os vermes é possível identificar dimorfismo sexual no
26 qual o macho apresenta um canal ginecóforo onde a fêmea se insere durante a cópula,
27 além de lobos testiculares e tubérculos (protuberâncias no tegumento); enquanto as
28 fêmeas são mais escuras (hemozoína), sendo a superfície do corpo escavada e com
29 poucos espinhos (CARVALHO; COELHO; LENZI, 2008).

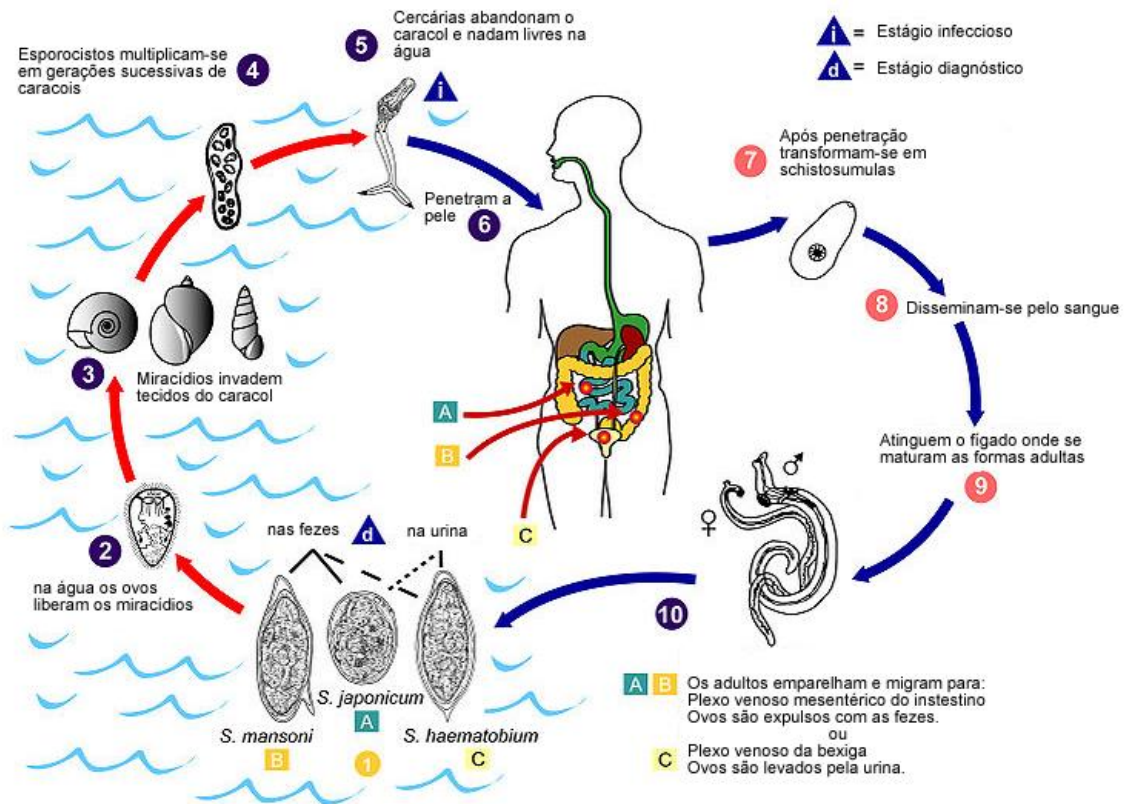
30 O tegumento dos vermes adultos é formado por uma estrutura única
31 que forma uma superfície interativa com o hospedeiro, importante para adaptação na
32 corrente sanguínea. Esta estrutura é composta por duas bicamadas lipídicas, sendo
33 uma membrana plasmática interna e um membranocélice secretado externamente
34 (formado por fusão de vesículas multilaminadas, produzidas nos corpos celulares).

1 Tal membrana especializada auxilia em uma maior sobrevivência do parasito dentro do
2 hospedeiro, uma vez que a liberação do conteúdo dessas vesículas é capaz de
3 renovar constantemente o tegumento (VAN HELLEMOND et al., 2006), e ainda,
4 promover a mudança de um estado imunossensível para imuno-refratário dos vermes
5 adultos (JONES et al., 2004). Sendo assim, o tegumento dos vermes adultos está
6 relacionado com um dos principais mecanismos de evasão e modulação do sistema
7 imune do hospedeiro, inibindo a ação do sistema complemento, além de participar do
8 processo de nutrição, excreção, transdução de sinal e osmorregulação (JONES et al.,
9 2004; MULVENNA et al., 2010), demonstrando a importância dos estudos
10 topográficos nos aspectos do dano induzido por drogas (AMIN; MIKHAIL, 1989).

11 Durante o ciclo o verme macho alberga a fêmea em seu canal
12 ginecóforo, e acasalados migram contra a corrente circulatória, alojando-se em vasos
13 venosos mesentéricos e hemorroidários, próximos ao intestino, onde podem
14 permanecer em média de 3 a 10 anos (CARVALHO; COELHO; LENZI, 2008). Essa
15 capacidade de parasitar por vários anos deve-se à sua habilidade de evitar a
16 depuração imunomediada, uma vez que, a estrutura tegumentar única, dinâmica e as
17 complexas estratégias imuno-evasivas empregadas por esses parasitas os ajudam a
18 sobreviver no ambiente intravascular hostil (PEARCE; MACDONALD, 2002; KUSEL;
19 AL-ADHAMI; DOENHOFF, 2007). Estima-se que vermes adultos fêmeas são capazes
20 de produzir cerca de 300 ovos por dia (PEARCE; MACDONALD, 2002).

21 Após o acasalamento e a liberação de ovos pelos vermes adultos
22 fêmeas, estes são depositados no revestimento endotelial dos vasos mesentéricos,
23 podendo ser disseminados através do fluxo sanguíneo para outros órgãos ou
24 translocados através do epitélio intestinal. Sabe-se que do total, cerca de 50 a 60%
25 dos ovos ficam retidos na mucosa intestinal e, quando não deixam os vasos, são
26 carregadas pelo fluxo sanguíneo, alojando-se em tecidos como intestino, fígado e baço.
27 A presença dos ovos nestes tecidos atua como estímulo antigênico contínuo da
28 resposta imune do hospedeiro, evocando inflamação e formação de granuloma
29 (CHUAH et al., 2014; SCHWARTZ; FALLON, 2018) (**Figura 1**).

1 **Figura 1.** Ciclo biológico de *Schistosoma* spp.



2 **Fonte:** Adaptado de Centro de Controle e Prevenção para Doenças (CDC, 2020). Ovos
 3 de *Schistosoma* spp. são primeiramente eliminados juntamente com fezes ou urina (1). Em condições
 4 apropriadas os ovos sofrem eclosão e liberam os miracídeos (2). Os miracídeos penetram em
 5 hospedeiros intermediários específicos (3), onde sofrem sucessivas divisões, produzindo milhares de
 6 esporocistos (4) e liberando as cercárias (5). As cercárias infectantes penetram na pele do hospedeiro
 7 humano (6), perdendo a cauda bifurcada e diferenciando-se em esquistossômulos (6). Os
 8 esquistossômulos migram através da circulação venosa para os pulmões (8) e então atingem o sistema
 9 porta-hepático, onde sofrem maturação (8). Vermes adultos machos e fêmeas copulam e migram para
 10 vênulas mesentéricas (*S. mansoni* e *S. japonicum*) ou plexo venoso vesicular e pélvico da bexiga (*S.*
 11 *haematobium*) (10), onde iniciam a deposição de ovos que são eliminados com as fezes ou urina,
 12 respectivamente (1), dando continuidade ao ciclo biológico.

13

14 **1.5 Mecanismos imunopatogênicos**

15

16 A esquistossomose causa uma série de morbidades, cujo
 17 desenvolvimento é influenciado em grande parte pela natureza da resposta imune
 18 induzida e seus efeitos na formação de granuloma e patologias associadas em
 19 órgãos-alvo (PEARCE; MACDONALD, 2002). A progressão das infecções
 20 esquistossomóticas, bem como o perfil de resposta imune, ocorre através de pelo
 21 menos três fases: infecção aguda, infecção ativa estabelecida e infecção crônica

1 tardia. Esses estágios podem ser influenciados pela forma evolutiva do parasito,
2 duração da infecção no indivíduo, pelas taxas de excreção de ovos nas fezes,
3 manifestações clínicas e sintomatologia (MCMANUS et al., 2018).

4 A fase aguda representa a fase inicial da doença, caracterizada pela
5 resposta imune do hospedeiro frente à penetração da cercária, aos esquistossômulos
6 e vermes adultos, sendo os sintomas clínicos frequentemente relatados em pessoas
7 não previamente expostas ao parasito, como turistas e imigrantes (CALDAS et al.,
8 2008; CLERINX; VAN GOMPEL, 2011). Assim, após a penetração cercariana na pele
9 intacta do hospedeiro definitivo, a maior parte das larvas infecciosas migram através
10 da pele e atingem a vasculatura e vasos linfáticos, enquanto uma pequena porção
11 morre no local (MARTINS SILVA, 2016). Essas cercárias mortas desencadeiam uma
12 reação de hipersensibilidade mediada pela produção de IgE, resultando em reações
13 maculo-papulares e prurido nas partes do corpo que foram expostas, manifestações
14 conhecidas como dermatite cercariana ou coceira do nadador (PLEASS; KUSEL;
15 WOOF, 2000).

16 Embora as respostas imunes dérmicas não sejam bem elucidadas até
17 o momento, modelos murinos demonstram que há uma resposta inflamatória no
18 primeiro contato com as cercárias. Em estudos com camundongos, a invasão de
19 cercárias de *S. mansoni* é capaz de induzir inflamação com presença de infiltrado
20 dérmico, demonstrando aumento na migração de células apresentadoras de
21 antígenos (do inglês APCs, *antigen-presenting cells*), como macrófagos e células
22 dendríticas, para o linfonodo drenante da pele, bem como aumento dos níveis de
23 marcadores de ativação celular (MHC de classe II e CD86) e expressão de citocinas
24 pró-inflamatórias como interleucina (IL)-6, IL-1 β , IL-12 e IL-18 (HOGG; KUMKATE;
25 MOUNTFORD, 2003; MOUNTFORD; TROTTEIN, 2004).

26 No entanto, durante a diferenciação dessas larvas em
27 esquistossômulos ocorre a liberação de produtos excretórios/secretórios (ES) que são
28 capazes de regular a resposta inflamatória induzida na pele (HANSELL et al., 2008;
29 SANIN; MOUNTFORD, 2015). Assim, prostaglandinas (PG) E₂ e D₂ bem como outros
30 produtos ES provenientes do parasito são responsáveis por induzir a produção de IL-
31 10 e receptor antagonista de IL-1 (IL-1ra), os quais regulam de forma negativa a
32 produção de citocinas pró-inflamatórias e a expressão moléculas coestimulatórias
33 (HOGG et al., 2003; HE; CHEN; RAMASWAMY, 2002; MOUNTFORD; TROTTEIN,
34 2004)

1 Assim, após a penetração bem-sucedida de algumas cercárias e
2 maturação dos esquistossômulos, a infecção pode ser assintomática, ou ainda pode
3 seguir para um quadro agudo sintomático conhecido como Febre de Katayama ou
4 Síndrome de Katayama, que provoca reações de hipersensibilidade sistêmica e
5 formação de imunocomplexos (ROSS et al., 2002; ROSS *et al.*, 2007). Esse estágio é
6 caracterizado por uma doença febril debilitante, prostração, calafrios e
7 esplenomegalia. Os sintomas geralmente são acompanhados de eosinofilia e
8 presença de infiltrado inflamatório pulmonar (ROSS et al., 2007; HAMS; AVIELLO;
9 FALLON, 2013). Sintomas abdominais também podem ocorrer mais tardiamente
10 nesta fase, causados principalmente pela migração e posicionamento dos vermes
11 maduros e início da postura e eliminação dos ovos (GRYSEELS et al., 2006). A
12 maioria dos pacientes se recupera espontaneamente, porém, alguns desenvolvem
13 doença mais séria e persistente (MCMANUS et al., 2018).

14 Assim, durante as primeiras semanas que marcam a fase aguda, com
15 início da maturação e migração dos parasito através da corrente sanguínea, a
16 resposta dominante é do tipo T-helper 1 (Th1) caracterizada pela elevada produção
17 de fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α), interferon-gama (IFN- γ), IL-12, IL-1 e IL-6
18 (PEARCE; MACDONALD, 2002). No entanto, com o decorrer da infecção, ocorre
19 maturação completa dos esquistossômulos e desenvolvimento dos vermes adultos,
20 dos quais residem em vasos sanguíneos e não estimulam inflamação local. Isso pode
21 ser explicado pelo fato de os vermes possuírem células-tronco somáticas que
22 permitem uma regeneração imediata do tegumento e consequente ligação aos
23 antígenos do hospedeiro, no qual oculta seus antígenos e inibe uma resposta
24 imunológica efetiva, não havendo sintomas de forma direta (COLLEY; SECOR, 2014).

25 Em seguida, com o estabelecimento da doença e liberação de ovos
26 pré-formados, inicia-se uma regulação negativa da resposta Th1 através da liberação
27 de IL-4 e IL-10, responsáveis por conter uma resposta inflamatória exacerbada.
28 Hoffmann, Cheever e Wynn (2000) demonstraram que camundongos deficientes em
29 IL-10 e IL-4 são capazes de desenvolver respostas do tipo Th1 extremamente
30 polarizadas, induzindo imunopatologia letal durante a fase aguda da doença
31 (HOFFMANN; CHEEVER; WYNN, 2000).

32 Cerca de 5-6 semanas pós-infecção, fase da infecção ativa
33 estabelecida, os ovos tornam-se maduros, apresentando desenvolvimento miracidial
34 completo, formação do envelope de Von Lichtenberg que o envolve internamente,

1 além de uma intensa liberação de proteínas (ASHTON et al., 2001). Os antígenos
2 solúveis (do inglês: SEA, *soluble egg antigens*) excretados/secretados (ES) pelos
3 ovos durante essa fase demonstram ser fatores-chave na transição de Th1 para Th2,
4 regulando a imunopatologia associada à resposta do tipo 1 (ASHTON et al., 2001;
5 MEEVISSSEN et al., 2010; ZHENG et al., 2020). Conforme demonstrado por Fahel et
6 al., (2010), dentre os principais componentes do SEA está o ISPE/alta-1, responsável
7 por induzir resposta imunológica mista de perfil Th1/Th2 estimulando a produção de
8 IFN- γ , TNF- α , IL-4, IL-5 e IL-13 (FAHEL et al., 2010). Everts et al. (2009), também
9 mostraram que o ômega-1 constitui uma importante proteína do SEA que condiciona
10 células dendríticas para a polarização de Th2 tanto *in vitro* como *in vivo*, suprimindo a
11 maturação e produção de citocinas por meio de receptores Toll-like 4 (do inglês: TLR4,
12 *Toll-like receptors*) (EVERTS et al., 2009). Outro componente envolvido na
13 polarização da resposta constitui o oligossacarídeo lacto-N-fucopentaose III,
14 importante na ativação de células apresentadoras de antígenos e indução de resposta
15 Th2 (SRIVASTAVA et al., 2014).

16 Assim, com o progresso da infecção ocorre a mudança no perfil de
17 resposta imune, sendo observado aumento de produção de citocinas do tipo Th2,
18 incluindo IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13, eosinofilia, além de aumento da produção de
19 imunoglobulina E (IgE) e consequente diminuição da resposta do tipo Th1 (PEARCE;
20 MACDONALD, 2002; PEARCE et al., 2004; BURKE et al., 2009; HAMS; AVIELLO;
21 FALLON, 2013). A citocina IL-4 possui um papel crítico no desenvolvimento da
22 resposta Th2, uma vez que, em estudo com camundongos infectados que receberam
23 anti-IL-4 foi observado diminuição de IL-4, IL-5 e IL-10 e aumento de IL-2 e IFN- γ
24 (CHEEVER et al., 1994). Em estudo realizado com animais *knockout* (KO) para IL-4
25 foi avaliado que estes ainda eram capazes de gerar granulomas, no entanto, aqueles
26 que eram deficientes para o receptor de IL-4 (IL-4R α) exibiam granulomas menores,
27 demonstrando que a reação granulomatosa pode ser dependente de IL-4R α e não
28 apenas de IL-4 (JANKOVIC et al., 1999). Em modelo murino, sabe-se que a
29 sinalização via IL-4/IL-4R α é essencial para a sobrevivência dos camundongos
30 infectados e proteção da inflamação intestinal, levando à ativação de macrófagos
31 alternativamente ativados (M2) (HERBERT et al., 2004; HERBERT et al., 2008).

32 Outra citocina que possui papel importante na formação do granuloma
33 e fibrose é a IL-13, uma vez que, seu bloqueio demonstrou ser eficaz no tratamento
34 da fibrose hepática induzida em camundongos infectados por *S. mansoni*

1 (CHIARAMONTE et al., 2001). A IL-13 é produzida a partir de estímulos de IL-33, IL-
2 25 e linfopoietina estromal tímica (do inglês: TLSP, *thymic stromal lymphopoietin*)
3 induzidos em células imunes, bem como em células linfoides inatas do tipo 2 (do
4 inglês: ILC2s, *type 2 innate lymphoid cells*) (SOUMELIS et al., 2002; SCHMITZ et al.,
5 2005), sendo importante na indução da polarização de macrófagos M2 (PENG et al.,
6 2016; HE et al., 2018). Ambas citocinas IL-13 e IL-4 são responsáveis por induzir a
7 expressão de arginase-1 (Arg-1) em macrófagos M2, enzima que tem como substrato
8 a L-arginina, aminoácido crucial para a produção de colágeno e desenvolvimento de
9 fibrose (HESSE et al., 2001).

10 Em infecções por *S. mansoni* também é observada intensa migração
11 de neutrófilos durante a reação granulomatosa, entanto, sua função ainda não é bem
12 estabelecida. Sabe-se que essas células podem atuar como células efetoras
13 principais contra vermes adultos ou mesmo participar da homeostase do tecido,
14 favorecendo o estabelecimento do parasito, ou ainda podendo servir de facilitadores
15 de remodelação do tecido e eliminação de detritos durante a infecção (DIAS et al.,
16 2018). Em estudos com modelo murino e populações endêmicas são demonstrados
17 associações entre a presença de eosinófilos e produção de citocinas do perfil Th2,
18 principalmente IL-4 e IL-5, além de ser observado aumento na contagem dessas
19 células (CHEN et al., 2004; FITZSIMMONS et al., 2004).

20 Ainda, foi demonstrado que a depleção da resposta Th2 pode resultar
21 em dano tecidual e aumento da mortalidade, como consequência da intensa resposta
22 inflamatória voltada para o perfil Th1 (FALLON; SMITH; DUNNE, 1998; LA FLAMME
23 et al., 2001). Em vista disso, a resposta mediada pelo perfil Th2 durante a
24 esquistossomose atua como uma “faca de dois gumes”, uma vez que a resposta
25 granulomatosa pode ser considerada prejudicial ao fígado devido à progressão da
26 fibrose hepática, no entanto, a formação do granuloma permite controlar a secreção
27 contínua de antígenos secretados pelos ovos, que podem levar a respostas
28 inflamatórias descontroladas e danos permanentes aos tecidos (ZHENG et al., 2020).

29 Além da participação de respostas do tipo 1 e 2, estudos também têm
30 demonstrado um importante papel de respostas pertencentes ao perfil Th17. Sabe-se
31 que a citocina IL-23 derivada de células dendríticas estimuladas por SEA é capaz de
32 induzir a produção da IL-17 em camundongos (SHAINHEIT et al., 2008). Além disso,
33 a formação do granuloma tem sido associada com altos níveis de IL-17, uma vez que,

1 o tratamento com anticorpos neutralizantes anti-IL-17 mostrou ser capaz de inibir
2 inflamação granulomatosa (RUTITZKY; LOPES DA ROSA; STADECKER, 2005).

3 Células T auxiliares foliculares (Tfh) também estão envolvidas na
4 imunopatologia da esquistossomose, uma vez que, SEA provenientes dos ovos são
5 capazes de induzir a diferenciação destas células em centros germinativos e promover
6 a produção de IL-21, correlacionando com a progressão da fibrose hepática
7 (ZARETSKY et al., 2009; WANG et al., 2017). Zhan et al. (2017) também avaliaram a
8 participação de respostas pertencentes ao perfil Th9, identificando elevados níveis de
9 IL-9 em camundongos infectados, consistente com a inflamação granulomatosa
10 hepática (ZHAN et al., 2017).

11 Por fim, as células T regulatórias (Tregs) também foram avaliadas
12 durante a patologia da esquistossomose. Cerca de 8-16 semanas pós-infecção, SEA
13 e moléculas provenientes de esquistossomos induzem potente geração de Tregs
14 naturais (nTregs) no granuloma, das quais são responsáveis por suprimir a ativação
15 de células dendríticas, mediar respostas Th2 e inibir o desenvolvimento do granuloma
16 e a progressão da fibrose (SINGH et al., 2005; ZHENG et al., 2020). Conforme a
17 doença progride, as nTregs expressam fortemente CD103 (do inglês: *Cluster of*
18 *Differentiation 103*), promovendo um estado de imunossupressão (BAUMGART et al.,
19 2006). As Tregs induzíveis (iTregs) também possuem um papel importante através da
20 secreção de IL-10, que suprime a produção de IL-12 e conseqüentemente, o
21 desenvolvimento de respostas Th1, além de levar à inibição da proliferação de células
22 T CD4⁺, demonstrando que ambas respostas comandadas por nTregs e iTregs são
23 capazes de regular respostas Th1 e Th2 (MCKEE; PEARCE, 2004; PEARCE et al.,
24 2004; TURNER et al., 2011; ZHENG et al., 2020).

25 Os granulomas formados durante a esquistossomose compreendem
26 em estruturas compactas e organizadas, compostos por células migrantes,
27 especialmente macrófagos, eosinófilos, linfócitos, que juntamente com células dos
28 órgãos afetados e com componentes de uma matriz extracelular heterogênea, formam
29 uma estrutura esférica que se organiza ao redor do ovo do parasito. Assim, os
30 granulomas apresentam uma grande riqueza celular, dispostas de maneira mais
31 organizada, permitindo a caracterização de 3 regiões: a região central com predomínio
32 de macrófagos, a camada medial composta principalmente por fibras arranjadas
33 concêntricamente e a camada periférica, onde observa-se uma riqueza celular e fibras

1 reticulares frouxamente dispostas (CARVALHO; COELHO; LENZI, 2008;
2 SCHWARTZ; FALLON, 2018).

3 As lesões granulomatosas induzidas pelos ovos são encontradas
4 principalmente em órgãos-alvo como fígado, intestino e baço, no entanto, o principal
5 sítio de formação do granuloma é circundando ovos alojados nas vênulas capilares
6 pré-sinusoidais do fígado. Esses granulomas dão origem a fibrose grave que
7 interrompe o fluxo sanguíneo através do fígado, causando hipertensão portal. No
8 intestino, a deposição de ovos causa uma resposta granulomatosa da mucosa,
9 levando a pseudopolipose, microulceração e sangramento superficial (GRYSEELS et
10 al., 2006; ROSS et al., 2002). Os sintomas clínicos na fase crônica ativa geralmente
11 se correlacionam positivamente com a intensidade da infecção, conforme indicado
12 pela contagem de ovos excretados, e são mediados por inflamação induzida por ovo
13 e reações granulomatosas (MCMANUS et al., 2018).

14 Na fase crônica tardia, com predomínio de células Tregs, há uma
15 redução no número de vermes e conseqüentemente redução no número de ovos
16 excretados nas fezes ou depositados no tecido. Ao mesmo tempo, os novos
17 granulomas são menores em tamanho, demonstrando menos infiltrado inflamatório e
18 substituição por tecido fibroso (cicatrização) (MCMANUS et al., 2018). Em indivíduos
19 que desenvolvem a esquistossomose hepatoesplênica grave, a fibrose do trato portal
20 hepático leva a lesões vasculares obstrutivas, hipertensão portal, ascite,
21 desenvolvimento de varizes esofagogástrica e hemorragia, além de causar dilatação
22 anormal do fígado, também conhecida como hepatomegalia (HAMS; AVIELLO;
23 FALLON, 2013).

24

25 **1.6 Tratamentos disponíveis**

26

27 *1.6.1 Praziquantel*

28

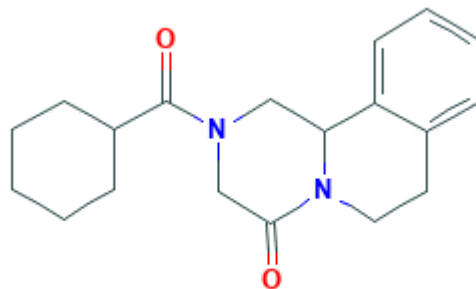
29 O controle da esquistossomose tem se baseado no tratamento
30 comunitário e, principalmente, de crianças em idade escolar (do inglês: SAC, *school-*
31 *aged children*) (5-14 anos), por meio da administração em massa de medicamentos
32 (TOOR et al., 2018). No entanto, uma vez que a eliminação dos parasitos não resulta
33 em imunidade adquirida e os indivíduos tratados podem sofrer uma reinfecção, o
34 programa de controle baseado na administração em massa de medicamentos deve

1 ser empregado continuamente em populações endêmicas. Portanto, a estratégia de
2 tratamento empregada para infecções por *Schistosoma* spp. depende da prevalência
3 de crianças em idade escolar afetadas antes da implementação da quimioterapia
4 preventiva (WERKMAN et al., 2017).

5 Atualmente, a esquistossomose possui um dos níveis mais baixos de
6 cobertura de administração em massa de medicamentos em relação às outras
7 infecções helmínticas (ANDERSON et al., 2015). Desta forma, a OMS pretende
8 aumentar essa cobertura, sobretudo em crianças em idade escolar de países
9 endêmicos (WHO, 2001). No entanto, os adultos jovens (até 25-30 anos) também
10 constituem uma grande proporção dos infectados, assim, caso a administração em
11 massa de medicamentos seja direcionado apenas para SAC, uma grande fração da
12 carga de infecção local por *Schistosoma* spp. permanecerá sem tratamento
13 (ANDERSON et al., 2016).

14 O medicamento de escolha utilizado nos tratamentos em massa de
15 indivíduos infectados é o Praziquantel (PZQ), 2-(ciclohexilcarbonil)-1,2,3,6,7,11-b-
16 hexahidro-4H-pirazino(2,1-a)isoquinolina-4-ona (**Figura 2**).

17
18 **Figura 2.** Estrutura química do Praziquantel.



19 Embora o PZQ seja o principal tratamento para esquistossomose há
20 anos, seu mecanismo exato de ação permanece pouco estabelecido. Sabe-se que *in*
21 *vitro*, após vermes adultos entrarem em contato com o PZQ, há um imediato influxo
22 de cálcio, seguido de uma paralisia muscular (XIAO; MEI; JIAO, 2009). Mais
23 especificamente, o PZQ altera uma subunidade “variante” presente em canais de Ca^{2+}
24 ativados por voltagem localizado na membrana do parasito, interrompendo o
25 transporte de íons (CIOLI et al., 2014). Evidências recentes mostraram que o
26 enantiômero clinicamente ativo, (*R*)-PZQ, atua como um agonista do receptor 2B de
27 5-hidroxitriptamina (do inglês: 5-HT_{2B}, *5-Hydroxytryptamine receptor 2B*) humano, que

1 medeia funções fisiológicas da serotonina. Assim, é estabelecido que (*R*)-PZQ
2 funciona como ligante de receptor acoplado à proteína G (do inglês: GPCR, *G-Protein-*
3 *Coupled Receptors*) e promove o aumento da atividade motora do esquistossomo
4 (CHAN et al., 2017). Além disso, também é visto que, frente ao tratamento com PZQ,
5 o tegumento de vermes adultos sofre vacuolização e formação de bolhas (*blebbing*),
6 mas o mesmo não ocorre em formas mais juvenis (XIAO; MEI; JIAO, 2009).

7 Atualmente, poucos são os esforços das indústrias farmacêuticas
8 para a síntese de novas alternativas de medicamentos anti-helmíntico, no entanto, é
9 válido lembrar que após alguns anos, o uso de PZQ pode levar à resistência do
10 parasito. Estudos realizados evidenciaram que camundongos infectados que
11 receberam tratamentos repetidos *in vivo* de PZQ apresentaram um amadurecimento
12 dos vermes adultos, que por sua vez, reduziram a sensibilidade ao medicamento,
13 efeito que parece ser amplificado durante as gerações das formas adultas (PICA-
14 MATTOCCIA et al., 2009). Em estudos *in vitro* foi avaliado que cepas resistentes ao
15 PZQ podem apresentar diferenças na composição do tegumento, sendo menos
16 responsivos ao medicamento, além de demonstrarem um nível aumentado de P-
17 glicoproteína, proteína ligada à resistência a diversas drogas em células tumorais, e
18 que pode estar envolvida na redução da eficácia do PZQ (MESSERLI et al., 2009;
19 PINTO-ALMEIDA et al., 2016).

20 Além disso, é importante lembrar que o PZQ também apresenta
21 algumas desvantagens, como por exemplo: falta de atividade contra estágios mais
22 jovens do parasito, permitindo sua sobrevivência mesmo sob exposição à droga, e
23 consequente aumento da morbidade em indivíduos afetados. Desta forma, caso um
24 indivíduo abrigue parasitos imaturos durante o tratamento (situação que pode ocorrer
25 em áreas de intensa transmissão da doença), a cura não será alcançada. Outra
26 desvantagem é a questão de o medicamento não ser capaz de impedir uma
27 reinfecção, tampouco alterar o ciclo de vida do esquistossômulo (GRAY et al., 2010;
28 ROSS; OLVEDA, 2015).

29 De acordo com o Sistema de Classificação Biofarmacêutica (do
30 inglês: BCS, *Biopharmaceutics Classification System*) o PZQ consiste em um
31 medicamento de classe II, que exhibe baixa solubilidade e alta permeabilidade. Além
32 disso, o PZQ apresenta metabolismo rápido (via hidroxilação), tendo baixa
33 concentração em contato com o verme na circulação sanguínea, sendo recomendado
34 em três doses fracionadas por dia durante o tratamento (CAFFREY, 2015). Em vista

1 disso, por mais que a carga parasitária de vermes adultos diminua entre 60 a 90 %, a
2 cura completa não é alcançada de maneira confiável (WEGNER, 1984; BLACK et al.,
3 2009).

4 O PZQ também possui uma mistura racêmica de dois
5 estereoisômeros, dos quais apenas um é dotado de propriedade esquistossomicida,
6 enquanto o outro contribui para uma porção de efeitos adversos, sendo responsável
7 pelo sabor desagradável do medicamento. Além disso, do volume total dos
8 comprimidos (600 mg), apenas 40 mg possui ação contra esquistossomos e é de fato
9 eficaz para o tratamento, sendo de difícil administração para crianças. (WU et al.,
10 1991; MEYER et al., 2009).

11 Após a administração do PZQ, cerca de 30 a 60% dos pacientes
12 relatam efeitos adversos que são, por sua vez, leves e transientes, durando em torno
13 de 24 horas (JAOKO; MUCHEMI; OGUYA, 1996; BERHE et al., 1999). Dentre os
14 efeitos relatados estão: dor de cabeça, náusea, anorexia, vômito, dor abdominal e
15 epigástrica, diarreia com ou sem sangue e/ou muco, fadiga, mialgia, tontura, insônia,
16 sonolência, e mais raramente, uma erupção cutânea com edema na pele. Tais efeitos,
17 no entanto, têm sido correlacionados com a elevada intensidade da infecção, podendo
18 ocorrer devido à morte dos vermes e liberação de antígenos e outros metabólitos
19 (CIOLI et al., 2014).

20 Atualmente, a administração de medicamentos em massa é
21 considerada a principal estratégia para controlar a morbidade e transmissão da
22 esquistossomose em regiões endêmicas, sendo o PZQ o medicamento mais utilizado
23 neste tipo de quimioterapia preventiva (WHO, 2006). Embora a administração em
24 massa de medicamentos seja bem-sucedida na redução da morbidade e prevalência
25 ou intensidade da esquistossomose em diversas áreas endêmicas, alguns pontos
26 críticos ainda possuem transmissão persistente da doença (KITUR et al., 2017;
27 PENNANCE et al., 2016). O impacto do tratamento em massa nas populações
28 residentes em áreas endêmicas depende de fatores como: cobertura populacional,
29 frequência do uso dos medicamentos além dos níveis de diversidade genética e taxa
30 de fluxo gênico dos parasitos (MCDONALD; LINDE, 2002; SPIELMAN et al., 2004).
31 Em vista disso, a administração em massa de medicamentos pode gerar eficácia
32 reduzida do medicamento na população e/ou aumento da resistência do parasito.

1 1.6.2 Oxamniquina e outros medicamentos

2
3 A oxamniquina (OXA) é outro medicamento, empregado antes
4 mesmo da introdução do PZQ, que já foi muito utilizado para o tratamento de
5 indivíduos infectados com *S. mansoni*. No entanto, OXA não é largamente utilizado
6 devido à sua limitação no tratamento contra *S. haematobium* e *S. japonicum*, o que
7 desmotivou seu uso em regiões onde prevalecem tais espécies do parasito (CIOLI;
8 PICA-MATTOCCIA; ARCHER, 1995). Além disso, alguns casos de resistência foram
9 observados no Brasil, uma vez que estudos demonstraram a presença de genes que
10 conferem resistência ao medicamento no parasito (CIOLI; PICA-MATTOCCIA, 2005;
11 PICA-MATTOCCIA et al., 2006; CHEVALIER et al., 2016).

12 Derivados de artemisinina, que possuem atividade antimalárica,
13 assim como outros compostos com a mesma propriedade, são conhecidos por
14 apresentarem atividade esquistossomicida contra estágios mais imaturos do parasito,
15 característica que sugere uma combinação com PZQ para o tratamento de
16 esquistossomose. No entanto, uma limitação no uso de artemisininas é o fato de
17 favorecer o desenvolvimento de plasmódios resistentes ao medicamento em áreas
18 afetadas por malária e esquistossomose (CIOLI et al., 2014). A mefloquina, outra
19 droga antimalárica, também apresenta eficaz atividade contra formas imaturas do
20 parasito, no entanto necessita de mais estudos para elucidação de sua atividade (VAN
21 NASSAUW et al., 2008; CIOLI et al., 2014).

22 Por fim, outro composto conhecido atualmente para o tratamento de
23 esquistossomose é o furoxano, o qual apresenta atividade contra vermes adultos e
24 formas juvenis, no entanto possui uma toxicidade para células de mamíferos pouco
25 maior que o PZQ. Estudos mostram que tal composto atua em uma enzima essencial
26 para a sobrevivência dos esquistossomos, conhecida como tioredoxina-glutationa-
27 redutase (do inglês: TGR, *thioredoxin glutathione reductase*), alterando a defesa
28 antioxidante do parasito (ALGER; WILLIAMS, 2002; ANGELUCCI et al., 2010).

30 1.7 Avaliação de novos compostos esquistossomicidas

31
32 Conforme exposto acima, o PZQ exhibe uma série de impasses quanto
33 às propriedades farmacêuticas e farmacológicas, não demonstrando eficácia na dose
34 única oferecida, baixa estabilidade metabólica e um sabor desagradável, o que

1 dificulta no tratamento de crianças, que são na maioria das vezes a população-alvo
2 (BOTROS; BENNETT, 2007; MEYER et al., 2009; CAFFREY; SECOR, 2011;
3 MDULUZA; MUTAPI, 2017). Além disso, o PZQ não apresenta efeito contra
4 esquistossomos imaturos, sendo que portadores desta forma evolutiva podem
5 desenvolver morbidades apesar do tratamento. Por fim, incidências de taxas de cura
6 menores do que as previstas foram relatadas clinicamente no Egito, África
7 Subsaariana e Brasil, justificando a avaliação de compostos alternativos para o
8 tratamento da doença (STELMA et al., 1995; ISMAIL et al., 1999; CAFFREY et al.,
9 2019;).

10 Pelo fato de não haver parcerias transnacionais bem apoiadas
11 voltadas para a descoberta e desenvolvimento de medicamentos para
12 esquistossomose, e devido ao uso do PZQ estar se expandindo cada vez mais por
13 meio de programas de administração em massa de medicamentos, há um iminente
14 ameaça de aumento dos casos de resistência ao medicamento (HOTEZ; FENWICK,
15 2009; CAFFREY; SECOR, 2011; CIOLI et al., 2014).

16 Atualmente, existem propriedades desejadas de um medicamento
17 candidato para a esquistossomose, utilizando o PZQ como o perfil de produto alvo. As
18 disposições consideradas são: eficácia em uma única dose oral, incluindo contra os
19 vermes juvenis; eficácia contra todas as espécies de esquistossomos ou pelo menos
20 contra *S. mansoni* e *S. haematobium* que podem ser co-endêmicos; eficácia em uma
21 dose mais baixa em relação ao PZQ; e que o composto de interesse envolva um alvo
22 molecular diferente, de modo que a resistência cruzada seja menos provável de
23 ocorrer (CAFFREY, 2007; CAFFREY, 2015). Outras propriedades desejáveis, que só
24 podem se tornar claras à medida que um programa de desenvolvimento avança,
25 envolvem possuir uma ampla margem de segurança, incluindo em crianças pequenas
26 e mulheres grávidas e lactantes, e um baixo risco em relação a potenciais interações
27 medicamentosas. Finalmente, a estabilidade e o custo dos produtos serão fatores
28 importantes na distribuição de medicamentos para comunidades com recursos
29 limitados (CAFFREY et al., 2019).

30

31 **1.8 Nanopartículas biogênicas de prata**

32

33 As nanopartículas (Nps) compreendem em nanomateriais que fazem
34 parte de uma classe emergente de materiais funcionais, que variam de 1 a 100 nm.

1 (LEWINSKI; COLVIN; DREZEK, 2008; LAURENT et al., 2010). Atualmente, as Nps
2 vêm sendo empregadas em diversas bioaplicações como na produção de novas
3 alternativas terapêuticas, agentes antimicrobianos, vetores de transfecção e
4 marcadores fluorescentes, apresentando importantes propriedades físicas, químicas
5 e biológicas interessantes para aplicações em áreas médicas e farmacêuticas (YOON
6 et al., 2007; KREUTER; GELPERINA, 2008; TAN; JIANG; ZHANG, 2007; SU et al.,
7 2008).

8 Uma das grandes vantagens das Nps é a sua múltipla atividade
9 antimicrobiana, podendo apresentar diversos mecanismos de ação como:
10 desintegração ou dano à membrana celular bacteriana e consequente aumento da
11 permeabilidade; liberação de íons que interagem com componentes intra e
12 extracelulares; produção fotocatalítica de espécies reativas de oxigênio que danificam
13 componentes celulares; inibição da atividade enzimática e da síntese de DNA, e
14 interrupção de transdução de energia (HUH; KWON, 2011).

15 Dentre os diferentes tipos de nanopartículas metálicas, as
16 nanopartículas de prata (AgNps) são as que mais se destacam devido ao seu amplo
17 potencial antimicrobiano (PRABHU; POULOSE, 2012; RAI et al., 2014; LOO et al.,
18 2018). Atualmente, as AgNps vêm sendo utilizadas em diversos produtos,
19 principalmente na produção de acessórios médicos como cateteres e implantes, como
20 meio de prevenir infecções (CHEN; SCHLUESENER, 2008; AHAMED; ALSALHI;
21 SIDDIQUI, 2010). Além de seus usos médicos, estas moléculas também são usadas
22 em vestuário, indústria alimentícia, tintas, produtos domésticos e outros campos
23 (VIGNESHWARAN et al., 2007; COHEN et al., 2007).

24 Em relação aos mecanismos antimicrobianos, sabe-se que as
25 nanopartículas aderem às paredes celulares e membranas de microrganismos e
26 podem atingir o interior da célula, sendo capazes de danificar estruturas celulares,
27 induzir produção de ERO e alterar os mecanismos de transdução de sinal (LEE et al.,
28 2010; DAKAL et al., 2016). Em vista disso, diversos estudos relatam que a aplicação
29 de AgNps no controle de microrganismos patogênicos nas áreas de saúde e
30 agricultura tem demonstrado bons resultados (KIM et al., 2012; MISHRA; SINGH,
31 2015; BURDUŞEL et al., 2018).

32 Estudos mostraram que estas moléculas são capazes de penetrar nas
33 células, e que em concentrações nanomolares conseguem provocar a morte de
34 bactérias *Escherichia coli* em minutos (MORONES et al., 2005; LOK et al., 2006). De

1 acordo com Yamanaka, Hara e Kudo (2005), ao entrar nas bactérias estas AgNps
2 inativam enzimas vitais por interação com grupos tiol, afetam a atividade ribossomal,
3 inibem a replicação do DNA, depletam níveis de ATP, além degradarem a membrana
4 e por fim provocarem morte (YAMANAKA; HARA; KUDO, 2005).

5 Os métodos convencionais mais comumente utilizados na produção
6 de nanopartículas de prata envolvem síntese química, com o emprego de reagentes
7 responsáveis por reduzir os íons de prata e estabilizar as nanopartículas, no entanto,
8 tais reagentes exibem toxicidade significativa, podendo apresentar riscos à saúde e
9 levar à geração de resíduos que causam poluição ambiental (ZHANG et al., 2016).
10 Em vista disso, recentemente têm crescido o interesse por métodos de síntese
11 biogênica, uma vez que, diversas formas alternativas vêm sendo desenvolvidas para
12 a produção de nanopartículas que apresentam menor toxicidade, melhores
13 características físico-químicas e maior estabilidade. Por tais características, este
14 método de produção também é conhecido como síntese verde (DURÁN et al., 2011).

15 A síntese biogênica de nanopartículas pode ser realizada utilizando
16 organismos como bactérias, fungos e plantas, ou os subprodutos de seu metabolismo,
17 que atuam como agentes redutores e estabilizadores. É considerada uma forma de
18 produção relativamente simples, limpa, sustentável, não tóxica e econômica,
19 oferecendo maior biocompatibilidade no seu uso (DURÁN et al., 2011; GHOLAMI-
20 SHABANI et al., 2014). Devido a este potencial de redução metálica, os fungos têm
21 sido utilizados em larga escala como “nanofábricas” para biossíntese de
22 nanopartículas com tamanho e morfologia controlada (DURÁN et al., 2005; KHAN et
23 al., 2017). Os fungos são agentes atrativos para a síntese biogênica de nanopartículas
24 de prata, pois oferecem alta tolerância aos metais e são fáceis de manusear. Além
25 disso, os fungos são capazes de secretar grandes quantidades de proteínas que
26 contribuem para a estabilidade das nanopartículas e podem ser usados para uma
27 larga produção de nanomateriais (DU et al., 2015; NETALA et al., 2016).

28 Dentre as vantagens da utilização de culturas de fungos na produção
29 de nanopartículas, estão: boa produção de biomassa por parte dos fungos, não
30 requerem etapas adicionais para extração do filtrado, são resistentes à agitação e
31 pressão, e proporcionam nanopartículas com características mais específicas
32 (tamanho e morfologia) por permitirem o ajuste de condições de cultivo como tempo,
33 temperatura, pH e quantidade de biomassa (GADE et al., 2008; GUILGER-
34 CASAGRANDE; LIMA, 2019).

1 Tendo em vista as vantagens da síntese verde de nanopartículas, o
2 presente trabalho buscou avaliar a atividade esquistossomicida de nanopartículas
3 biogênicas de prata produzidas através do fungo *Fusarium oxysporum*. O fungo *F.*
4 *oxysporum* apresenta uma enzima extracelular conhecida como nitrato redutase,
5 responsável pela redução férrica, a qual é capaz de reduzir nitrato de prata (AgNO_3)
6 em subseqüente AgNp-Bio (DURÁN et al., 2005; GHOLAMI-SHABANI et al., 2014).

8 **1.9 Mecanismos de ação de nanopartículas de prata**

9
10 Múltiplas características físico-químicas são capazes de influenciar os
11 mecanismos de ação exercidos pelas AgNps, como: tamanho, forma, potencial zeta,
12 aglomeração e taxa de dissolução, a partir das quais determinam-se as interações e
13 impactos biológicos (REIDY et al., 2013). Diversos estudos, no entanto, têm
14 demonstrado que o tamanho é um dos principais fatores, uma vez que, nanopartículas
15 de prata menores são consideradas mais tóxicas por serem absorvidas mais
16 facilmente e abranger maior área de superfície, facilitando a dissolução e liberação de
17 íons prata (Ag^+) (CHOI; HU, 2008; YEN; HSU; TSAI, 2009; JOHNSTON et al., 2010).

18 Atualmente, pouco se sabe sobre o mecanismo de ação envolvido na
19 morte celular induzida por AgNps. No entanto, uma série de estudos tem avaliado o
20 mecanismo antimicrobiano dessas nanopartículas, correlacionando com a liberação
21 de íons Ag^+ e demonstrando três possíveis vias de toxicidade: i) dano direto na
22 membrana celular; ii) interrupção da produção de ATP e da replicação de DNA; além
23 de iii) geração de ERO (MARAMBIO-JONES; HOEK, 2010; PRABHU; POULOSE,
24 2012; RAI et al., 2012).

25 O primeiro contato das AgNps com as células consiste na interação
26 com a membrana plasmática ou parede celular, nas quais são capazes de
27 desestabilizar moléculas de lipopolissacarídeos, e causar aumento na permeabilidade
28 (SONDI; SALOPEK-SONDI, 2004). Em estudo realizado por Kim et al. (2007) foi
29 avaliado que essa interação pode ocorrer de forma seletiva de acordo com o
30 microrganismo, pois a concentração de peptideoglicanos pode influenciar na maior
31 afinidade das AgNps com a parede celular, demonstrando maior seleção contra
32 bactérias e menor toxicidade para células humanas (KIM et al., 2007).

33 Assim, uma vez em contato com a superfície bacteriana, as AgNps
34 penetram nas células e liberam íons prata que interagem com proteínas contendo

1 grupos tiol, ocasionando inativação de enzimas respiratórias (FENG et al., 2000). Os
2 íons prata podem também ocasionar dano ao DNA através da interação com
3 compostos contendo fósforo, interferindo no processo de replicação e interrompendo
4 a proliferação bacteriana (WONG; LIU, 2010). Outro possível mecanismo envolve a
5 alteração no gradiente eletroquímico de prótons desencadeado pelas AgNps, levando
6 à interrupção na síntese de ATP, inibição nos processos de adesão e proliferação, e
7 consequente morte celular (REIDY et al., 2013).

8 Outra propriedade importante das AgNps, é a capacidade de doar
9 elétrons ao oxigênio molecular levando ao aumento de ERO (FLORES-LÓPEZ;
10 ESPINOZA-GÓMEZ; SOMANATHAN, 2019). As ERO são responsáveis por participar
11 de diversas funções efetoras nas células, no entanto, é necessário manter um
12 equilíbrio dessas moléculas através de enzimas antioxidantes. Em vista disso, com o
13 desequilíbrio entre a produção de ERO e sua degradação pelo sistema antioxidante,
14 é desencadeado um estresse oxidativo celular, provocando danos ao DNA,
15 mitocôndrias, oxidação de proteínas e lipídios além de apoptose (PANYALA; PEÑA-
16 MÉNDEZ; HAVEL, 2008).

17 As AgNps bem como os íons Ag^+ possuem alta afinidade a
18 grupamentos tiol presentes em resíduos de cisteína, assim, sua ligação a essas
19 moléculas podem perturbar proteínas da membrana mitocondrial e,
20 consequentemente, alterar sua permeabilidade e interromper suas funções através da
21 inibição da cadeia de transporte de elétrons (BRESSAN et al., 2013; MAURER;
22 MEYER, 2016; FLORES-LÓPEZ; ESPINOZA-GÓMEZ; SOMANATHAN, 2019).

24 **1.10 Nanopartículas no modelo de esquistossomose**

25
26 Recentemente, alguns estudos têm demonstrado a eficiência de
27 nanopartículas de ouro (AuNps) no modelo de esquistossomose. No modelo *in vivo*
28 realizado por Dkhil e colaboradores (2015), camundongos infectados de forma
29 subcutânea com 100 ± 10 cercárias de *S. mansoni* foram inoculados via intraperitoneal
30 com 0,25; 0,5 e 1 mg/kg de AuNps duas vezes nos dias 46 e 49 pós infecção, como
31 resultado foi avaliado redução na carga de vermes e ovos no fígado, além de
32 diminuição no tamanho do granuloma. O tratamento com AuNps nestes animais
33 também foi capaz de reduzir a lesão hepática, levando à regulação negativa na
34 expressão de IL-1 β , IL-6, TNF- α , IFN- γ e óxido nítrico sintase induzível (do inglês:

1 iNOS, *inducible nitric oxide synthase*), demonstrando ação anti-inflamatória e
2 antioxidante (DKHIL et al., 2015; TOMIOTTO-PELLISSIER et al., 2017).

3 Em relação às AgNps, a interação com organismos multicelulares
4 permanece uma grande área a ser explorada. Os estudos realizados com AgNps no
5 modelo de esquistossomose incluem o realizado por Cheng et al., (2013), no qual os
6 autores avaliaram a atividade de AgNps (± 30 nm) em cercárias de *S. japonicum*,
7 sendo possível analisar movimento intenso e contração corporal em concentrações
8 acima de 125 $\mu\text{g/mL}$, uma vez que, a ocorrência e frequência de comportamento
9 agitado foi dose dependente, enquanto a perda da cauda foi induzida em
10 concentrações acima de 31,25 $\mu\text{g/mL}$, caracterizando uma estratégia de eliminação
11 das formas infectantes do parasito. Neste estudo também foi avaliada redução da
12 infectividade de cercárias de *S. japonicum* previamente expostas a AgNps em contato
13 com a pele abdominal de camundongos de maneira dose dependente em
14 concentrações acima 125 $\mu\text{g/mL}$, não apresentando desenvolvimento de vermes
15 adultos e ovos (CHENG et al., 2013).

16 Em estudo realizado por Moustafa et al. (2018) foram determinados
17 os efeitos de AgNps e AuNps em cercárias de *S. mansoni in vitro* e *in vivo*. Como
18 resultado, foi verificado que a morte das cercárias ocorreu de maneira concentração
19 e tempo dependente, demonstrando um valor de 50 $\mu\text{g/mL}$ para AgNps e 100 $\mu\text{g/mL}$
20 para AuNps. No modelo *in vivo*, a infecção de camundongos com cercárias
21 previamente tratadas com AgNps não induziu formação de granuloma hepático e
22 levou à menor carga parasitária, já a infecção com cercárias não tratadas seguido de
23 tratamento imediato com AgNps via intraperitoneal após 1 h de infecção levou à
24 diminuição na contagem de ovos no intestino e fígado. Em relação às AuNps, estas
25 levaram a uma diminuição na carga total de vermes em todos os grupos testados, com
26 uma diminuição na contagem de ovos no intestino e fígado, no entanto o tratamento
27 imediato não alterou os padrões de oograma e formação de granuloma (MOUSTAFA
28 et al., 2018).

29 Em relação ao mecanismo de ação King e Higachi (1992) avaliaram
30 em estudo prévio a ação de Ag^+ em cercárias de *S. mansoni*, sendo analisado que a
31 presença de Ag^+ na concentração de 0,09 mM é capaz de causar a inibição da
32 penetração (KING; HIGASHI, 1992). Posteriormente, a utilização de nanobastões de
33 óxido de zinco dopado com samário e incorporado com nanoesferas de prata
34 (Ag@Sm-doped ZnO) também foi empregada no modelo *in vitro* de *S. mansoni* em

1 cercárias e vermes adultos. O tratamento com Ag@Sm-doped ZnO na concentração
2 de 50 µg/mL foi capaz de induzir contração e deformações do corpo de cercárias,
3 levando ao dobramento da cauda e presença de descamações na cabeça (DARWISH;
4 BAYAUMY; ISMAIL, 2018).

5 Em vermes adultos o tratamento com o composto por 24 horas na
6 concentração de 120 µg/mL causou 100% de mortalidade, uma vez que, a exposição
7 em cultura de células VERO (células epiteliais renais de macaco verde africano) na
8 concentração de 150 µg/mL durante 24 e 48 horas não induziu toxicidade e alteração
9 da morfologia. Em imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV), vermes
10 adultos tratados com 150 µg/mL por 48 horas apresentaram formação de bolhas,
11 erupções e descamações no tegumento, além de perda da ventosa oral. Por meio da
12 microscopia eletrônica de transmissão (MET), vermes adultos tratados demonstraram
13 alterações no tegumento, com deformações nos espinhos e separação da camada
14 tegumental, além de intensa desintegração do tecido e formação de espaços
15 intravacuolares, com aparecimento de fragmentos do composto na musculatura
16 (DARWISH; BAYAUMY; ISMAIL, 2018).

17 De acordo com Darwish, Bayaummy e Ismail (2018) o composto
18 Ag@Sm-doped ZnO apresenta ação esquistossomicida eficaz, que pode ser atribuída
19 à captura através das superfícies dos músculos, promovendo sua permeabilidade e
20 acúmulo na membrana do parasito. Assim, as nanoesferas de Ag sofrem dissolução
21 para formar íons Ag⁺, dos quais são responsáveis por atacar organelas e gerar
22 quantidades significantes de ERO, induzindo apoptose celular (DARWISH;
23 BAYAUMY; ISMAIL, 2018).

24 Como avaliado em estudos recentes, o controle do hospedeiro
25 intermediário também tem demonstrado ser uma estratégia importante para prevenir
26 a transmissão da doença. Abdel-Hamid e Mekawey (2014) demonstraram o efeito de
27 AgNps biossintetizadas por diferentes fungos contra caramujos *B. alexandriana*. Os
28 resultados revelaram que as nanopartículas provenientes de *Paecilomyces variotii* e
29 *Aspergillus niger* foram capazes de apresentar atividade moluscicida, alterando
30 parâmetros fisiológicos e reduzindo a eficiência reprodutiva dos moluscos tratados
31 (ABDEL-HAMID; MEKAWAY, 2014). Moustafa et al. (2018) também avaliaram a
32 eficiência de nanopartículas de Ag e Au em caramujos *B. alexandrina*, e como
33 resultado verificaram que o tratamento causou morte dos caramujos a partir de 30
34 µg/mL e 160 µg/mL, e impediu a infecção com cercárias de *S. mansoni* em 9,68 µg/mL

1 e 133,7 µg/mL, respectivamente (MOUSTAFA et al., 2018). Recentemente, em estudo
2 com *B. glabrata* foi avaliado que AgNps funcionalizadas com polivinilpirrolidona (PVP)
3 induzem mortalidade, atraso na eclosão e alterações morfológicas nos embriões, de
4 maneira dose e tempo dependente, no entanto, demonstram baixos efeitos
5 embriotóxicos em moluscos recém-nascidos (ARAÚJO et al., 2020).

6 Atualmente, existem poucos estudos avaliando a toxicidade e
7 mecanismo de ação das AgNps em vermes parasitos, uma vez que, o modelo mais
8 amplamente utilizado consiste no uso do nematódeo de vida-livre *Caenorhabditis*
9 *elegans*. Dentre os efeitos avaliados no modelo de *C. elegans* expostos à AgNps, foi
10 analisado toxicidade considerável, com diminuição do potencial reprodutivo e aumento
11 da expressão do gene superóxido dismutase-3 (SOD-3), além disso, também foi
12 observado danos à membrana mitocondrial, aumento nos níveis de ERO, mudanças
13 na via de transdução de sinal como a via da PMK-1/p-38 MAPK, além de dano ao
14 DNA e apoptose (ROH et al., 2009; LIM et al., 2012; YANG et al., 2012). Starnes e
15 colaboradores (2015) também demonstraram que a toxicidade induzida pelas AgNps
16 em *C. elegans* ocorre de maneira concentração dependente (STARNES et al., 2015).

17 Em relação aos Platyhelminthes, Gherbawy e colaboradores (2013)
18 avaliaram que ovos de *Fasciola hepatica* incubados com 50 µg/mL de AgNps (4.66
19 nm) apresentaram perfurações na superfície, e que a combinação do tratamento
20 convencional (Triclabendazol) com AgNps foi capaz de diminuir a eclosão dos ovos
21 (GHERBAWY et al., 2013). Em parasitos Monogenea, também pertencentes ao filo
22 Platyhelminthes, foi demonstrando que a exposição do parasito a AgNps na
23 concentração de 6 µg/L por 1 hora levou à formação de vacúolos e leve inchaço no
24 tegumento, enquanto na concentração de 36 µg/L houve ruptura total do tegumento
25 (PIMENTEL-ACOSTA et al., 2019).

26 Portanto, sabendo da gravidade desta doença, de suas complicações
27 anatomofisiológicas, das dificuldades do tratamento atual, associado à sua ineficácia
28 sob formas imaturas e surgimento de cepas resistentes, faz-se necessário e urgente,
29 a busca de novos fármacos para o tratamento da esquistossomose. Dessa forma,
30 como demonstrando anteriormente, uma série de estudos tem demonstrado que as
31 AgNps apresentam diversas propriedades antimicrobiana e antiparasitária, no
32 entanto, tais moléculas exibem toxicidade considerável. O presente estudo busca
33 compreender a atividade de AgNp-bio, obtidas pela redução do nitrato de prata pela

- 1 enzima nitrato redutase de *F. oxisporium*, tanto em formas imaturas e vermes adultos
- 2 de *S. mansoni*, como no modelo *in vivo* da doença.

2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1
2
- 3 ABDEL-HAMID, H.; MEKAWAY, A. A. I. Biological and hematological responses of
4 *Biomphalaria alexandrina* to mycobiosynthesis silver nanoparticles. **Journal of the**
5 **Egyptian Society of Parasitology**, v. 44, n. 3, p. 627–637, 2014.
- 6 AHAMED, M.; ALSALHI, M. S.; SIDDIQUI, M. K. J. Silver nanoparticle applications
7 and human health. **Clinica Chimica Acta**, v. 411, n. 23–24, p. 1841–1848, 2010.
- 8 ALGER, H. M.; WILLIAMS, D. L. The disulfide redox system of *Schistosoma mansoni*
9 and the importance of a multifunctional enzyme, thioredoxin glutathione reductase.
10 **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 121, n. 1, p. 129–139, 2002.
- 11 AMIN, A. M.; MIKHAIL, E. G. *Schistosoma mansoni*: tegumental surface alterations
12 following oxamniquine treatment of infected mice . **J. Egypt. Soc. Parasitol**, v. 19, n.
13 2, p. 815–25, 1989.
- 14 ANDERSON, R. M. et al. What is required in terms of mass drug administration to
15 interrupt the transmission of schistosome parasites in regions of endemic infection?
16 **Parasites and Vectors**, v. 8, n. 1, p. 553, 2015.
- 17 ANDERSON, R. M. et al. Studies of the Transmission Dynamics, Mathematical
18 Model Development and the Control of Schistosome Parasites by Mass Drug
19 Administration in Human Communities. **Advances in Parasitology**, v. 94, p. 199–
20 246, 2016.
- 21 ANGELUCCI, F. et al. Mapping the catalytic cycle of *Schistosoma mansoni*
22 thioredoxin glutathione reductase by X-ray crystallography. **The Journal of**
23 **biological chemistry**, v. 285, n. 42, p. 32557–67, 2010.
- 24 ARAÚJO, P. S. et al. Molluscicidal activity of polyvinylpyrrolidone (PVP)-
25 functionalized silver nanoparticles to *Biomphalaria glabrata*: Implications for control of
26 intermediate host snail of *Schistosoma mansoni*. **Acta Tropica**, v. 211, p. 105644,
27 2020.
- 28 ASHTON, P. D. et al. The schistosome egg: Development and secretions.
29 **Parasitology**, v. 122, n. 3, p. 329–338, 2001.
- 30 BARRETT, J. Forty years of helminth biochemistry. **Parasitology**, v. 136, n. 12, p.
31 1633–1642, 2009.
- 32 BAUMGART, M. et al. Naturally Occurring CD4 + Foxp3 + Regulatory T Cells Are an
33 Essential, IL-10-Independent Part of the Immunoregulatory Network in *Schistosoma*
34 *mansoni* Egg-Induced Inflammation . **The Journal of Immunology**, v. 176, n. 9, p.
35 5374–5387, 2006.
- 36 BERHE, N. et al. Praziquantel side effects and efficacy related to *Schistosoma*
37 *mansoni* egg loads and morbidity in primary school children in north-east Ethiopia.
38 **Acta Tropica**, v. 72, n. 1, p. 53–63, 1999.
- 39 BLACK, C. L. et al. Impact of intense, longitudinal retreatment with praziquantel on
40 cure rates of schistosomiasis mansoni in a cohort of occupationally exposed adults in
41 western Kenya. **Tropical Medicine & International Health**, v. 14, n. 4, p. 450–457,
42 2009.

- 1 BOTROS, S. S.; BENNETT, J. L. Praziquantel resistance. **Expert Opinion on Drug**
2 **Discovery**, v. 2, n. sup1, p. S35-S40, 2007.
- 3 BRANDÃO, E. et al. Neglected tropical diseases in Brazilian children and
4 adolescents: Data analysis from 2009 to 2013. **Infectious Diseases of Poverty**, v.
5 6, n. 154, p. 1–10, 2017.
- 6 BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de
7 Vigilância Epidemiológica. **Vigilância da Esquistossomose Mansoní : diretrizes**
8 **técnicas/Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento**
9 **de Vigilância das Doenças Transmissíveis**. 4. ed. Brasília: Ministério da Saúde,
10 2014.
- 11 BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de
12 Vigilância Epidemiológica. **Vigilância e controle de moluscos de importância**
13 **epidemiológica: diretrizes técnicas: programa de vigilância e controle da**
14 **esquistossomose**. Brasília: Ministério da Saúde, 2008.
- 15 BRESSAN, E. et al. Silver nanoparticles and mitochondrial interaction. **International**
16 **Journal of Dentistry**, v. 2013, 2013.
- 17 BURDUŞEL, A. C. et al. Biomedical applications of silver nanoparticles: An up-to-
18 date overview. **Nanomaterials**, v. 8, n. 9, p. 681, 2018.
- 19 BURKE, M. L. et al. Immunopathogenesis of human schistosomiasis. **Parasite**
20 **Immunology**, v. 31, n. 4, p. 163–176, 2009.
- 21 CAFFREY, C. R. Chemotherapy of schistosomiasis: present and future. **Current**
22 **Opinion in Chemical Biology**, v. 11, n. 4, p. 433–439, 2007.
- 23 CAFFREY, C. R. Schistosomiasis and its treatment. **Future Medicinal Chemistry**, v.
24 7, n. 6, p. 675–676, 2015.
- 25 CAFFREY, C. R. et al. Drug Discovery and Development for Schistosomiasis. In:
26 **Neglected Tropical Diseases: Drug Discovery and Development**. p. 187–225,
27 2019.
- 28 CAFFREY, C. R.; SECOR, W. E. Schistosomiasis: from drug to deployment to drug
29 development. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 24, n. 5, p. 410–417,
30 2011.
- 31 CALDAS, I. R. et al. Human schistosomiasis mansoní: Immune responses during
32 acute and chronic phases of the infection. **Acta Tropica**, v. 108, n. 2–3, p. 109–117,
33 2008.
- 34 CARVALHO, O. DOS S.; COELHO, P. M. Z.; LENZI, H. L. **Schistosoma mansoní &**
35 **Esquistossomose: uma visão multidisciplinar**. Editora FIOCRUZ, 2008.
- 36 CDC, Center for Disease Control & Prevention. **Schistosomiasis Infection**.
37 Disponível em: <<https://www.cdc.gov/dpdx/schistosomiasis/index.html>>. Acesso em:
38 5 out. 2020.
- 39 CHAN, J. D. et al. The anthelmintic praziquantel is a human serotonergic G-protein-
40 coupled receptor ligand. **Nature Communications**, v. 8, n. 1, p. 1–7, 2017.
- 41 CHEEVER, A. W. et al. Anti-IL-4 treatment of *Schistosoma mansoní*-infected mice
42 inhibits development of T cells and non-B, non-T cells expressing Th2 cytokines

- 1 while decreasing egg-induced hepatic fibrosis. **The Journal of Immunology**, v. 153,
2 n. 2, 1994.
- 3 CHEN, L. et al. IL-4 Induces Differentiation and Expansion of Th2 Cytokine-
4 Producing Eosinophils. **The Journal of Immunology**, v. 172, n. 4, p. 2059–2066,
5 2004.
- 6 CHEN, X.; SCHLUESENER, H. J. Nanosilver: A nanoparticle in medical application.
7 **Toxicology Letters**, v. 176, n. 1, p. 1–12, 2008.
- 8 CHENG, Y. et al. Contribution of silver ions to the inhibition of infectivity of
9 *Schistosoma japonicum* cercariae caused by silver nanoparticles. **Parasitology**, v.
10 140, n. 5, p. 617–625, 2013.
- 11 CHEVALIER, F. D. et al. Independent origins of loss-of-function mutations conferring
12 oxamniquine resistance in a Brazilian schistosome population. **International Journal**
13 **for Parasitology**, v. 46, n. 7, p. 417–424, 2016.
- 14 CHIARAMONTE, M. G. et al. Studies of murine schistosomiasis reveal interleukin-13
15 blockade as a treatment for established and progressive liver fibrosis. **Hepatology**, v.
16 34, n. 2, p. 273–282, 2001.
- 17 CHOI, O.; HU, Z. Size dependent and reactive oxygen species related nanosilver
18 toxicity to nitrifying bacteria. **Environmental Science and Technology**, v. 42, n. 12,
19 p. 4583–4588, 2008.
- 20 CHUAH, C. et al. Cellular and chemokine-mediated regulation in schistosome-
21 induced hepatic pathology. **Trends in Parasitology**, v. 30, n. 3, p. 141–150, 2014.
- 22 CIOLI, D. et al. Schistosomiasis control: praziquantel forever? **Molecular and**
23 **Biochemical Parasitology**, v. 195, n. 1, p. 23–29, 2014.
- 24 CIOLI, D.; PICA-MATTOCCIA, L. Current and Future Antischistosomal Drugs. In:
25 **Schistosomiasis**. Springer, Boston, MA, p. 191-206, 2005.
- 26 CIOLI, D.; PICA-MATTOCCIA, L.; ARCHER, S. Antischistosomal drugs: Past,
27 present ... and future? **Pharmacology & Therapeutics**, v. 68, n. 1, p. 35–85, 1995.
- 28 CLERINX, J.; VAN GOMPEL, A. Schistosomiasis in travellers and migrants. **Travel**
29 **Medicine and Infectious Disease**, v. 9, n. 1, p. 6–24, 2011.
- 30 COHEN, M. S. et al. *In Vitro* Analysis of a Nanocrystalline Silver-Coated Surgical
31 Mesh. **Surgical infections**, v. 8, n. 3, p. 397-404, 2007.
- 32 COLLEY, D. G. et al. Human schistosomiasis. **The Lancet**, v. 383, n. 9936, p. 2253–
33 2264, 2014.
- 34 COLLEY, D. G.; SECOR, W. E. Immunology of human schistosomiasis. **Parasite**
35 **Immunology**, v. 36, n. 8, p. 347–357, 2014.
- 36 CURWEN, R. S.; WILSON, R. A. Invasion of skin by schistosome cercariae: Some
37 neglected facts. **Trends in Parasitology**, v. 19, n. 2, p. 63–66, 2003.
- 38 DAKAL, T. C. et al. Mechanistic basis of antimicrobial actions of silver nanoparticles.
39 **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. NOV, p. 1831, 2016.
- 40 DARWISH, A. S.; BAYAUMY, F. E. A.; ISMAIL, H. M. Photoactivated water-

- 1 disinfecting, and biological properties of Ag NPs@Sm-doped ZnO nanorods/cuttlefish
2 bone composite: *In-vitro* bactericidal, cercaricidal and schistosomicidal studies.
3 **Materials Science and Engineering C**, v. 93, p. 996–1011, 2018.
- 4 DIAS, F. F. et al. Identification of Piecemeal Degranulation and Vesicular Transport
5 of MBP-1 in Liver-Infiltrating Mouse Eosinophils During Acute Experimental
6 *Schistosoma mansoni* Infection. **Frontiers in Immunology**, v. 9, p. 3019, 2018.
- 7 DKHIL, M. A. et al. Antioxidant and hepatoprotective role of gold nanoparticles
8 against murine hepatic schistosomiasis. **International Journal of Nanomedicine**, v.
9 10, p. 7467–7475, 2015.
- 10 DORSEY, C. H. et al. Ultrastructure of the *Schistosoma mansoni* cercaria. **Micron**, v.
11 33, n. 3, p. 279–323, 2002.
- 12 DU, L. et al. Synthesis of small silver nanoparticles under light radiation by fungus
13 *Penicillium oxalicum* and its application for the catalytic reduction of methylene blue.
14 **Materials Chemistry and Physics**, v. 160, p. 40–47, 2015.
- 15 DURÁN, N. et al. Mechanistic aspects of biosynthesis of silver nanoparticles by
16 several *Fusarium oxysporum* strains. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 3, n. 1, p.
17 8, 2005.
- 18 DURÁN, N. et al. Mechanistic aspects in the biogenic synthesis of extracellular metal
19 nanoparticles by peptides, bacteria, fungi, and plants. **Applied Microbiology and**
20 **Biotechnology**, v. 90, n. 5, p. 1609–1624, 2011.
- 21 EVERTS, B. et al. Omega-1, a glycoprotein secreted by *Schistosoma mansoni* eggs,
22 drives Th2 responses. **The Journal of experimental medicine**, v. 206, n. 8, p.
23 1673–80, 2009.
- 24 EZEAMAMA, A. E. et al. Treatment for *Schistosoma japonicum*, Reduction of
25 Intestinal Parasite Load, and Cognitive Test Score Improvements in School-Aged
26 Children. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 5, p. e1634, 2012.
- 27 FAHEL, J. S. et al. IPSE/alpha-1 of *Schistosoma mansoni* egg induces enlargement
28 of granuloma but does not alter Th2 balance after infection. **Parasite Immunology**,
29 v. 32, n. 5, p. 345–353, 2010.
- 30 FALLON, P. G.; SMITH, P.; DUNNE, D. W. Type 1 and type 2 cytokine-producing
31 mouse CD4+ and CD8+ T cells in acute *Schistosoma mansoni* infection. **European**
32 **Journal of Immunology**, v. 28, n. 4, p. 1408–1416, 1998.
- 33 FENG, Q. L. et al. A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on
34 *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. **Journal of Biomedical Materials**
35 **Research**, v. 52, n. 4, p. 662–668, 2000.
- 36 FERREIRA, F. T. et al. Sensitivity and specificity of the circulating cathodic antigen
37 rapid urine test in the diagnosis of schistosomiasis mansoni infection and evaluation
38 of morbidity in a low-endemic area in Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de**
39 **Medicina Tropical**, v. 50, n. 3, p. 358–364, 2017.
- 40 FITZPATRICK, C. et al. An Investment Case for Ending Neglected Tropical
41 Diseases. In: **Disease Control Priorities, Third Edition (Volume 6): Major**
42 **Infectious Diseases**. p. 411–431, 2017.

- 1 FITZSIMMONS, C. M. et al. Chemotherapy for schistosomiasis in Ugandan
2 fishermen: Treatment can cause a rapid increase in interleukin-5 levels in plasma but
3 decreased levels of eosinophilia and worm-specific immunoglobulin E. **Infection and**
4 **Immunity**, v. 72, n. 7, p. 4023–4030, 2004.
- 5 FLORES-LÓPEZ, L. Z.; ESPINOZA-GÓMEZ, H.; SOMANATHAN, R. Silver
6 nanoparticles: Electron transfer, reactive oxygen species, oxidative stress, beneficial
7 and toxicological effects. Mini review. **Journal of Applied Toxicology**, v. 39, n. 1, p.
8 16–26, 2019.
- 9 FULFORD, A. J. C. et al. A Statistical Approach to Schistosome Population
10 Dynamics and Estimation of the Life-Span of *Schistosoma Mansoni* in Man.
11 **Parasitology**, v. 110, n. 3, p. 307–316, 1995.
- 12 GADE, A. K. et al. Exploitation of *Aspergillus niger* for synthesis of silver
13 nanoparticles. **Journal of Biobased Materials and Bioenergy**, v. 2, n. 3, p. 243–
14 247, 2008.
- 15 GBD, G. B. D. Global, regional, and national disability-adjusted life-years (DALYs) for
16 333 diseases and injuries and healthy life expectancy (HALE) for 195 countries and
17 territories, 1990-2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study
18 2016. **The Lancet**, v. 390, p. 1260–1344, 2017.
- 19 GHERBAWY, Y. A. et al. The anti-fasciolosis properties of silver nanoparticles
20 produced by *Trichoderma harzianum* and their improvement of the anti-fasciolosis
21 drug Triclabendazole. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 11, p.
22 21887–21898, 2013.
- 23 GHOLAMI-SHABANI, M. et al. Antimicrobial Activity and Physical Characterization of
24 Silver Nanoparticles Green Synthesized Using Nitrate Reductase from *Fusarium*
25 *oxysporum*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 172, n. 8, p. 4084–4098,
26 2014.
- 27 GOMES, E. C. DE S. et al. Schistosomiasis transmission and environmental change:
28 a spatio-temporal analysis in Porto de Galinhas, Pernambuco - Brazil. **International**
29 **Journal of Health Geographics**, v. 11, n. 1, p. 1–11, 2012.
- 30 GRABE, K.; HAAS, W. Navigation within host tissues: Cercariae orientate towards
31 dark after penetration. **Parasitology Research**, v. 93, n. 2, p. 111–113, 2004.
- 32 GRAY, D. J. et al. Schistosomiasis elimination: lessons from the past guide the
33 future. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 10, n. 10, p. 733–736, 2010.
- 34 GRYSEELS, B. et al. Human schistosomiasis. **The Lancet**, v. 368, n. 9541, p. 1106–
35 1118, 2006.
- 36 GRYSEELS, B. Schistosomiasis Infectious Disease Clinics of North America. **Infect**
37 **Dis Clin North Am**, 2012.
- 38 GUILGER-CASAGRANDE, M.; LIMA, R. DE. Synthesis of Silver Nanoparticles
39 Mediated by Fungi: A Review. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v.
40 7, p. 287, 2019.
- 41 HAMS, E.; AVIELLO, G.; FALLON, P. G. The *Schistosoma* Granuloma: Friend or
42 Foe? **Frontiers in Immunology**, v. 4, p. 89, 2013.

- 1 HANSELL, E. et al. Proteomic Analysis of Skin Invasion by Blood Fluke Larvae.
2 **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 2, n. 7, p. e262, 2008.
- 3 HE, X. et al. Down-regulation of microRNA-203-3p initiates type 2 pathology during
4 schistosome infection via elevation of interleukin-33. **PLOS Pathogens**, v. 14, n. 3, p.
5 e1006957, 2018.
- 6 HE, Y. X.; CHEN, L.; RAMASWAMY, K. *Schistosoma mansoni*, *S. haematobium*, and
7 *S. japonicum*: Early events associated with penetration and migration of
8 schistosomula through human skin. **Experimental Parasitology**, v. 102, n. 2, p. 99–
9 108, 2002.
- 10 HERBERT, D. R. et al. Alternative macrophage activation is essential for survival
11 during schistosomiasis and downmodulates T helper 1 responses and
12 immunopathology. **Immunity**, v. 20, n. 5, p. 623–635, 2004.
- 13 HERBERT, D. R. et al. IL-4R α Expression by Bone Marrow-Derived Cells Is
14 Necessary and Sufficient for Host Protection against Acute Schistosomiasis. **The**
15 **Journal of Immunology**, v. 180, n. 7, p. 4948–4955, 2008.
- 16 HESSE, M. et al. Differential Regulation of Nitric Oxide Synthase-2 and Arginase-1
17 by Type 1/Type 2 Cytokines In Vivo: Granulomatous Pathology Is Shaped by the
18 Pattern of L-Arginine Metabolism. **The Journal of Immunology**, v. 167, n. 11, p.
19 6533–6544, 2001.
- 20 HOFFMANN, K. F.; CHEEVER, A. W.; WYNN, T. A. IL-10 and the Dangers of
21 Immune Polarization: Excessive Type 1 and Type 2 Cytokine Responses Induce
22 Distinct Forms of Lethal Immunopathology in Murine Schistosomiasis. **The Journal**
23 **of Immunology**, v. 164, n. 12, p. 6406–6416, 2000.
- 24 HOGG, K. G. et al. Interleukin-12 p40 secretion by cutaneous CD11c⁺ and F4/80⁺
25 cells is a major feature of the innate immune response in mice that develop Th1-
26 mediated protective immunity to *Schistosoma mansoni*. **Infection and Immunity**, v.
27 71, n. 6, p. 3563–3571, 2003.
- 28 HOGG, K. G.; KUMKATE, S.; MOUNTFORD, A. P. IL-10 regulates early IL-12-
29 mediated immune responses induced by the radiation-attenuated schistosome
30 vaccine. **International Immunology**, v. 15, n. 12, p. 1451–1459, 2003.
- 31 HOTEZ, P. J. et al. Control of Neglected Tropical Diseases. **New England Journal**
32 **of Medicine**, v. 357, n. 10, p. 1018–1027, 2007.
- 33 HOTEZ, P. J. et al. The Global Burden of Disease Study 2010: Interpretation and
34 Implications for the Neglected Tropical Diseases. **PLoS Neglected Tropical**
35 **Diseases**, v. 8, n. 7, p. e2865, 2014.
- 36 HOTEZ, P. J.; BROWN, A. S. Neglected tropical disease vaccines. **Biologicals**, v.
37 37, n. 3, p. 160–164, 2009.
- 38 HOTEZ, P. J.; FENWICK, A. Schistosomiasis in Africa: An Emerging Tragedy in Our
39 New Global Health Decade. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 3, n. 9, p. e485,
40 2009.
- 41 HUH, A. J.; KWON, Y. J. “Nanoantibiotics”: A new paradigm for treating infectious
42 diseases using nanomaterials in the antibiotics resistant era. **Journal of Controlled**
43 **Release**, v. 156, n. 2, p. 128–145, 2011.

- 1 INGRAM, J. R. et al. Investigation of the Proteolytic Functions of an Expanded
2 Cercarial Elastase Gene Family in *Schistosoma mansoni*. **PLoS Neglected Tropical**
3 **Diseases**, v. 6, n. 4, p. e1589, 2012.
- 4 ISMAIL, M. et al. Resistance to praziquantel: Direct evidence from *Schistosoma*
5 *mansoni* isolated from egyptian villagers. **American Journal of Tropical Medicine**
6 **and Hygiene**, v. 60, n. 6, p. 932–935, 1999.
- 7 JANKOVIC, D. et al. Schistosome-infected IL-4 receptor knockout (KO) mice, in
8 contrast to IL-4 KO mice, fail to develop granulomatous pathology while maintaining
9 the same lymphokine expression profile. **Journal of Immunology**, v. 163, p. 337–
10 342, 1999.
- 11 JAOKO, W. G.; MUCHEMI, G.; OGUYA, F. O. Praziquantel side effects during
12 treatment of *Schistosoma mansoni* infected pupils in Kibwezi, Kenya. **East African**
13 **medical journal**, v. 73, n. 8, p. 499–501, 1996.
- 14 JOHNSTON, H. J. et al. A review of the *in vivo* and *in vitro* toxicity of silver and gold
15 particulates: Particle attributes and biological mechanisms responsible for the
16 observed toxicity. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 40, n. 4, p. 328–346, 2010.
- 17 JONES, M. K. et al. The cytoskeleton and motor proteins of human schistosomes
18 and their roles in surface maintenance and host-parasite interactions. **BioEssays**, v.
19 26, n. 7, p. 752–765, 2004.
- 20 JORDAN, P. From Katayama to the Dakhla Oasis: the beginning of epidemiology
21 and control of bilharzia. **Acta Tropica**, v. 77, n. 1, p. 9–40, 2000.
- 22 KABATEREINE, N. B. et al. Epidemiology and geography of *Schistosoma mansoni* in
23 Uganda: Implications for planning control. **Tropical Medicine and International**
24 **Health**, v. 9, n. 3, p. 372–380, 2004.
- 25 KATZ, N. **Inquérito Nacional de Prevalência da Esquistossomose mansoni e**
26 **Geo-helminthoses**, p. 76, 2018.
- 27 KHAN, N. T. et al. An Overview: Biological Organisms That Serves as Nanofactories
28 for Metallic Nanoparticles Synthesis and Fungi Being the Most Appropriate.
29 **Bioceramics Development and Applications**, v. 07, n. 01, 2017.
- 30 KIM, J. S. et al. Antimicrobial effects of silver nanoparticles. **Nanomedicine:**
31 **Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 3, n. 1, p. 95–101, 2007.
- 32 KIM, S. W. et al. Antifungal effects of silver nanoparticles (AgNPs) against various
33 plant pathogenic fungi. **Mycobiology**, v. 40, n. 1, p. 53–58, 2012.
- 34 KING, C. L.; HIGASHI, G. I. *Schistosoma mansoni*: Silver ion (Ag⁺) stimulates and
35 reversibly inhibits lipid-induced cercarial penetration. **Experimental Parasitology**, v.
36 75, n. 1, p. 31–39, 1992.
- 37 KITTUR, N. et al. Defining persistent hotspots: Areas that fail to decrease
38 meaningfully in prevalence after multiple years of mass drug administration with
39 praziquantel for control of schistosomiasis. **American Journal of Tropical Medicine**
40 **and Hygiene**, v. 97, n. 6, p. 1810–1817, 2017.
- 41 KREUTER, J.; GELPERINA, S. Use of Nanoparticles for Cerebral Cancer. **Tumori**
42 **Journal**, v. 94, n. 2, p. 271–277, 2008.

- 1 KUSEL, J. R.; AL-ADHAMI, B. H.; DOENHOFF, M. J. The schistosome in the
2 mammalian host: Understanding the mechanisms of adaptation. **Parasitology**, v.
3 134, n. 11, p. 1477–1526, 2007.
- 4 LA FLAMME, A. C. et al. IL-4 Plays a Crucial Role in Regulating Oxidative Damage
5 in the Liver During Schistosomiasis. **The Journal of Immunology**, v. 166, n. 3, p.
6 1903–1911, 2001.
- 7 LAURENT, S. et al. Magnetic iron oxide nanoparticles: Synthesis, stabilization,
8 vectorization, physicochemical characterizations, and biological applications .
9 **Chemical Reviews**, v. 110, n. 4, p. 2574, 2010.
- 10 LEE, D.-S. et al. Antibacterial Activity of Silver-Nanoparticles Against Staphylococcus
11 Aureus and Escherichia Coli. **Article in Korean Journal of Microbiology and**
12 **Biotechnology**, v. 39, n. 1, p. 77–85, 2010.
- 13 LEWINSKI, N.; COLVIN, V.; DREZEK, R. Cytotoxicity of Nanoparticles. **Small**, v. 4,
14 n. 1, p. 26–49, 2008.
- 15 LIM, D. et al. Oxidative stress-related PMK-1 P38 MAPK activation as a mechanism
16 for toxicity of silver nanoparticles to reproduction in the nematode *Caenorhabditis*
17 *elegans*. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 585–592, 2012.
- 18 LOK, C.-N. et al. Proteomic Analysis of the Mode of Antibacterial Action of Silver
19 Nanoparticles. **Journal of Proteome Research**, v. 5, n. 4, p. 916–924, 2006.
- 20 LOO, Y. Y. et al. In Vitro antimicrobial activity of green synthesized silver
21 nanoparticles against selected Gram-negative foodborne pathogens. **Frontiers in**
22 **Microbiology**, v. 9, n. JUL, 2018.
- 23 MARAMBIO-JONES, C.; HOEK, E. M. V. A review of the antibacterial effects of silver
24 nanomaterials and potential implications for human health and the environment.
25 **Journal of Nanoparticle Research**, v. 12, n. 5, p. 1531–1551, 2010.
- 26 MARTINS-MELO, R. F. et al. Trends in schistosomiasis-related mortality in Brazil,
27 2000–2011. **International Journal for Parasitology**, v. 44, n. 14, p. 1055–1062,
28 2014.
- 29 MARTINS-MELO, R. F. et al. Mortality from neglected tropical diseases in Brazil,
30 2000-2011. **Bull World Health Organ**, v. 94, p. 103–110, 2016.
- 31 MARTINS SILVA, C. L. Endothelial Cells as Targets of the Intravascular Parasitic
32 Disease Schistosomiasis. In: **Vascular Responses to Pathogens**. Elsevier Inc., p.
33 195–207, 2016.
- 34 MAURER, L. L.; MEYER, J. N. A systematic review of evidence for silver
35 nanoparticle-induced mitochondrial toxicity. **Environmental Science: Nano**, v. 3, n.
36 2, p. 311–322, 2016.
- 37 MCDONALD, B. A.; LINDE, C. Pathogen population genetics, evolutionary potential,
38 and durable resistance. **Annual Review of Phytopathology**, v. 40, p. 349–379,
39 2002.
- 40 MCKEE, A. S.; PEARCE, E. J. CD25 + CD4 + Cells Contribute to Th2 Polarization
41 during Helminth Infection by Suppressing Th1 Response Development . **The Journal**
42 **of Immunology**, v. 173, n. 2, p. 1224–1231, 2004.

- 1 MCKERROW, J. H.; SALTER, J. Invasion of skin by *Schistosoma* cercariae. **Trends**
2 **in Parasitology**, v. 18, n. 5, p. 193–195, 2002.
- 3 MCMANUS, D. P. et al. Schistosomiasis. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 4, n.
4 1, p. 13, 2018.
- 5 MDULUZA, T.; MUTAPI, F. Putting the treatment of paediatric schistosomiasis into
6 context. **Infectious Diseases of Poverty**, v. 6, n. 1, p. 85, 2017.
- 7 MEEVISSSEN, M. H. J. et al. Structural Characterization of Glycans on Omega-1, a
8 Major *Schistosoma mansoni* Egg Glycoprotein That Drives Th2 Responses. **Journal**
9 **of Proteome Research**, v. 9, n. 5, p. 2630–2642, 2010.
- 10 MESSERLI, S. M. et al. *Schistosoma mansoni* P-glycoprotein levels increase in
11 response to praziquantel exposure and correlate with reduced praziquantel
12 susceptibility. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 167, n. 1, p. 54–59,
13 2009.
- 14 MEYER, T. et al. Taste, A New Incentive to Switch to (R)-Praziquantel in
15 Schistosomiasis Treatment. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 3, n. 1, p. e357,
16 2009.
- 17 MISHRA, S.; SINGH, H. B. Biosynthesized silver nanoparticles as a nanoweapon
18 against phytopathogens: exploring their scope and potential in agriculture. **Applied**
19 **Microbiology and Biotechnology**, v. 99, n. 3, p. 1097–1107, 2015.
- 20 MORONES, J. R. et al. The bactericidal effect of silver nanoparticles.
21 **Nanotechnology**, v. 16, n. 10, p. 2346–2353, 2005.
- 22 MOUNTFORD, A. P.; TROTTEIN, F. Schistosomes in the skin: A balance between
23 immune priming and regulation. **Trends in Parasitology**, v. 20, n. 5, p. 221–226,
24 2004.
- 25 MOUSTAFA, M. A. et al. The potential effects of silver and gold nanoparticles as
26 molluscicides and cercaricides on *Schistosoma mansoni*. **Parasitology Research**, v.
27 117, n. 12, p. 3867–3880, 2018.
- 28 MULVENNA, J. et al. Exposed proteins of the *Schistosoma japonicum* tegument.
29 **International Journal for Parasitology**, v. 40, n. 5, p. 543–554, 2010.
- 30 NETALA, V. R. et al. Biogenesis of silver nanoparticles using endophytic fungus
31 *Pestalotiopsis microspora* and evaluation of their antioxidant and anticancer
32 activities. **International Journal of Nanomedicine**, v. 11, p. 5683–5696, 2016.
- 33 NETO, O. B. L. et al. Spatial analysis of schistosomiasis human cases in the
34 horticultural community of Zona da Mata of Pernambuco state, Brazil. **Revista**
35 **Brasileira de Epidemiologia**, v. 15, n. 4, p. 771–780, 2012.
- 36 OLIVEIRA, D. S. et al. Schistosomiasis mansoni in urban Northeast Brazil: influence
37 of rainfall regime on the population dynamics of Biomphalaria sp. **Revista da**
38 **Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 46, n. 5, p. 654–657, 2013.
- 39 PANYALA, N. R.; PEÑA-MÉNDEZ, E. M.; HAVEL, J. Silver or silver nanoparticles: A
40 hazardous threat to the environment and human health? **Journal of Applied**
41 **Biomedicine**, v. 6, n. 3, p. 117–129, 2008.
- 42 PEARCE, E. J. et al. Th2 response polarization during infection with the helminth

- 1 parasite *Schistosoma mansoni*. **Immunological Reviews**, v. 201, n. 1, p. 117–126,
2 2004.
- 3 PEARCE, E. J.; MACDONALD, A. S. The immunobiology of schistosomiasis. **Nature**
4 **Reviews Immunology**, v. 2, n. 7, p. 499–511, 2002.
- 5 PENG, H. et al. IL-33 Contributes to *Schistosoma japonicum*-induced hepatic
6 pathology through induction of M2 macrophages. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 1–
7 11, 2016.
- 8 PENNANCE, T. et al. Urogenital schistosomiasis transmission on Unguja Island,
9 Zanzibar: Characterisation of persistent hot-spots. **Parasites and Vectors**, v. 9, n. 1,
10 p. 646, 2016.
- 11 PICA-MATTOCCIA, L. et al. The schistosome enzyme that activates oxamniquine
12 has the characteristics of a sulfotransferase. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**,
13 v. 101, n. suppl 1, p. 307–312, 2006.
- 14 PICA-MATTOCCIA, L. et al. Genetic analysis of decreased praziquantel sensitivity in
15 a laboratory strain of *Schistosoma mansoni*. **Acta Tropica**, v. 111, n. 1, p. 82–85,
16 2009.
- 17 PIMENTEL-ACOSTA, C. A. et al. Efficacy of silver nanoparticles against the adults
18 and eggs of monogenean parasites of fish. **Parasitology Research**, v. 118, n. 6, p.
19 1741–1749, 2019.
- 20 PINTO-ALMEIDA, A. et al. Morphological Characteristics of *Schistosoma mansoni*
21 PZQ-Resistant and -Susceptible Strains Are Different in Presence of Praziquantel.
22 **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 594, 2016.
- 23 PLEASS, R. J.; KUSEL, J. R.; WOOF, J. M. Cleavage of human IgE mediated by
24 *Schistosoma mansoni*. **International Archives of Allergy and Immunology**, v. 121,
25 n. 3, p. 194–204, 2000.
- 26 PRABHU, S.; POULOSE, E. K. Silver nanoparticles: mechanism of antimicrobial
27 action, synthesis, medical applications, and toxicity effects. **International Nano**
28 **Letters**, v. 2, n. 1, p. 32, 2012.
- 29 RAI, M. et al. Broad-spectrum bioactivities of silver nanoparticles: The emerging
30 trends and future prospects. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 98, n. 5,
31 p. 1951–1961, 2014.
- 32 RAI, M. K. et al. Silver nanoparticles: The powerful nanoweapon against multidrug-
33 resistant bacteria. **Journal of Applied Microbiology**, v. 112, n. 5, p. 841–852, 2012.
- 34 REES, C. A. et al. Neglected tropical diseases in children: An assessment of gaps in
35 research prioritization. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 13, n. 1, p.
36 e0007111, 2019.
- 37 REIDY, B. et al. Mechanisms of silver nanoparticle release, transformation and
38 toxicity: A critical review of current knowledge and recommendations for future
39 studies and applications. **Materials**, v. 6, n. 6, p. 2295–2350, 2013.
- 40 ROH, J. Y. et al. Ecotoxicity of silver nanoparticles on the soil nematode
41 *Caenorhabditis elegans* using functional ecotoxicogenomics. **Environmental**
42 **Science and Technology**, v. 43, n. 10, p. 3933–3940, 2009.

- 1 ROSS, A. G. et al. Katayama syndrome. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 7, n. 3,
2 p. 218–224, 2007.
- 3 ROSS, A. G. P. et al. Schistosomiasis. **New England Journal of Medicine**, v. 346,
4 n. 16, p. 1212–1220, 2002.
- 5 ROSS, A. G. P.; OLVEDA, R. M.; LI, Y. An audacious goal: the elimination of
6 schistosomiasis in our lifetime through mass drug administration. **The Lancet**, v. 385,
7 n. 9983, p. 2220–2221, 2015.
- 8 RUTITZKY, L. I.; LOPES DA ROSA, J. R.; STADECKER, M. J. Severe CD4 T Cell-
9 Mediated Immunopathology in Murine Schistosomiasis Is Dependent on IL-12p40
10 and Correlates with High Levels of IL-17. **The Journal of Immunology**, v. 175, n. 6,
11 p. 3920–3926, 2005.
- 12 SANIN, D. E.; MOUNTFORD, A. P. Sm16, a major component of *Schistosoma*
13 *mansoni* cercarial excretory/secretory products, prevents macrophage classical
14 activation and delays antigen processing. **Parasites and Vectors**, v. 8, n. 1, p. 1,
15 2015.
- 16 SCHMITZ, J. et al. IL-33, an interleukin-1-like cytokine that signals via the IL-1
17 receptor-related protein ST2 and induces T helper type 2-associated cytokines.
18 **Immunity**, v. 23, n. 5, p. 479–490, 2005.
- 19 SCHOLTE, R. G. C. et al. Spatial distribution of *Biomphalaria* spp., the intermediate
20 host snails of *Schistosoma mansoni*, in Brazil. **Geospatial Health**, v. 6, n. 3 SUPPL.,
21 p. S95–S101, 2012.
- 22 SCHWARTZ, C.; FALLON, P. G. Schistosoma “Eggs-iting” the host: Granuloma
23 formation and egg excretion. **Frontiers in Immunology**, v. 9, p. 2492, 2018.
- 24 SHAINHEIT, M. G. et al. Dendritic Cell IL-23 and IL-1 Production in Response to
25 Schistosome Eggs Induces Th17 Cells in a Mouse Strain Prone to Severe
26 Immunopathology. **The Journal of Immunology**, v. 181, n. 12, p. 8559–8567, 2008.
- 27 SINGH, K. P. et al. Retroviral Foxp3 gene transfer ameliorates liver granuloma
28 pathology in *Schistosoma mansoni* infected mice. **Immunology**, v. 114, n. 3, p. 410–
29 417, 2005.
- 30 SKELLY, P. J. et al. Schistosome Feeding and Regurgitation. **PLoS Pathogens**, v.
31 10, n. 8, p. e1004246, 2014.
- 32 SONDI, I.; SALOPEK-SONDI, B. Silver nanoparticles as antimicrobial agent: A case
33 study on *E. coli* as a model for Gram-negative bacteria. **Journal of Colloid and**
34 **Interface Science**, v. 275, n. 1, p. 177–182, 2004.
- 35 SOUMELIS, V. et al. Human epithelial cells trigger dendritic cell-mediated allergic
36 inflammation by producing TSLP. **Nature Immunology**, v. 3, n. 7, p. 673–680, 2002.
- 37 SPIELMAN, D. et al. Does inbreeding and loss of genetic diversity decrease disease
38 resistance? **Conservation Genetics**, v. 5, n. 4, p. 439–448, ago. 2004.
- 39 SRIVASTAVA, L. et al. Immunomodulatory Glycan Lacto-N-Fucopentaose III
40 Requires Clathrin-Mediated Endocytosis To Induce Alternative Activation of Antigen-
41 Presenting Cells. **Infection and Immunity**, v. 82, n. 5, p. 1891–1903, 2014.
- 42 STARNES, D. L. et al. Impact of sulfidation on the bioavailability and toxicity of silver

- 1 nanoparticles to *Caenorhabditis elegans*. **Environmental Pollution**, v. 196, p. 239–
2 246, 2015.
- 3 STEINMANN, P. et al. Schistosomiasis and water resources development:
4 systematic review, meta-analysis, and estimates of people at risk. **The Lancet**
5 **infectious diseases**, v. 6, n. 7, p. 411-425, 2006.
- 6 STELMA, F. F. et al. Efficacy and Side Effects of Praziquantel in an Epidemic Focus
7 of *Schistosoma mansoni*. **The American Journal of Tropical Medicine and**
8 **Hygiene**, v. 53, n. 2, p. 167–170, 1995.
- 9 STURROCK, R. F. The Schistosomes and Their Intermediate Hosts. In:
10 **Schistosomiasis**, p. 7-83, 2001.
- 11 SU, J. et al. Alternative Materials and Processing Techniques for Optimized
12 Nanostructures in Dye-Sensitized Solar Cells. **Journal of Nanoscience and**
13 **Nanotechnology**, v. 8, n. 5, p. 2230–2248, 2008.
- 14 TAN, W. B.; JIANG, S.; ZHANG, Y. Quantum-dot based nanoparticles for targeted
15 silencing of HER2/neu gene via RNA interference. **Biomaterials**, v. 28, n. 8, p.
16 1565–1571, 2007.
- 17 TOOR, J. et al. Are we on our way to achieving the 2020 goals for schistosomiasis
18 morbidity control using current world health organization guidelines? **Clinical**
19 **Infectious Diseases**, v. 66, n. suppl_4, p. S245–S252, 2018.
- 20 TURNER, J. D. et al. CD4+CD25+ Regulatory Cells Contribute to the Regulation of
21 Colonic Th2 Granulomatous Pathology Caused by Schistosome Infection. **PLoS**
22 **Neglected Tropical Diseases**, v. 5, n. 8, p. e1269, 2011.
- 23 VAN HELLEMOND, J. J. et al. Functions of the tegument of schistosomes: Clues
24 from the proteome and lipidome. **International Journal for Parasitology**, v. 36, n. 6,
25 p. 691–699, 2006.
- 26 VAN NASSAUW, L. et al. Schistosomicidal activity of the antimalarial drug,
27 mefloquine, in *Schistosoma mansoni*-infected mice. **Travel Medicine and Infectious**
28 **Disease**, v. 6, n. 5, p. 253–258, 2008.
- 29 VIGNESHWARAN, N. et al. Functional Finishing of Cotton Fabrics Using Silver
30 Nanoparticles. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 7, n. 6, p. 1893–
31 1897, 2007.
- 32 WANG, Y. et al. Up-regulation of Interleukin-21 Contributes to Liver Pathology of
33 Schistosomiasis by Driving GC Immune Responses and Activating HSCs in Mice.
34 **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–11, 2017.
- 35 WEBSTER, J. P.; GOWER, C. M.; BLAIR, L. Do hosts and parasites coevolve?
36 Empirical support from the *Schistosoma* system. **American Naturalist**, v. 164, n. S5,
37 p. S33-S51, 2004.
- 38 WEGNER, D. H. The profile of the trematodicidal compound praziquantel.
39 **Arzneimittel-Forschung**, v. 34, n. 9B, p. 1132–6, 1984.
- 40 WERKMAN, M. et al. The past matters: estimating intrinsic hookworm transmission
41 intensity in areas with past mass drug administration to control lymphatic filariasis.
42 **Parasites and Vectors**, v. 10, n. 1, p. 254, 2017.

- 1 WHO, W. H. O. **Schistosomiasis and soil-transmitted helminth infections. Fifty-**
2 **fourth World Health Assembly. Resolution WHO 54.2, Infant and young child**
3 **nutrition**, Geneva: World Health Organization, 2001.
- 4 WHO, W. H. O. **Preventive chemotherapy in human helminthiasis: coordinated**
5 **use of anthelmintic drugs in control interventions: a manual for health**
6 **professionals and programme managers**. Geneva: World Health Organization,
7 2006.
- 8 WHO, W. H. O. **Global report for research on infectious diseases of poverty**.
9 Geneva: World Health Organization, 2012.
- 10 WHO, W. H. O. **Schistosomiasis: progress report 2001–2011, strategic plan**
11 **2012–2020**. Geneva: World Health Organization, 2017.
- 12 WONG, K. K. Y.; LIU, X. Silver nanoparticles - The real “silver bullet” in clinical
13 medicine? **MedChemComm**, v. 1, n. 2, p. 125–131, 2010.
- 14 WU, M.-H. et al. Comparison of the Therapeutic Efficacy and Side Effects of a Single
15 Dose of Levo-Praziquantel with Mixed Isomer Praziquantel in 278 Cases of
16 Schistosomiasis Japonica. **The American Journal of Tropical Medicine and**
17 **Hygiene**, v. 45, n. 3, p. 345–349, 1991.
- 18 XIAO, S.; MEI, J.; JIAO, P. The *in vitro* effect of mefloquine and praziquantel against
19 juvenile and adult *Schistosoma japonicum*. **Parasitology Research**, v. 106, n. 1, p.
20 237–246, 2009.
- 21 YAMANAKA, M.; HARA, K.; KUDO, J. Bactericidal actions of a silver ion solution on
22 *Escherichia coli*, studied by energy-filtering transmission electron microscopy and
23 proteomic analysis. **Applied and environmental microbiology**, v. 71, n. 11, p.
24 7589–93, 2005.
- 25 YANG, X. et al. Mechanism of silver nanoparticle toxicity is dependent on dissolved
26 silver and surface coating in *Caenorhabditis elegans*. **Environmental Science and**
27 **Technology**, v. 46, n. 2, p. 1119–1127, 2012.
- 28 YEN, H. J.; HSU, S. H.; TSAI, C. L. Cytotoxicity and immunological response of gold
29 and silver nanoparticles of different sizes. **Small**, v. 5, n. 13, p. 1553–1561, 2009.
- 30 YOON, K.-Y. et al. Susceptibility constants of *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* to
31 silver and copper nanoparticles. **Science of The Total Environment**, v. 373, n. 2–3,
32 p. 572–575, 2007.
- 33 ZARETSKY, A. G. et al. T follicular helper cells differentiate from Th2 cells in
34 response to helminth antigens. **Journal of Experimental Medicine**, v. 206, n. 5, p.
35 991–999, 2009.
- 36 ZHAN, T. et al. Dynamics of Th9 cells and their potential role in immunopathogenesis
37 of murine schistosomiasis. **Parasites and Vectors**, v. 10, n. 1, p. 305, 2017.
- 38 ZHANG, X. F. et al. Silver nanoparticles: Synthesis, characterization, properties,
39 applications, and therapeutic approaches. **International Journal of Molecular**
40 **Sciences**, v. 17, n. 9, p. 1534, 2016.
- 41 ZHENG, B. et al. T Lymphocyte-Mediated Liver Immunopathology of
42 Schistosomiasis. **Frontiers in Immunology**, v. 11, p. 61, 2020.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

- Avaliar *in vitro* a atividade esquistossomicida de AgNp-Bio sobre esquistossômulos e vermes adultos de *Schistosoma mansoni* e determinar a carga parasitária e peso dos órgãos após o tratamento na infecção experimental.

3.2 Objetivos específicos

- Caracterizar as AgNp-Bio quanto à distribuição de tamanho e potencial zeta.
- Determinar a concentração letal para 50% (LC₅₀) e a integridade de membrana dos esquistossômulos tratados com AgNp-Bio.
- Avaliar a motilidade e metabolismo mitocondrial de vermes adultos expostos a AgNp-Bio, à fim de determinar a concentração letal para 50% (LC₅₀) dos parasitos.
- Analisar as alterações morfológicas causadas em vermes adultos tratados com AgNp-Bio.
- Verificar se o tratamento com AgNp-Bio induz estresse oxidativo (ROS, NO e MDA) como meio de mecanismo esquistossomicida em vermes adultos.
- Avaliar os mecanismos envolvidos na ação direta do tratamento sobre vermes adultos de *S. mansoni* (formação de corpos lipídicos, despolarização mitocondrial, formação de vacúolos autofágicos e alteração da integridade da membrana).
- Verificar *in vivo* o peso corporal, os níveis séricos de NO, ASLT e ALT, e as alterações histopatológicas de camundongos tratados via oral com AgNp-Bio, à fim de avaliar a toxicidade.
- Determinar no modelo experimental, a carga parasitária por meio de Kato-Katz, a quantidade de vermes adultos presentes no sistema porta-hepático e de ovos retidos no fígado, bem como a hepatoesplenomegalia de camundongos infectados por *S. mansoni* tratados com AgNp-Bio.

1 **4. PRODUÇÃO CIENTÍFICA**

2

3 **4.1 Artigo:** Biogenic silver nanoparticle exhibits schistosomicidal activity *in vitro* and
4 reduces the parasitic burden in experimental schistosomiasis mansoni

5

6 Submetido e aceito na revista: *Microbes and Infection*



Original article

Biogenic silver nanoparticle exhibits schistosomicidal activity *in vitro* and reduces the parasitic burden in experimental schistosomiasis mansoni



Mariana Barbosa Detoni ^{a, *}, Bruna Taciane da Silva Bortoleti ^{a, b},
 Fernanda Tomiotto-Pellissier ^{a, b}, Virgínia Marcia Concato ^a, Manoela Daiele Gonçalves ^c,
 Taylon Felipe Silva ^a, Luryan Silvério Fidélis Ortiz ^a, Amanda Caroliny Gomilde ^a,
 Ana Carolina Jacob Rodrigues ^a, Ricardo Luís Nascimento de Matos ^d,
 Ana Paula Frederico Rodrigues Loureiro Bracarense ^d,
 Andressa Maria Rorato Nascimento de Matos ^d, Andréa Name Colado Simão ^e,
 Thiago Hideo Endo ^f, Renata Katsuko Takayama Kobayashi ^f, Gerson Nakazato ^f,
 Idessania Nazareth Costa ^a, Ivete Conchon-Costa ^a, Francisco José de Abreu Oliveira ^g,
 Wander Rogério Pavanelli ^{a, 1}, Milena Menegazzo Miranda-Sapla ^{a, h, **, 1}

^a Laboratory of Immunoparasitology of Neglected Diseases and Cancer, Department of Pathological Sciences, State University of Londrina, Londrina, Paraná, Brazil

^b Graduate Program in Biosciences and Biotechnology, Carlos Chagas Institute, Fiocruz, Curitiba, Paraná, Brazil

^c Laboratory of Biotransformation and Phytochemistry, Department of Chemistry, State University of Londrina, Londrina, Paraná, Brazil

^d Laboratory of Animal Pathology, Department of Preventive Veterinary Medicine, State University of Londrina, Londrina, Paraná, Brazil

^e Clinical Analysis and Toxicology, Department of Pathology, State University of Londrina, Londrina, Paraná, Brazil

^f Laboratory of Basic and Applied Bacteriology, Department of Microbiology, State University of Londrina, Londrina, Paraná, Brazil

^g Laboratory of Experimental Parasitology, Department of Pathological Sciences, State University of Londrina, Paraná, Brazil

^h Postgraduate Program in Pharmaceutical Science, University of Vale Do Itajaí, Santa Catarina, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 9 September 2022

Accepted 24 April 2023

Available online 28 April 2023

Keywords:

Schistosoma mansoni

Nanotechnology

Treatment

Anthelmintic

Silver nanoparticles

ABSTRACT

Schistosomiasis is a neglected tropical parasitic disease that affects millions of people, being the second most prevalent parasitic disease worldwide. The current treatment has limited effectiveness, drug-resistant strains, and is not effective in different stages of the disease. This study investigated the anti-schistosomal activity of biogenic silver nanoparticles (Bio-AgNp) against *Schistosoma mansoni*. Bio-AgNp presented direct schistosomicidal activity on newly transformed schistosomula causing plasma membrane permeabilization. In *S. mansoni* adult worms, reduced the viability and affected the motility, increasing oxidative stress parameters, and inducing plasma membrane permeabilization, loss of mitochondrial membrane potential, lipid bodies accumulation, and autophagic vacuoles formation. During the experimental schistosomiasis mansoni model, Bio AgNp restored body weight, reduced hepatosplenomegaly, and decrease the number of eggs and worms in feces and liver tissue. The treatment also ameliorates liver damage and reduces macrophage and neutrophil infiltrates. A reduction in count and size was evaluated in the granulomas, as well as a change to an exudative-proliferative phase, with a local increase of IFN- γ . Together our results showed that Bio-AgNp is a promising therapeutic candidate for studies of new therapeutic strategies against schistosomiasis.

© 2023 Institut Pasteur. Published by Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

* Corresponding author. State University of Londrina, Celso Garcia Cid Highway, University Campus, Londrina, Paraná, Brazil.

** Corresponding author. State University of Londrina, Celso Garcia Cid Highway, University Campus, Londrina, Paraná, Brazil.

E-mail addresses: marianabdtoni@gmail.com (M.B. Detoni), mirandasapla@univali.br (M.M. Miranda-Sapla).

¹ Equal contribution.

Abbreviations			
ALT	alanine aminotransferase	NR	nile ned
AST	aspartate aminotransferase	NO	nitric oxide
Bio-AgNp	Biogenic silver nanoparticle	NBT	nitroblue tetrazolium
bw	body weight	OECD	Organization for Economic Cooperation and Development
CBA	Cytometric Beads Array	PBS	phosphate-buffered saline
DMSO	dimethyl sulfoxide	PI	propidium iodide
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay	ROS	reactive oxygen species
FBS	fetal bovine sérum	AgNp	silver nanoparticle
H&E	Hematoxylin and Eosin	SEM	standard error of the mean
HPLC	high performance liquid chromatography	O ²	superoxide anion
LC ₅₀	lethal concentration of 50% of parasites	TMRE	tetramethylrhodamine-ethyl ester
MDA	malondialdehyde	WHO	World Health Organization
MDC	monodansylcadaverine	TEP	1,1,3,3-tetraethoxypropane
MPO	myeloperoxidase	H ₂ DCFDA	2',7'-dichlorofluorescein diacetate
NAG	N-acetylglucosaminidase	MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
NTA	nanoparticle tracking analysis	DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
NTS	newly transformed schistosomula		

Schistosomiasis is a chronic neglected tropical parasitic disease caused by trematode flukes of the genus *Schistosoma*. It is the second most common parasitic disease in the world, affecting over 200 million people annually. It is estimated that 700 million people in endemic countries are at risk of infection, and several million suffer from severe morbidity [1,2]. *Schistosoma mansoni* parasites have a complex life cycle. Free-living larval cercariae penetrate the human skin, mature in tissues into schistosomula, and migrate through the systemic circulation, residing in mesenteric veins as sexually mature adults. Female worms shed eggs that either leave the body in excreta or become trapped in tissues inducing a granulomatous immune response [3].

Preventive chemotherapy by mass administration of praziquantel (PZQ) is the main strategy for the prevention and control of schistosomiasis in highly endemic areas [4]. Despite advances in the coverage of mass administration, several studies have shown that PZQ has no prophylactic properties and is ineffective against larval stages, representing a major gap in the therapy [5]. *In vitro* assays have also reported that adult worm strains exposed to continuous exposure to PZQ exhibit greater resistance, indicating an active life after treatment ends [6]. Furthermore, low cure rates following a single dose of PZQ have been observed under conditions of intense transmission, high initial worm burden, or maturation of pre-patent infections [7].

Given the disadvantages of current prophylactic and therapeutic strategies, it is necessary the development of new alternatives that cover all the evolutionary forms of the parasite and the different stages of the disease. Silver has been used extensively for its antimicrobial properties [8]. Nanotechnology has opened the possibility of using silver nanoparticles (AgNps) for a variety of medical applications, since they have a broad spectrum of pharmacological activity, exhibit microbicidal properties against several microorganism species, and have a larger surface area compared to silver ions, allowing for better contact with the microorganism [9–11]. In the schistosomiasis model, AgNps presented *in vitro* action on *S. mansoni* as molluscicides and cercaricides [12], and on *Schistosoma japonicum* cercariae,

inducing ultrastructural changes, tail-shedding, and blocking infectivity [13].

The usual method used in AgNps production involves chemical synthesis, which exhibits significant toxicity, and leads to the generation of residues that cause environmental pollution [14]. Given this, the interest in biogenic synthesis methods has grown, presenting less toxicity, as well as greater stability and physical-chemical characteristics of the particles [15]. The present study evaluated the effects of Bio-AgNp obtained by *Fusarium oxysporum* in the *in vitro* and *in vivo* experimental schistosomiasis *mansoni* model.

1. Materials and methods

1.1. Biogenic silver nanoparticles

Bio-AgNp was synthesized at the Laboratory of Basic and Applied Bacteriology of the State University of Londrina (Paraná, Brazil), through the filamentous fungus *F. oxysporum* (551 strain) [16]. The fungus was grown for 7 days at 28 °C in Petri dishes containing 0.5% yeast extract and 2% malt extract. After, 1 g of fungal biomass was taken in 10 mL of distilled water and stirred for 72 h at 28 °C (150 rpm). The components of the aqueous solution were separated by vacuum filtration (pore size of 0,22 µm). AgNO₃ (Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, USA) at 0.01 M was added to this solution. The system was maintained at 28 °C for 15 days under static conditions. Bio-AgNp was obtained after the reduction of silver nitrate by components of the fungus-free solution. Bio-AgNp was washed by ultracentrifugation (27,000×g, 4 °C, 30 min) followed by ultrasonic incubation (30 min), both steps were repeated three times. The washing step was important to remove possible residues from the biosynthesis. Ag was quantified using an Energy Dispersive X-ray Fluorescence Spectrometer (EDX-7000). Particle size distribution was measured by nanoparticle tracking analysis (NTA) - NanoSight LM10 system and zeta potential using ZetaSizer NanoZS (Malvern Instruments, UK).

1.2. Assessment of the effect of the Bio-AgNp on newly transformed schistosomula (NTS)

S. mansoni (BH strain) cercariae were mechanically transformed into NTS using a vortex mixer [17]. NTS were cultured in 199 medium containing 1% L-glutamine, 10% sodium bicarbonate (10% fetal bovine serum (FBS), 1% human urine, 10 U/mL penicillin, and 10 µg/mL streptomycin supplemented) (GIBCO, Invitrogen, New York, USA) and incubated overnight (37 °C, 5% CO₂). Subsequently, NTS were transferred to a 96-well culture plate (200/well) and incubated in the presence of Bio-AgNp (0.2, 0.5, 0.7, 1, 5, and 10 µg/mL) for 24 h. Viability was assessed by trypan blue exclusion assay. Lethal concentration for 50% of the parasites (LC₅₀) was calculated by logarithmic non-linear regression to the dose–response curve. Cell membrane integrity was assessed using propidium iodide (PI) (2 µg/mL) [18] and nucleic acids with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (1 µg/mL) [19] (Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, USA) under a fluorescent microscope EVOS® FL Auto Cell imaging system (Thermo Fisher Scientific, USA), at 200× magnification.

1.3. In vitro studies with *Schistosoma mansoni* adult worms

Adult worms were harvested by perfusion of the hepatic portal system of *S. mansoni*-infected BALB/c mice with sterile saline (0.9% NaCl). The worms were transferred to Petri dishes with RPMI 1640 medium (10% FBS, 20 mM HEPES, 100 U/mL penicillin, and 100 µg/mL streptomycin supplemented) (GIBCO, Invitrogen, New York, USA). Worms (paired, male and female) were placed into 24-well plates (3/well), and incubated overnight (37 °C, 5% CO₂). Motility was assessed by visual inspection under an inverted microscope. Bio-AgNp was added (1, 5, 10, 15, 20, 25, and 50 µg/mL) and worms were monitored after 2, 4, 6, 12, and 24 h of incubation. Scores were used: 4) active with normal locomotion; 3) slow with delayed body movements; 2) minimal activity, occasional head and tail movements; and 1) complete absence of movements [20].

Metabolic activity was assessed by a 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) colorimetric assay [21]. Bio-AgNp was added (1, 5, 10, 15, 20, 25, 50, 100, and 200 µg/mL) and incubated for 24 h (37 °C, 5% CO₂). MTT solution (Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, USA) (5 mg/mL) was inserted and incubated for 1 h in a dark room at 37 °C. The solution was removed and dimethyl sulfoxide (DMSO) was added. The samples were transferred to 96-well plates and optical density was measured in a spectrophotometer (Thermo Scientific, Multiskan GO, USA) at 550 nm. The next experiments were carried out using LC₅₀ (12.62 µg/mL) and 2× LC₅₀ (25.20 µg/mL) values.

1.4. Scanning electron microscopy

Morphological analysis of *S. mansoni* adult male worms was performed by scanning electron microscopy. After incubation with Bio-AgNp, the worms were washed in 0.1 M sodium cacodylate buffer (pH 7.2) and fixed in 0.1 M sodium cacodylate buffer and 2.5% glutaraldehyde. Samples were washed three times with 0.1 M cacodylate buffer, post-fixed in 1% osmium tetroxide in the dark for 60 min, and washed again with 0.1 M cacodylate buffer. Critical point drying was performed by replacing ethanol with carbon dioxide, metallization with gold, and analyzed in a scanning electron microscope (FEI QUANTA 200) at 1 mm, 300 µm, 100 µm, and 20 µm magnifications.

1.5. Oxidative stress assays

1.5.1. Reactive oxygen species (ROS) generation

To assess reactive oxygen species (ROS) production, worms treated with Bio-AgNp were washed with phosphate-buffered saline (PBS) and incubated with 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (H₂DCFDA) probe (1 µg/mL) (Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, USA) for 45 min [22]. After, the worms were washed again and transferred to 96-well black plates. ROS were measured according to a fluorescence increase resulting from the conversion of non-fluorescent dye into highly fluorescent 2',7'-dichlorofluorescein, with a 488 nm-excitation wavelength and a 530 nm-emission wavelength using a fluorescence microplate reader (Victor X3, PerkinElmer).

1.5.2. Superoxide anion (O²⁻) quantification

Superoxide anion (O²⁻) levels were assessed using a colorimetric nitroblue tetrazolium (NBT) reduction test [23]. Bio-AgNp-treated adult worms were incubated with 2% NBT solution (Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, USA) for 1 h at room temperature. The resulting formazan was solubilized by adding of 150 µl KOH (2 M) and 150 µl DMSO, transferred to 96-well microplates, and measured using a spectrophotometer (Thermo Scientific, Multiskan GO, USA) at 620 nm.

1.5.3. Nitrite quantification as an estimate of nitric oxide (NO) production

Nitric oxide (NO) levels were determined by the Griess method. Briefly, 60 µL of supernatant was added to 60 µL of Griess reagent (1% sulfanilamide and 0.1% of N-(1-Naphthyl) ethylenediamine in orthophosphoric acid (H₃PO₄ 5%), and incubated for 10 min at room temperature, protected from light. A calibration curve was prepared by serial dilutions of NaNO₂ to determine nitrite concentrations. The absorbance was read at 550 nm using a standard microplate reader (Multiskan GO, Thermo Scientific). The final results were expressed in µM of nitrite.

1.5.4. Measurement of malondialdehyde levels (MDA) by high performance chromatography

Malondialdehyde (MDA) levels were determined in aliquots containing 250 µL of sonicated adult worms using high-performance liquid chromatography (HPLC) as previously described [24]. Aliquots (250 µL) of sonicated worms and supernatants were deproteinized by adding 20% trichloroacetic acid and reacted with 1 mL of thio-barbituric acid. MDA standards were prepared using 1,1,3,3-tetraethoxypropane. Analyses were conducted with an Alliance e2695 HPLC (Waters, Milford, MA, USA), C18 reverse phase column. The mobile phase was 70% 10 mM KH₂PO₄ buffer, pH 7.0, and 40% HPLC-grade methanol. Readings were obtained at 532 nm, following an 8 min isocratic flow at the rate of 1 mL/min. The results were expressed in nM MDA.

1.6. Determination of lipid droplet accumulation, mitochondrial membrane potential, autophagic vacuole formation, and membrane integrity in adult worms

Adult worms treated with Bio-AgNp were examined for various parameters using fluorescent labeling (Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, USA). First, worms were washed with PBS and incubated with Nile Red (NR) (10 µg/mL) to assessment lipid droplet formation [25], tetramethylrhodamine-ethyl ester (TMRE) (10 µg/mL) for assessment of mitochondrial membrane potential (ΔΨ_m) [26], and monodansylcadaverine (MDC) (10 µg/mL) for autophagic vacuoles

quantification [27]. Cell membrane integrity was analyzed by staining with PI for 15 min (2 µg/mL) [18]. After labeling, the worms were washed again. The analyses were measured on a fluorescence microplate reader (Victor X3, PerkinElmer), using emission/excitation wavelengths of 530/635 (NR); 480/580 (TMRE); 335/518 (MDC); and 480/580 (PI) nm.

1.7. In vivo toxicity assessment

Four-to six-week-old healthy BALB/c mice were randomized into four groups (n = 6 per group/3 males and 3 females) and treated orally (by gavage – 200 µL) with different doses of the compound for fifteen days. The groups consisted of: I) control (PBS); II) Bio-AgNp 0.25 mg/kg body weight (bw); III) Bio-AgNp 0.5 mg/kg bw; and IV) Bio-AgNp 1 mg/kg bw. Bio-AgNp was diluted in distilled water. All animals were weighed on days 0, 3, 6, 9, 12, and 15, and body weight changes were compared to day 0. Animals were euthanized 24 h post-treatment by intraperitoneal injection of a high dose of ketamine (180 mg/kg) and xylazine (26 mg/kg) followed by cervical dislocation. Animal care and handling procedures were following the guidelines and with the approval of the Ethics Committee on the Use of Animals of the State University of Londrina (Paraná, Brazil) (process number 21274.2018.62).

1.7.1. AST and ALT levels determination

Aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT) levels, were measured in the serum of the animals with a biochemical auto-analyzer (Dimension Dade AR Dade Behring, Deerfield, IL, USA), using Dade Behring® kits.

1.7.2. Nitric oxide (NO) levels

Plasma NO levels were estimated by measuring nitrite. Plasma supernatant (60 µL) was deproteinized in a ZnSO₄ solution (75 mM), followed by a NaOH solution (55 mM). The final supernatants were collected and diluted in glycine buffer (45 g/L). Cadmium granules stored in H₂SO₄ solution (100 mM) were added to CuSO₄ solution (5 mM) in glycine-NaOH buffer (15 g/L). Activated granules were added to glycine buffer-diluted supernatants, and gently vortexed for 10 min. Griess reagent (60 µL) was added, incubated for 10 min at room temperature, protected from light, and read on a plate reader (Thermo Scientific, Multiskan GO, USA) at 550 nm. Serial dilutions of NaNO₂ were used for quantification. Final results were expressed as µM nitrite.

1.7.3. Bioaccumulation of silver ions

Tissues (liver, kidney, and stomach) were washed with PBS immediately after removal. Tissues were completely dried at 60 °C and then subjected to acid digestion in nitric acid (5 N) (Merck) at 60 °C for 48 h. After digestion, silver concentration of the samples was analyzed through atomic absorption spectrophotometer coupled to a graphite furnace (AA 240FS, PerkinElmer, USA) against reference standard solutions.

1.7.4. Histopathological investigations

Liver fragments collected from the medial lobe were fixed in a 10% buffered formalin solution (pH 7.2), dehydrated, included in paraffin, sectioned into a microtome (SLEE CUT 4062), and stained with hematoxylin and eosin (H&E). The sections were examined by light microscopy (O400S Opticam) at a final magnification of 200×. It was determined: 1x = vacuolar degeneration; 1x = Kupffer cells hyperplasia; 1x = ductal hyperplasia; 1x = eosinophilic infiltrate; 1x = lymphocyte infiltrate; 3x = necrosis; and 2 = granuloma. For intensity: 0 = absent; 1 = mild, 2 = mild to moderate; 3 = moderate; 4 = moderate to severe, and 5 = severe.

1.8. In vivo infection model of schistosomiasis

Four-to six-week-old healthy BALB/c mice were randomly divided into four groups (n = 6 per group). Animals were infected by exposing the tail to a suspension containing 80 ± 5 *S. mansoni* cercariae. Infection was confirmed on day 45th post-infection (patent infection) using the spontaneous sedimentation technique. Treatment was started by oral gavage (200 µL) for 15 days. Group: I) infected-untreated control (PBS); II) vehicle control (2% DMSO - PZQ vehicle); III) PZQ (40 mg/kg bw); and IV) Bio-AgNp (0.5 mg/kg bw). All animals were weighed on days 30, 45, 50, 55, and 60 post-infection (p.i.), and body weight changes were compared to day 30. Serum AST and ALT and liver tissue NO levels were evaluated as described in 2.7.1 and 2.7.2, respectively.

1.8.1. Parasitological criteria assay

Different parasitologic parameters were evaluated and performed by different investigators. I) Measurement of relative organ weight (liver and spleen). II) Count of eggs in faeces on days 45, 52 and 60 p. i. by the quantitative Kato-Katz method. III) Number of worms recovered, estimated using the animal perfusion method. IV) Count of eggs in liver (oogram) after digestion in 5% KOH solution.

1.8.2. Myeloperoxidase (MPO) and N-acetylglucosaminidase (NAG) activity

MPO and NAG enzyme activities can indirectly assess local neutrophil and macrophage infiltration, respectively. Liver samples were collected in 50 mM K₂PO₄ buffer (50 mM, pH 6.0) containing 0.5% hexadecyltrimethylammonium bromide and stored at –80 °C until use. Frozen samples were homogenized using a tissue turrax. For MPO activity, the supernatants (15 µL) were mixed with phosphate buffer (50 mM), containing O-dianisidine dihydrochloride (0.167 mg/mL) and hydrogen peroxide (0.015%). For NAG activity, supernatants (10 µL) were mixed with K₂HPO₄ buffer (50 mM) containing 4-nitrophenyl-N-acetyl-b-D-glucosaminide and glycine buffer (0.2 M). Absorbance was measured using a spectrophotometer (Thermo Scientific, Multiskan GO, USA) to determine MPO (450 nm) and NAG (400 nm) activity. The MPO and NAG activities were compared to a standard curve of neutrophils and macrophages, respectively. Results were expressed as MPO (number of neutrophils/mg tissue) and NAG (number of macrophages/mg tissue) activity.

1.8.3. Cytokine measurement

Cytokine levels were assessed in the supernatant of the liver homogenates by Cytometric Beads Array (CBA) assay. A commercial kit (BD Bioscience, USA) was used to detect IFN-γ (0.5 pg/mL) and IL-4 (0.03 pg/mL). Data were collected in a BD Accuri C6 flow cytometer and analyzed using FCAP Array v3.0.1 software. TGF-β levels were determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) according to the instructions of the ELISA kit manufacturer (eBiosciences®, USA).

1.8.4. Histopathology, hepatic granuloma and collagen quantification

Liver tissue was processed and examined for histopathologic changes as described in section 2.7.4. The number and total area of granulomas were evaluated. The liver granulomas were also characterized as PE (pre-granulomatous exudative phase); NE (necrotic-exudative); EP (exudative-productive phase); and P (productive) [28]. For quantification of type I and III collagen fibers, liver sections were stained with Sirius red using the picosirius technique and examined under polarized light using a photomicroscope (Nikon Eclipse 80i) with a coupled camera (200 × final magnification).

Images were analyzed using Image-Pro Plus (version 4.5). Red fibers correspond to type I collagen and yellow/green to type III collagen.

1.9. Statistical analysis

Data were expressed as mean \pm standard error of the mean (SEM). Three independent experiments were performed, each with triplicate datasets. Significant differences between groups were determined by one-way and two-way ANOVA followed by Tukey's post-test for multiple comparisons. All analyses were performed with Prism 6.01 software (Graphpad Software, San Diego, CA). Differences were considered statistically significant at $p < 0.05$.

2. Results

2.1. Bio-AgNp exhibits direct schistosomicidal activity on NTS

The first step in the evaluation of schistosomicidal activity was the direct exposure of Bio-AgNp to *S. mansoni* schistosomula. Thus, concentrations of 0.5, 0.7, and 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ reduced 44.6% (± 5.9) ($p \leq 0.001$), 49.7% (± 1.7) ($p \leq 0.0001$), and 68.9% (± 4.3) ($p \leq 0.0001$) the viability, respectively. The highest concentrations (5 and 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) resulted in 100% parasite mortality ($p \leq 0.0001$) (Fig. 1A). The LC_{50} calculated against NTS was $0.84 \pm 0.11 \mu\text{g}/\text{mL}$ ($0.07 \mu\text{M}$) and $2 \times \text{LC}_{50}$ was $1.68 \mu\text{g}/\text{mL}$ ($0.14 \mu\text{M}$) (Fig. 1B). In

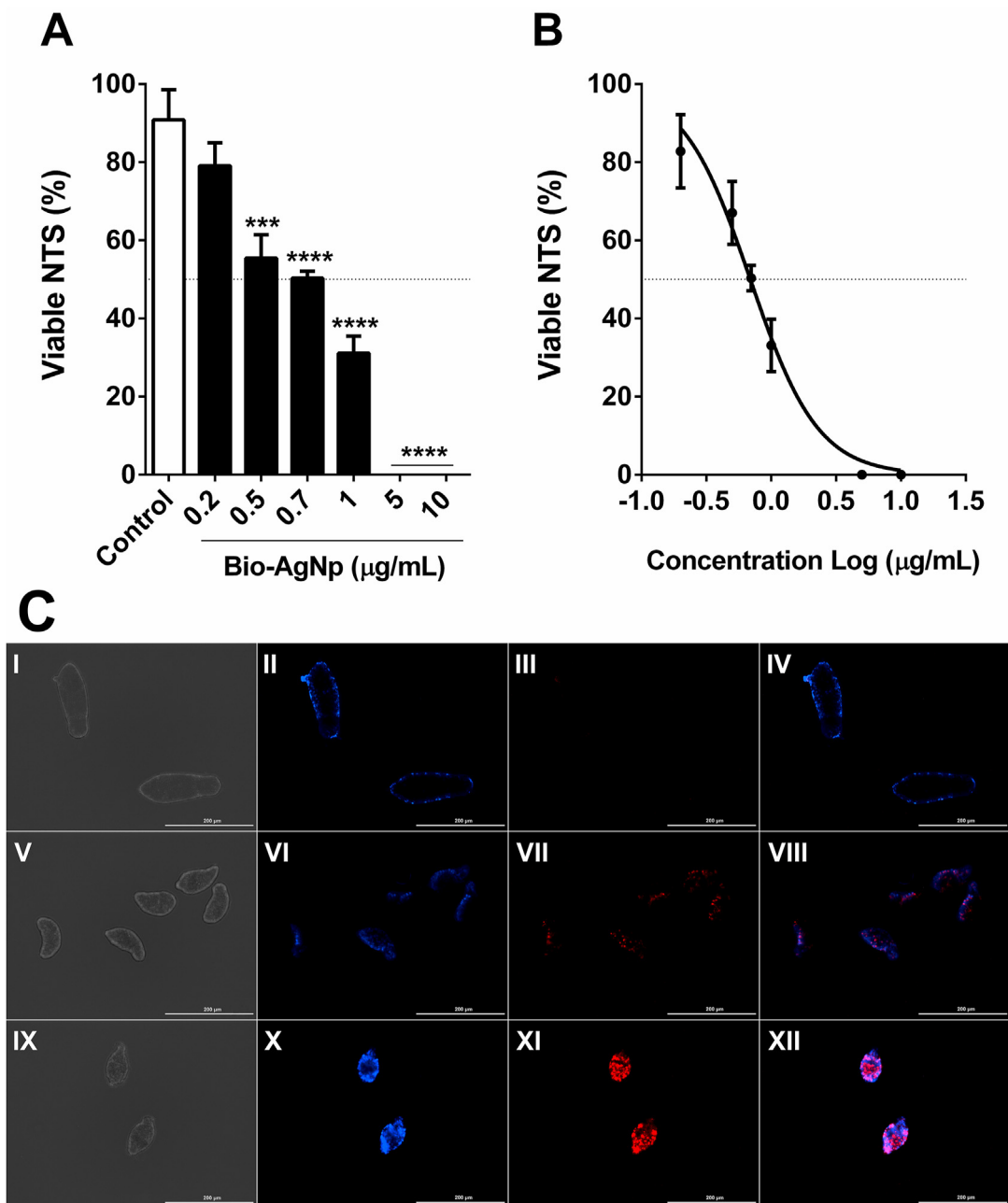


Fig. 1. Effect of Bio-AgNp on viability and membrane integrity of newly transformed schistosomula (NTS) of *Schistosoma mansoni*. NTS were incubated with different concentrations of Bio-AgNp (0.2, 0.5, 0.7, 1, 5, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for 24 h. The number of parasites was counted by Trypan blue exclusion staining (A). The lethal concentration for 50% parasites (LC_{50}) was calculated from a non-linear regression dose-response inhibition curve. The LC_{50} calculated was $0.84 \pm 0.11 \mu\text{g}/\text{mL}$ ($0.07 \mu\text{M}$) (B). Membrane integrity was determined by fluorescent labeling with propidium iodide, a DNA intercalator (red), while nucleic acids were labeled with 4',6-diamidino-2-phenylindole (blue). I-IV) Control; V-VIII) 0.84 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ($0.07 \mu\text{M}$) of Bio-AgNp; and IX-XII) 1.68 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ($0.14 \mu\text{M}$) of Bio-AgNp (C). Data are expressed as the mean \pm SEM of three independent experiments performed in triplicate. Significant difference from control, *** ($p \leq 0.001$), and **** ($p \leq 0.0001$). Scale bars: 200 μm .

addition, we evaluated whether the treatment-induced changes in cell membrane integrity. Untreated NTS showed an intact integument with no PI labeling (Fig. 1C I-IV). After treatment with LC₅₀, there was an increased PI signal, indicating size reduction, severe granularity and cell membrane disruption (Fig. 1C V-VIII), which was enhanced after exposure to 2× LC₅₀ (Fig. 1C IX-XII).

2.2. Bio-AgNp alters the motility of *Schistosoma mansoni* adult worms

Direct effect of Bio-AgNp on *S. mansoni* adult worms was evaluated by motility at concentrations ranging from 1 to 50 µg/mL after 2, 4, 6, 12, and 24 h of exposure (Fig. 2). From the first observation period (2 h), a reduction in worm movements was observed at concentrations from 5 to 50 µg/mL of Bio-AgNp. Paired worms showed delayed body movements from 5 to 20 µg/mL, males and females only at 5 µg/mL. Occasional head and tail movements were observed in paired worms (25 and 50 µg/mL) and isolated male (10–20 µg/mL) and female (10 and 15 µg/mL) worms. No body movement (death) was verified in paired worms; however, it was evaluated in males (25 and 50 µg/mL), and females (20–50 µg/mL).

After 4 h, paired worms showed delayed movements only at 5 µg/mL, minimal activity from 10 to 20 µg/mL, and did no movements at concentrations of 25 µg/mL. Unpaired couples were observed from 15 µg/mL, after 2 and 4 h of incubation, and after 6 h, all couples were unpaired at a concentration of 5 µg/mL (data not shown). Males showed minimal activity at 5 and 10 µg/mL and died at 15–50 µg/mL, while females presented minimal movements at 5–15 µg/mL and died at 20 µg/mL, as 2 h of exposure. After 6 and 12 h, both couples and male worms demonstrated score 1 from the concentration of 10 µg/mL, however, females died only at 15 µg/mL. Finally, after 24 h, couples and male worms exhibited no movements at concentrations from 5 to 50 µg/mL, while female worms from 10 to 50 µg/mL.

2.3. Bio-AgNp induces oxidative stress, mitochondrial membrane depolarization, formation of autophagic vacuoles and lipid droplets, and leads to loss of plasma membrane integrity

To further investigation of Bio-AgNp effects, we assessed the viability of *S. mansoni* adult worms by MTT assay. The viability was

reduced to 78.6% (±3.2), 67.0% (±2.2), and less than 50% at concentrations of 5, 10, and ≥15 µg/mL, respectively, after 24 h of exposure to Bio-AgNp ($p \leq 0.0001$) (Fig. 3A). Bio-AgNp provides an LC₅₀ value of 12.62 ± 0.02 µg/mL (1.17 µM) and 2× LC₅₀ of 25.20 µg/mL (2.34 µM) against *S. mansoni* adult worms (Fig. 3B). To assess the oxidative stress induced by Bio-AgNp exposure, we analyzed an increase in ROS production at both LC₅₀ and 2× LC₅₀ concentrations ($p \leq 0.01$) when compared to the control group (Fig. 3C). Similarly, there was a significant increase in nitric oxide levels ($p \leq 0.01$ and $p \leq 0.0001$, respectively), superoxide anion ($p \leq 0.0001$), and malondialdehyde production ($p < 0.05$) (Fig. 3D, E and F).

Adult worms were also assessed for different mechanisms after exposure to Bio-AgNp. Thus, treated worms significantly reduced the total intensity of TMRE fluorescence (staining that complex with active mitochondria), demonstrating depolarization of the mitochondrial membrane ($p < 0.05$) (Fig. 3G). We also evaluated autophagic vacuoles ($p \leq 0.001$) (Fig. 3H), and lipid droplet formation ($p \leq 0.01$) (Fig. 3I). Finally, PI staining was used to verify the integrity of the cell membrane of adult worms exposed to Bio-AgNp. Since PI it is not permeable to viable cells, its incorporation can be used to assess the parasite membrane. Our data showed that Bio-AgNp treatment significantly increased PI labeling compared to control ($p \leq 0.01$ and $p \leq 0.001$) (Fig. 3J).

2.4. Bio-AgNp promotes morphological changes in *Schistosoma mansoni* adult worms

For the assessment of morphological changes in *S. mansoni* adult worms, we used scanning electron microscopy. Negative control exhibited intact structures, with oral and ventral suckers, gynecophoral canal, and tegument preserved, with tubercles covered by spines and sensory papillae (Fig. 3K I-IV). After incubation with Bio-AgNp (LC₅₀), male worms showed important morphological changes, exhibiting body and oral/ventral sucker contraction (Fig. 3K V-VI). The same changes were observed in adult worms incubated at 2× LC₅₀ with additional contraction of the gynecophoral canal (Fig. 3K IX-X). Tegumental damage consisted of loss of spines in the tubercles with sloughing of the tegument and formation of blisters on the body surface (Fig. 3K VII-VIII). The same changes were more pronounced at the 2× LC₅₀ concentration of Bio-AgNp (Fig. 3K XI-XII).

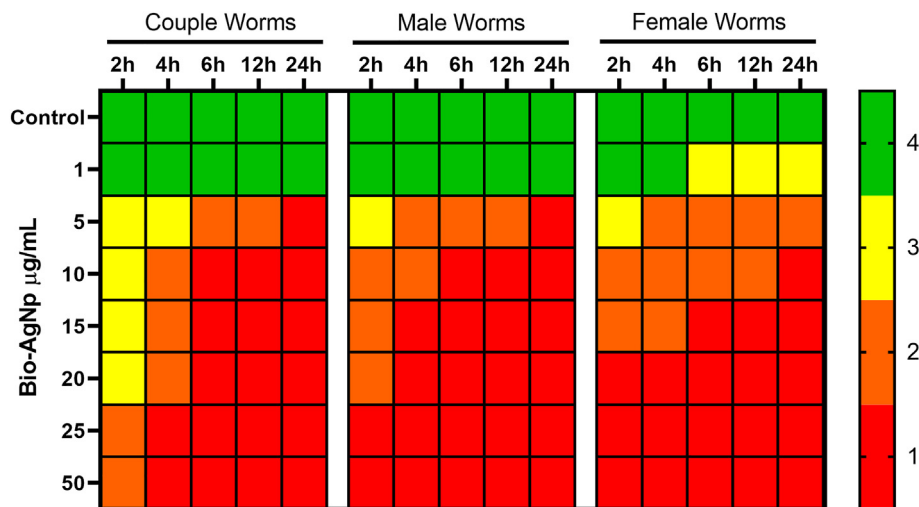


Fig. 2. Bio-AgNp effect on the motility of *Schistosoma mansoni* adult worms. Worms (pairs, male and female) were treated with Bio-AgNp (1, 5, 10, 15, 20, 25, and 50 µg/mL) and monitored after 2, 4, 6, 12, and 24 h of incubation. Motility and survival were assessed by visual inspection under an inverted microscope, according to the criteria of the viability scale adapted from Ramirez et al. (2007). Score criteria: 4) active worms with normal body movements; 3) slow worms with delayed body movements; 2) minimal activity, occasional head and tail movements; and 1) dead worms with a complete absence of movements.

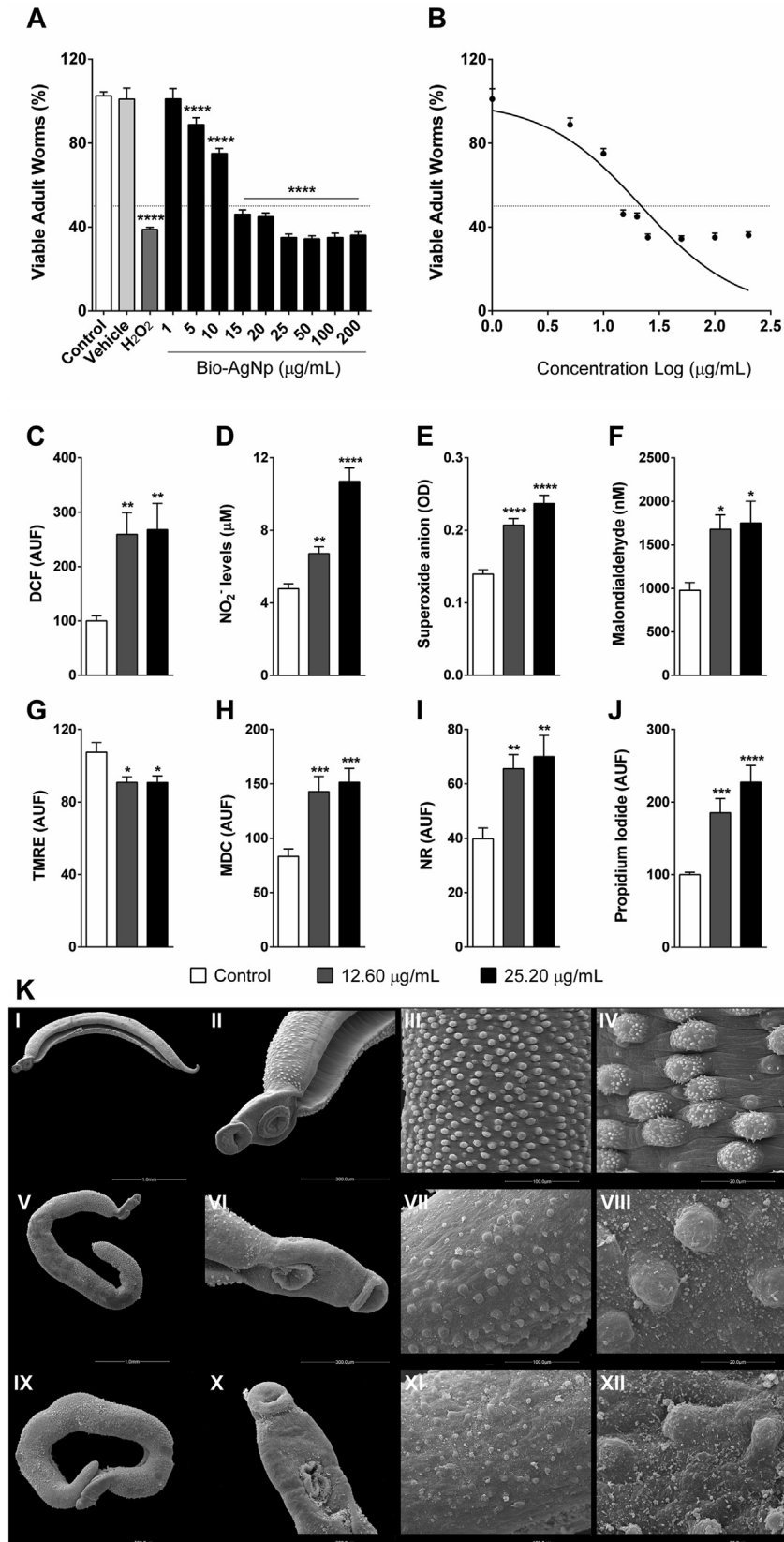


Fig. 3. Bio-AgNp alters viability, morphology, and induces oxidative stress in *Schistosoma mansoni* adult worms. Adult worms were incubated with different concentrations (1–200 µg/mL) of Bio-AgNp for 24 h, and viability was measured by MTT assay (A). The LC₅₀ value was calculated from a non-linear regression dose–response inhibition curve (B). Adult worms were incubated LC₅₀ (12.60 µg/mL) and 2× LC₅₀ (25.20 µg/mL) of Bio-AgNp for 24 h. Reactive oxygen species production (C), nitric oxide (D), superoxide anion (E), malondialdehyde (F), mitochondrial membrane potential (G), autophagic vacuole formation (H), lipid droplets (I), and plasma membrane integrity (J) were evaluated. Morphological evaluation was performed by scanning electron microscopy. I–IV) Control; V–VIII) 12.60 µg/mL (0.07 µM) of Bio-AgNp; and IX–XII) 25.20 µg/mL (2.34 µM) of Bio-AgNp (K). Data are

2.5. Bio-AgNp treatment does not cause significant toxicity in healthy animals

Analysis of Bio-AgNp revealed a diameter of 93.8 nm (± 6.8) and a zeta potential of -21.6 mV, indicating a stable nanoparticle (Supplementary Fig. 1). Knowing the potent *in vitro* schistosomicidal activity, we investigated the potential toxic effects of the oral treatment with Bio-AgNp. BALB/c mice were orally treated for 15 days with Bio-AgNp (0.25; 0.5; 1 mg/kg). There were no deaths in the experimental groups. Body weight changes in animals treated with doses of 0.25 and 0.5 mg/kg were similar to untreated animals; however, animals treated at 1 mg/kg failed to gain weight (Fig. 4A). Liver, kidney and stomach were used to determine silver bioaccumulation after Bio-AgNp treatment. No significant increase in the silver content was observed in any of the organs examined (Fig. 4B). No significant difference was found in the serum levels of NO and AST/ALT enzymes (Fig. 4C–E). Histological analysis of liver tissue showed a reduction in score at 0.5 mg/kg (Supplementary Table 1). Although not significant, changes were observed in animals treated with 1 mg/kg. Therefore, we chose the intermediate dose (0.5 mg/kg) for the following experiments.

2.6. Bio-AgNp treatment restores body weight, improves splenomegaly, and reduces parasite burden

When evaluating the effect of the treatments on *S. mansoni*-infected mice, untreated and vehicle-treated animals showed a significant reduction in weight compared to day 30 post-infection ($p \leq 0.001$). However, treated animals (PZQ and Bio-AgNp) did not show such a reduction, and by day 60 of infection, Bio-AgNp-treated animals showed less body change and a significant weight gain compared to the untreated infected control group ($p < 0.01$) (Fig. 5A). The protective effect of Bio-AgNp was also found to reduce liver and spleen weight when compared to the untreated infected control ($p < 0.05$) (Fig. 5B and C). Regarding the anthelmintic effect, Bio-AgNp reduced the parasitic load as indicated by a reduction of eggs per gram of feces on day 60 post-infection ($p \leq 0.001$) (Fig. 5D). In support of these data, Bio-AgNp induced a 46.3% (± 10.7) reduction in the number of perfused worms compared to the infected control ($p < 0.05$) (Fig. 5E). Regarding liver egg burden, Bio-AgNp treatment reduced the total number of eggs entrapped in the liver tissue to 52.8% (± 12.2) ($p < 0.05$) compared to the control group (Fig. 5F).

2.7. Bio-AgNp treatment ameliorates liver damage and reduces cellular infiltrates in liver of *Schistosoma mansoni*-infected mice

To investigate whether Bio-AgNp treatment prevents liver damage induced by *S. mansoni* infection, we evaluated serum levels of AST and ALT enzymes. Treatment did not alter AST levels (Fig. 5G). However, it significantly reduced ALT ($p < 0.05$), which was different from PZQ ($p \leq 0.001$). This showed that it was able to reduce liver damage more than the standard treatment (Fig. 5H). Regarding NO levels, no significant reduction was found compared to untreated control, but PZQ-treated animals showed elevated NO levels ($p \leq 0.001$), significantly different from Bio-AgNp-treated ($p < 0.05$) (Fig. 5I). In addition, NAG activity was significantly reduced compared to untreated infected control ($p \leq 0.01$) and PZQ-treated ($p < 0.05$). This indicates a reduction in local macrophages (Fig. 5J). Reduced MPO activity was also observed, indicating less neutrophil migration into the liver compared to the

control ($p < 0.05$) and PZQ-treated ($p \leq 0.0001$) groups (Fig. 5K). Regarding the histological changes in the liver tissue of Bio-AgNp-treated animals, a reduction in the score was observed compared to the control (Supplementary Table 2).

2.8. Bio-AgNp treatment induces a pro-inflammatory profile and reduces the number and area of granulomas, resulting in an exudative-productive profile

First, we investigated cytokine production in *S. mansoni*-infected treated mice. Bio-AgNp-treatment induced an increase in IFN- γ levels ($p \leq 0.001$) compared to the control, while PZQ significantly reduced them ($p < 0.05$). Animals receiving Bio-AgNp also showed a significant increase in IFN- γ compared to PZQ ($p \leq 0.0001$) (Fig. 6A). TGF- β and IL-4 did not differ significantly (Fig. 6B and C). The granulomatous reaction is the primary etiology of schistosomiasis. Thus, Bio-AgNp reduced the number ($p < 0.05$) (Fig. 6D) and the area of granulomas ($p \leq 0.01$) (Fig. 6E) compared to the control. Bio-AgNp-treated animals also exhibited more granulomas in the EP phase (72.5%) (Fig. 6F). No change in collagen was observed with any treatment (Fig. 6G and H).

3. Discussion

Schistosomiasis is a chronic and potentially lethal disease that causes significant morbidity and mortality in subtropical and tropical regions of the world. Despite this, forty years later, no therapeutic option other than PZQ has reached the market for the treatment of schistosomiasis [5]. Given the shortcomings of current treatments, there has been an increased search for new therapies covering all parasite forms and different stages of the disease.

Nanoparticles exhibit important biological and physicochemical properties that are promising for the development of antimicrobial and therapeutic agents. In the present study, green nanotechnology was applied, an option considered as clean, non-toxic and environmentally friendly. During Bio-AgNp production, purification steps retain only proteins essential for its extracellular biosynthesis, since treatment with supernatant alone cannot induce cell death [29]. The resulting solution contains nitrate reductase and anthraquinones, responsible for reducing Ag^+ to Ag^0 and the subsequent formation of silver nanoparticles [30,16].

Toxicity of nanoparticles depends on properties such as size, surface area and charge. Green nanotechnology resulted in nanoparticles of 93.8 nm and zeta potential of -21.6 mV. Larger nanoparticles are recognized as having a smaller contact surface area and lower silver ion release, promoting less toxic effects [31]. Biological nanoparticles also have a more uniform size distribution due to their stabilization by proteins involved in their synthesis, which protect the charge, maintain repulsion between particles, and prevent them from agglomerating [32,16].

In this context, Bio-AgNp shows promise for the development of new antischistosomal drugs. Data demonstrating that Bio-AgNp acts *in vitro* against NTS and adult worms of *S. mansoni* by affecting motility, viability, and ultrastructures. The effects also include an increase in oxidative stress, loss of mitochondrial membrane potential, accumulation of lipid bodies, and formation of autophagic vacuoles, resulting in the permeabilization of the plasma membrane. When analyzed *in vivo* results, Bio-AgNp oral treatment reduced hepatosplenomegaly, parasite burden, and cellular infiltrate and altered the hepatic granuloma of *S. mansoni*-infected mice.

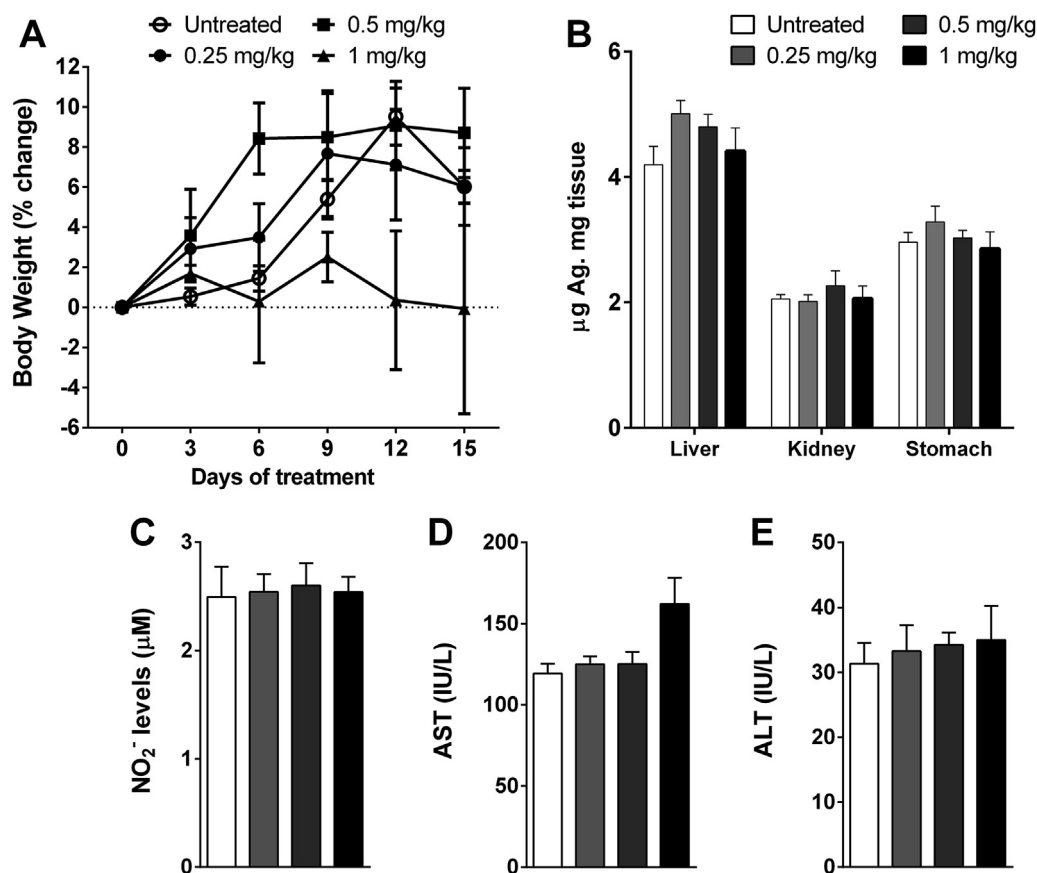


Fig. 4. Systemic, hepatic and gastric toxicity of Bio-AgNp in the experimental mouse model. BALB/c mice were treated orally with Bio-AgNp once a day, using a dose of 0.25; 0.5 and 1 mg/kg for 15 consecutive days. The body weight of Bio-AgNp treated mice was recorded on 0, 3, 6, 9, 12, and 15 days of treatment, and the changes were compared with day 0. (A). On day 16 post-treatment, each animal was humanely euthanized. Silver content was determined in liver, kidney and stomach (B). Serum levels of NO₂⁻ (C), AST (D) and ALT (E) were also determined. Data represent the mean ± SEM.

For schistosomicidal activity to be effective, the drug must promote schistosomula death, inhibit egg deposition, and cause death of adult worms [33]. During schistosomula migration, the ability to secrete immune modulators, and rapidly renew the integumentary membrane results in resistance to the immune response. Thus, the intense biochemical and physiological changes of schistosomulas represent the main phase of parasite elimination and inhibition of the biological cycle [34]. Bio-AgNp was effective in killing schistosomula by altering membrane integrity, demonstrating its potency in controlling the early stages of infection before egg-laying.

Once inside the mesenteric veins, adult *S. mansoni* worms are exposed to several stress conditions, which led them to develop antioxidant enzymes to survive in this hostile environment [35]. Therefore, an attractive approach for new treatment strategies for schistosomiasis is the induction of oxidative stress due to a decreased antioxidant system or increased production of reactive species [36]. Given this, our data showed that exposure to Bio-AgNp induced oxidative stress through increased total ROS and loss of mitochondrial membrane potential in adult worms.

Silver nanoparticles are known to have a high oxidation-reduction potential, resulting in strong microbicidal activity. This is achieved through direct interaction of the nanoparticle with the

cell membrane by electrostatic attraction or by interaction with sulfur and phosphorylated proteins present in the cell wall [37]. As a result, silver ions uncouple electron transport from oxidative phosphorylation, inhibit enzymes of the respiratory chain, and affect the permeability of the mitochondrial membrane, leading to its depolarization and subsequent increase in ROS, which disrupts the respiratory process and leads to cell death [38].

Adult worms present a phospholipid-enriched integument that allows host-parasite interaction and intravascular adaptation [39]. Our data showed an increase in lipid droplet formation and lipoperoxidation after Bio-AgNp treatment, indicating protein oxidation and lipid peroxidation. Regarding the autophagic process, it consists of a catabolic mechanism, essential for the maintenance of physiological processes [40]. However, when oxidative stress levels are exacerbated, it can lead to autophagic death [41]. Another mechanism induced by Bio-AgNp is alteration of membrane integrity, since AgNps are known to interact with thiol groups of L-cysteine [42].

Bio-AgNp exposure induced tegumental changes leading to blistering, a stress indicator [43]. Adult worms are characterized by a double membrane in the integument, which increases the area of nutrient absorption and avoid recognition by the host immune system. Thus, the primary antischistosomal target is the

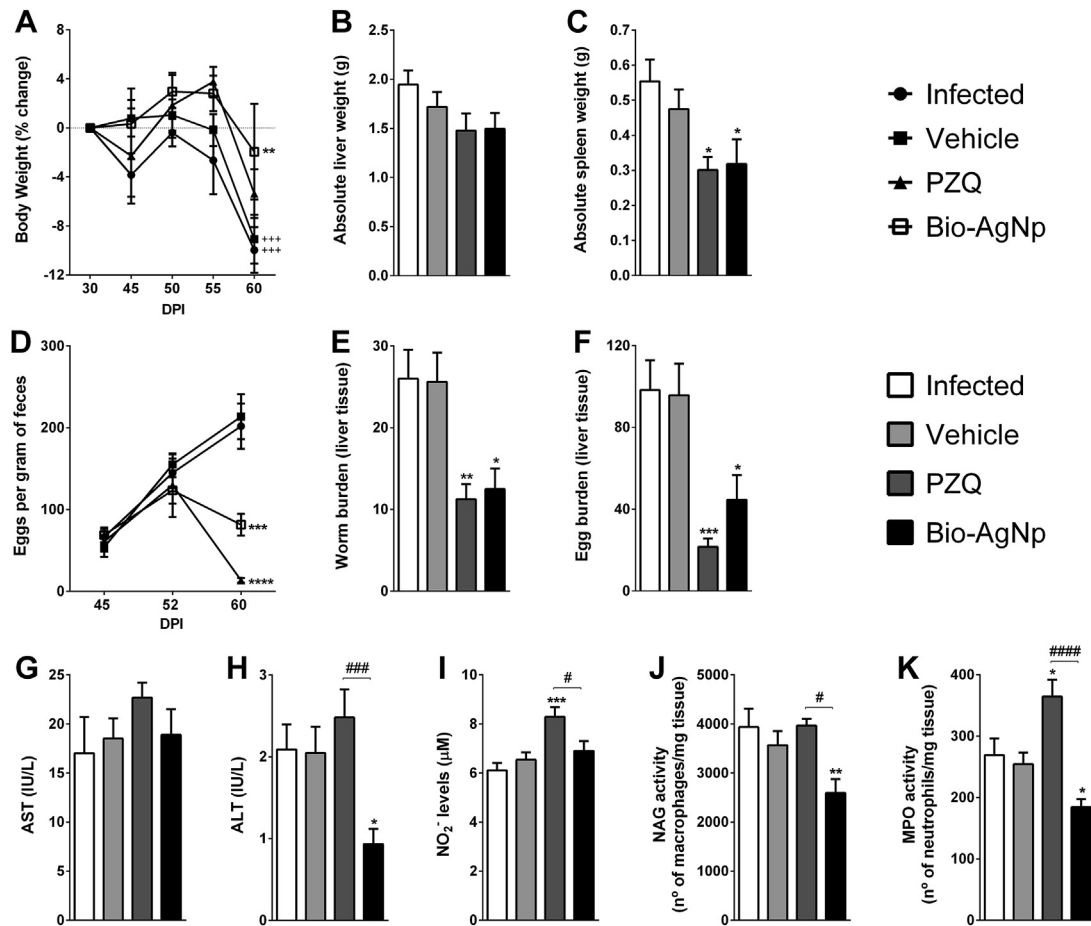


Fig. 5. Effect of Bio-AgNp on parasite burden and liver tissue changes in animals infected by *Schistosoma mansoni*. Bio-AgNp was administered orally at a dose of 0.5 mg/kg for 15 consecutive days. During treatment the animals were weighed on days 45, 50, 55 and 60 post-infection, and body weight changes were taken relative to day 30 (A). Absolute liver (B) and spleen weights (C) were measured. The number of eggs per gram of feces was determined by Kato-Katz method on days 45, 52 and 60 post-infection (D). After 24 h of the end of treatment, each animal was humanely euthanized, and worm burden was determined by perfusion of the hepatic portal system (E), while egg burden was determined by digestion of liver tissue (F). Serum levels of AST (G), ALT (H) and NO₂⁻ (I) were determined. NAG (J), and MPO (K) activities were evaluated in liver homogenates. DPI: days post infection, +++ (p ≤ 0.001). Significant difference from infected, * (p < 0.05), ** (p ≤ 0.01), *** (p ≤ 0.001), and **** (p ≤ 0.0001). Significant difference from 30 days post infection, +++ (p ≤ 0.001). Significant difference from PZQ, # (p < 0.05), ### (p ≤ 0.001), and #### (p ≤ 0.0001).

integument, which can expose the parasite and compromise its survival. Contraction of the oral and ventral suckers, important structures related to displacement, nutritional absorption and mechanoreception, was also observed [44].

Orally administered silver nanoparticles are known to be distributed to all organs, including liver, the usual site of *S. mansoni* worms in humans [45]. In general, the silver level in the organs is closely related to the Ag⁺ content of the AgNps suspension [46]. Thus, low doses of Bio-AgNp did not exhibit significant toxicity and reduces the number of eggs and recovery worms, showing that Bio-AgNp can be absorbed and reach mesenteric and hepatic veins, leading to decreases in worm survival and egg production. Low weight gain or loss in schistosomiasis is associated with enlargement of the organs due to egg deposition. Bio-AgNp also prevented weight loss and promoted a reduction in tissue weight.

During schistosome infection, there is initially a Th1-polarized pro-inflammatory response marked by IFN-γ production. However, the production of eggs is a milestone event in the schistosome

life cycle, where a switch to a Th2 occurs, resulting in the production of IL-4, IL-10, and IL-13 and a strong granulomatous reaction around the eggs, the major cause of schistosomiasis morbidity [47]. IFN-γ is the main negative regulator of fibrosis, inhibiting the production of extracellular matrix proteins and stimulating the synthesis of metalloproteases [48]. Thus, Bio-AgNp treatment, reversed Th2 response exacerbation, increasing IFN-γ levels. However, after PZQ treatment there is a decrease in IFN-γ, indicating that the regulatory mechanism of this cytokine is active and that the effectiveness of PZQ in reducing parasite load is important because it modifies the immune response [49].

In addition, the number of granulomas in the liver tissue was reduced, confirming the decrease in adult worm viability and impaired fecundity. The treatment was also able to change the granuloma size and composition, resulting in the exudative-productive phase. Such findings corroborate the reduction of NO, ALT, and NAG/MPO enzymes, demonstrating less liver damage and cellular infiltrate.

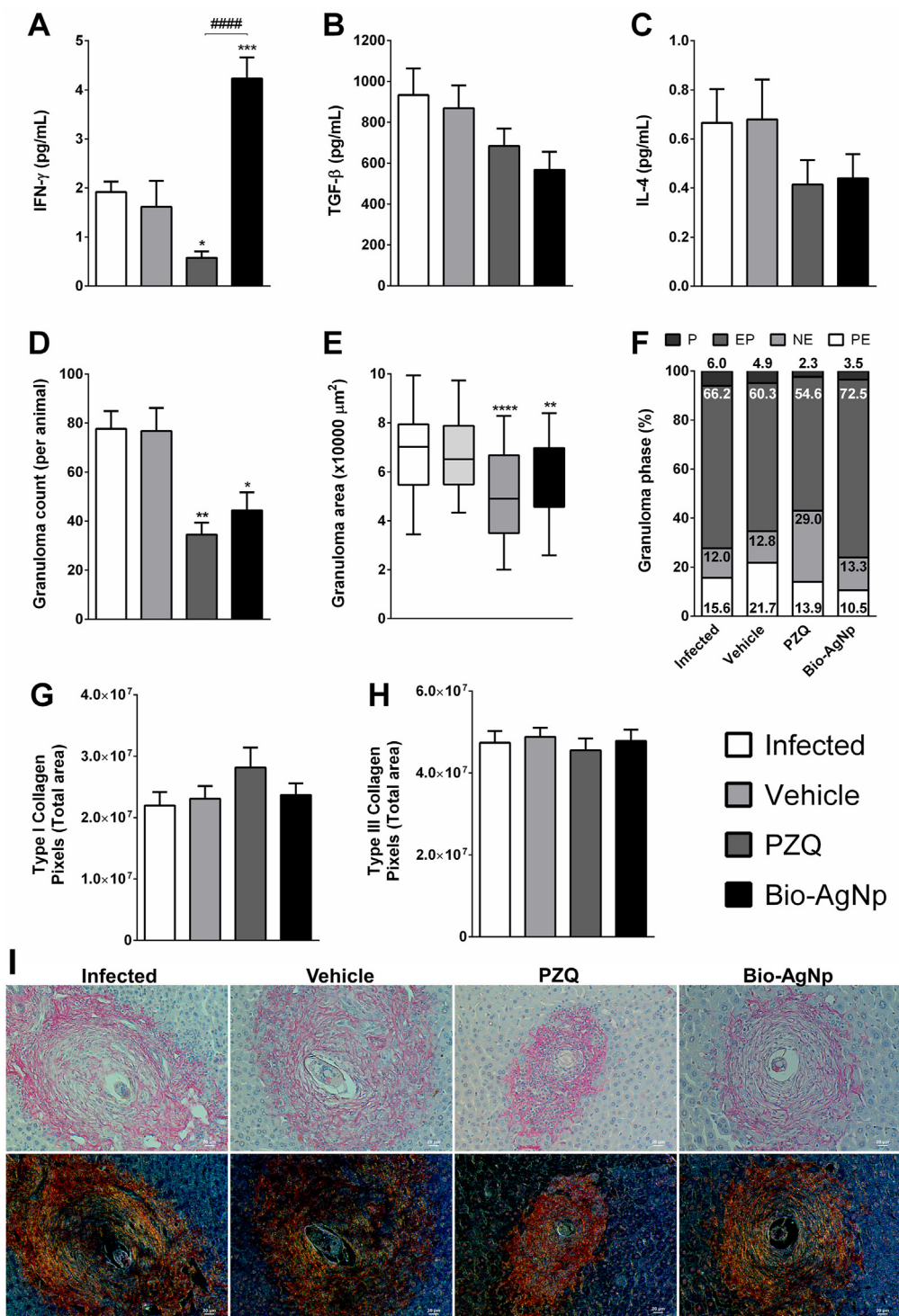


Fig. 6. Effect of Bio-AgNp treatment on cytokine production, granuloma number, size, and formation, and collagen deposition in the liver tissue of *Schistosoma mansoni*-infected BALB/c mice. On day 16 post-treatment, each animal was humanely euthanized and IFN- γ (A), TGF- β (B), and IL-4 (C) were determined in liver homogenates. Histological sections of liver tissue were subjected to Hematoxylin and Eosin staining to evaluate the granuloma number (D) total area (E), and phase (F). Sirius Red staining was used to quantify collagen type I (G) and type III (H) in liver sections, using Image-Pro Plus software. Representative figures of histologic sections of livers from *S. mansoni*-infected BALB/c mice (I). PE: pre-granulomatous exudative; NE: necrotic-exudative; EP: exudative-productive; and P: productive. Data represent the mean \pm SEM. Significant difference from infected, * ($p < 0.05$), ** ($p \leq 0.01$), *** ($p \leq 0.001$), and **** ($p \leq 0.0001$) Significant difference from PZQ, ##### ($p \leq 0.0001$).

In summary, in the schistosomiasis mansoni model, *in vitro* treatment with Bio-AgNp alter the viability and membrane integrity of juvenile forms, as well as promote oxidative stress and mitochondrial membrane depolarization in adult worms,

triggering the formation of lipid droplets and autophagic vacuoles. Oral administration of Bio-AgNp to *S. mansoni*-infected mice is also able to reduce parasite burden and associated pathology. In light of this, the results reported here provide initial studies on the use of

silver nanoparticles in the treatment of the disease and show promising approach for further investigation.

Funding

Not applicable.

Authors' contributions

Study design, manuscript writing, and review: MBD, BTSB, FTP, TFS, WRP, MMMS; experiment implementation: MBD, BTSB, FTP, VMC, MDÇ, TFS, LSFO, ACG, ACJR; figure production: MBD, BTSB, FTP, VMC, TFS, MMMS; data analysis: MBD, BTSB, FTP, TFS, WRP, MMMS; experiment support: MBD, BTSB, FTP, VMC, MDÇ, TFS, LSFO, ACG, ACJR, ACC, RLNM, APFRLB, AMRNM, ANCS, THE, RKTk, GN, INC, ICC, FJAO, WRP, MMMS.

Declaration of competing interest

The authors declare that there is no conflict of interest.

Acknowledgments

We gratefully acknowledge Dra. Pryscilla Fanini Wowk from the Laboratory of Molecular Virology, Carlos Chagas Institute (Fiocruz, Curitiba, Brazil) for assessing the distribution of the size of the particles, detected through the NTA software (NanoSight). This work was carried out with the support of the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, Brazil), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brazil), and State University of Londrina (Londrina, Brazil).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2023.105145>.

References

- McManus DP, Dunne DW, Sacko M, Utzinger J, Vennervald BJ, Zhou XN. Schistosomiasis. *Nat Rev Dis Prim* 2018;4:1–19. <https://doi.org/10.1038/s41572-018-0013-8>.
- WHO. Schistosomiasis: progress report 2001–2011, strategic plan 2012–2020. WHO; 2017.
- Colley DG, Bustinduy AL, Secor WE, King CH. Human schistosomiasis. *Lancet* 2014;383:2253–64. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)61949-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)61949-2).
- Caffrey CR. Schistosomiasis and its treatment. *Future Med Chem* 2015;7:675–6. <https://doi.org/10.4155/fmc.15.27>.
- Spangenberg T. Alternatives to praziquantel for the prevention and control of schistosomiasis. *ACS Infect Dis* 2021;7:939–42. https://doi.org/10.1021/ACSINFEDIS.0C00542/ASSET/IMAGES/LARGE/IDOC00542_0002.JPEG.
- Pinto-Almeida A, Mendes T, Oliveira R, Corrêa S. Morphological characteristics of schistosoma mansoni PZQ-resistant and -susceptible strains are different in presence of praziquantel. *Front Microbiol* 2016;7:594. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00594>.
- Gryseels B, Mbaye A, De Vlas SJ, Stelma FF, Guisse Â F, Van Lieshout L, et al. Are poor responses to praziquantel for the treatment of Schistosoma mansoni infections in Senegal due to resistance? An overview of the evidence n.d. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3156.2001.00811.x>.
- Alexander JW. History of the medical use of silver. *Surg Infect* 2009;10:289–92. <https://doi.org/10.1089/SUR.2008.9941>.
- Panáček A, Kolář M, Večeřová R, Prucek R, Soukupová J, Krystof V, et al. Antifungal activity of silver nanoparticles against Candida spp. *Biomaterials* 2009;30:6333–40. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.07.065>.
- Fanti JR, Tomiotto-Pellissier F, Miranda-Sapla MM, Cataneo AHD, Andrade CGT de J, Panis C, et al. Biogenic silver nanoparticles inducing Leishmania amazonensis promastigote and amastigote death in vitro. *Acta Trop* 2018;178:46–54. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.10.027>.
- Machado LF, Sanfelice RA, Bosqui LR, Assolini JP, Scandorieiro S, Navarro IT, et al. Biogenic silver nanoparticles reduce adherence, infection, and proliferation of toxoplasma gondii RH strain in HeLa cells without inflammatory mediators induction. *Exp Parasitol* 2020;211:107853. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2020.107853>.
- Moustafa MA, Mossalem HS, Sarhan RM, Abdel-Rahman AA, Hassan EM. The potential effects of silver and gold nanoparticles as molluscicides and cercaricides on Schistosoma mansoni. *Parasitol Res* 2018;117:3867–80. <https://doi.org/10.1007/s00436-018-6093-2>.
- Cheng Y, Chen X, Song W, Kong Z, Li P, Liu Y. Contribution of silver ions to the inhibition of infectivity of Schistosoma japonicum cercariae caused by silver nanoparticles. *Parasitology* 2013;140:617–25. <https://doi.org/10.1017/S0031182012002211>.
- Zhang XF, Liu ZG, Shen W, Gurunathan S. Silver nanoparticles: synthesis, characterization, properties, applications, and therapeutic approaches. *Int J Mol Sci* 2016;17:1534. <https://doi.org/10.3390/ijms17091534>.
- Durán N, Marcato PD, Durán M, Yadav A, Gade A, Rai M. Mechanistic aspects in the biogenic synthesis of extracellular metal nanoparticles by peptides, bacteria, fungi, and plants. *Appl Microbiol Biotechnol* 2011;90:1609–24. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3249-8>.
- Durán N, Marcato PD, Alves OL, De Souza GI, Esposito E. Mechanistic aspects of biosynthesis of silver nanoparticles by several Fusarium oxysporum strains. *J Nanobiotechnol* 2005;3:8. <https://doi.org/10.1186/1477-3155-3-8>.
- Ramalho-Pinto FJ, Gazzinelli G, Howells RE, Mota-Santos TA, Figueiredo EA, Pellegrino J. Schistosoma mansoni: defined system for stepwise transformation of cercaria to schistosomule in vitro. *Exp Parasitol* 1974;36:360–72. [https://doi.org/10.1016/0014-4894\(74\)90076-9](https://doi.org/10.1016/0014-4894(74)90076-9).
- Peak E, Chalmers IW, Hoffmann KF. Development and validation of a quantitative, high-throughput, fluorescent-based bioassay to detect schistosoma viability. *PLoS Neglected Trop Dis* 2010;4:e759. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000759>.
- Hagerty JR, Jolly ER. Heads or tails? Differential translational regulation in cercarial heads and tails of schistosome worms. *PLoS One* 2019;14:e0224358. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0224358>.
- Ramirez B, Bickle Q, Yousif F, Fakorede F, Mouries MA, Nwaka S. Schistosomes: challenges in compound screening. *Exp Opin Drug Discov* 2007;2. <https://doi.org/10.1517/17460441.2.S1.S53>.
- Comley JCW, Rees MJ, Turner CH, Jenkins DC. Colorimetric quantitation of filarial viability. *Int J Parasitol* 1989;19:77–83. [https://doi.org/10.1016/0020-7519\(89\)90024-6](https://doi.org/10.1016/0020-7519(89)90024-6).
- Corrêa Soares JBR, Menezes D, Vannier-Santos MA, Ferreira-Pereira A, Almeida GT, Venancio TM, et al. Interference with hemozoin formation represents an important mechanism of schistosomicidal action of antimalarial quinoline methanols. *PLoS Neglected Trop Dis* 2009;3:e477. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000477>.
- De Aguiar DP, Moscardini MBM, Morais ER, De Paula RG, Ferreira PM, Afonso A, et al. Curcumin generates oxidative stress and induces apoptosis in adult schistosoma mansoni worms. *PLoS One* 2016;11:e0167135. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0167135>.
- Victorino VJ, Panis C, Campos FC, Cayres RC, Colado-Simão AN, Oliveira SR, et al. Decreased oxidant profile and increased antioxidant capacity in naturally postmenopausal women. *Age* 2013;35:1411–21. <https://doi.org/10.1007/s11357-012-9431-9>.
- Sato H, Kusel JR, Thornhill J. Excretion of fluorescent substrates of mammalian multidrug resistance-associated protein (MRP) in the Schistosoma mansoni excretory system. *Parasitology* 2004;128:43–52. <https://doi.org/10.1017/S0031182003004177>.
- Preston S, Korhonen PK, Mouchiroud L, Cornaglia M, McGee SL, Young ND, et al. Deguelin exerts potent nematocidal activity via the mitochondrial respiratory chain. *Faseb J* 2017;31:4515–32. <https://doi.org/10.1096/fj.201700288R>.
- Al-Adhami BH, Noble C, Sharaf O, Thornhill J, Doenhoff MJ, Kusel JR. The role of acidic organelles in the development of schistosomula of Schistosoma mansoni and their response to signalling molecules. *Parasitology* 2005;130:309–22. <https://doi.org/10.1017/S0031182004006511>.
- Ahmad KB, Silva TP, Dias FF, Malta KK, Rosa FM, Costa-Neto SF, et al. Histological assessment of granulomas in natural and experimental Schistosoma mansoni infections using whole slide imaging. *PLoS One* 2017;12. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0184696>.
- Arruda da Silva Sanfelice R, Silva TF, Tomiotto-Pellissier F, Bortoleti Bt da S, Lazarin-Bidoia D, Scandorieiro S, et al. Biogenic silver nanoparticles reduce Toxoplasma gondii infection and proliferation in RAW 264.7 macrophages by inducing tumor necrosis factor-alpha and reactive oxygen species production in the cells. *Microb Infect* 2022;24:104971. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2022.104971>.
- Ahmad A, Mukherjee P, Senapati S, Mandal D, Khan MI, Kumar R, et al. Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles using the fungus Fusarium oxysporum. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2003;28:313–8. [https://doi.org/10.1016/S0927-7765\(02\)00174-1](https://doi.org/10.1016/S0927-7765(02)00174-1).
- Durán N, Durán M, de Jesus MB, Seabra AB, Fávoro WJ, Nakazato G. Silver nanoparticles: a new view on mechanistic aspects on antimicrobial activity. *Nanomed Nanotechnol Biol Med* 2016;12:789–99. <https://doi.org/10.1016/J.NANO.2015.11.016>.
- Birla SS, Gaikwad SC, Gade AK, Rai MK. Rapid synthesis of silver nanoparticles from Fusarium oxysporum by optimizing physicochemical conditions. *Sci World J* 2013;2013:12. <https://doi.org/10.1155/2013/796018>.
- de Oliveira RN, Rehder VLG, Santos Oliveira AS, Júnior ÍM, de Carvalho JE, de Ruiz ALTG, et al. Schistosoma mansoni: in vitro schistosomicidal activity of essential oil of Baccharis trimera (less) DC. *Exp Parasitol* 2012;132:135–43. <https://doi.org/10.1016/J.EXPPARA.2012.06.005>.
- Diaz Soria CL, Lee J, Chong T, Coghlan A, Tracey A, Young MD, et al. Single-cell atlas of the first intra-mammalian developmental stage of the human parasite

- Schistosoma mansoni*. Nat Commun 2020;11:1–16. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-20092-5>. 2020 111.
- [35] Loverde PT. Do antioxidants play a role in schistosome host-parasite interactions? Parasitol Today 1998;14:284–9. [https://doi.org/10.1016/S0169-4758\(98\)01261-7](https://doi.org/10.1016/S0169-4758(98)01261-7).
- [36] Sayed AA, Cook SK, Williams DL. Redox balance mechanisms in *Schistosoma mansoni* rely on peroxiredoxins and albumin and implicate peroxiredoxins as novel drug targets. J Biol Chem 2006;281:17001–10. <https://doi.org/10.1074/jbc.M512601200>.
- [37] Zorraquín-Peña I, Cueva C, Bartolomé B, Moreno-Arribas MV. Silver nanoparticles against foodborne bacteria. Effects at intestinal level and health limitations. Microorganisms 2020;8:132. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8010132>.
- [38] Durán N, Marcato PD, De Conti R, Alves OL, Costa FTM, Brocchi M. Potential use of silver nanoparticles on pathogenic bacteria, their toxicity and possible mechanisms of action. J Braz Chem Soc 2010;21:949–59.
- [39] Retra K, deWalick S, Schmitz M, Yazdanbakhsh M, Tielens AGM, Brouwers JFHM, et al. The tegumental surface membranes of *Schistosoma mansoni* are enriched in parasite-specific phospholipid species. Int J Parasitol 2015;45:629–36. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2015.03.011>.
- [40] Mizushima N. Autophagy: process and function. Genes Dev 2007;21:2861–73. <https://doi.org/10.1101/gad.1599207>.
- [41] Lee YH, Cheng FY, Chiu HW, Tsai JC, Fang CY, Chen CW, et al. Cytotoxicity, oxidative stress, apoptosis and the autophagic effects of silver nanoparticles in mouse embryonic fibroblasts. Biomaterials 2014;35:4706–15. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2014.02.021>.
- [42] Li WR, Xie XB, Shi QS, Zeng HY, Ou-Yang YS, Chen Y Ben. Antibacterial activity and mechanism of silver nanoparticles on *Escherichia coli*. Appl Microbiol Biotechnol 2010;85:1115–22. <https://doi.org/10.1007/S00253-009-2159-5/FIGURES/6>.
- [43] Jiraungkoorskul W, Sahaphong S, Sobhon P, Riengrojpitak S, Kangwanrangsan N. Effects of praziquantel and artesunate on the tegument of adult *Schistosoma mekongi* harboured in mice. Parasitol Int 2005;54:177–83. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2005.04.001>.
- [44] Hockley DJ. Ultrastructure of the tegument of schistosoma. Adv Parasitol 1973;11:233–305. [https://doi.org/10.1016/S0065-308X\(08\)60188-8](https://doi.org/10.1016/S0065-308X(08)60188-8).
- [45] Gaillet S, Rouanet J-M. Silver nanoparticles: their potential toxic effects after oral exposure and underlying mechanisms – a review. Food Chem Toxicol 2015;77:58–63. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2014.12.019>.
- [46] Van Der Zande M, Vandebriel RJ, Van Doren E, Kramer E, Herrera Rivera Z, Serrano-Rojero CS, et al. Distribution, elimination, and toxicity of silver nanoparticles and silver ions in rats after 28-day oral exposure. ACS Nano 2012;6:7427–42. <https://doi.org/10.1021/NN302649P>.
- [47] Pearce EJ, MacDonald AS. The immunobiology of schistosomiasis. Nat Rev Immunol 2002;2:499–511. <https://doi.org/10.1038/nri843>.
- [48] Henri S, Chevillard C, Mergani A, Paris P, Gaudart J, Camilla C, et al. Cytokine regulation of periportal fibrosis in humans infected with schistosoma mansoni: IFN- γ is associated with protection against fibrosis and TNF- α with aggravation of disease. J Immunol 2002;169:929–36. <https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.169.2.929>.
- [49] Martins-Leite P, Gazzinelli G, Alves-Oliveira LF, Gazzinelli A, Malaquias LCC, Correa-Oliveira R, et al. Effect of chemotherapy with praziquantel on the production of cytokines and morbidity associated with schistosomiasis mansoni. Antimicrob Agents Chemother 2008;52:2780–6. <https://doi.org/10.1128/AAC.00173-08>.

5. CONCLUSÃO

Neste trabalho, mostramos que o tratamento *in vitro* com AgNp-Bio, obtido extracelularmente a partir do fungo *F. oxysporum*, apresentou características de nanopartículas e boa estabilidade coloidal e atividade anti-helmíntica potente sobre esquistossômulos, bem como, sobre formas adultas de *S. mansoni* em baixas concentrações, resultando em redução da viabilidade, motilidade, alterações morfológicas tegumentares, aumento dos níveis de ROS, NO e MDA. Além disso, provocou disfunção mitocondrial, indução de autofagia e dano na membrana plasmática; efeitos essenciais para a indução de morte. No estudo *in vivo*, o tratamento com AgNp-Bio não provocou toxicidade hepática no período avaliado e foi capaz de reduzir a carga parasitária através da diminuição da perfusão de vermes adultos e da contagem de ovos retidos no fígado, reduzindo, conseqüentemente, os danos causados por estes parasitos. Baseado nessas descobertas, o trabalho forneceu uma aplicação de AgNp-Bio ao modelo de estudo da esquistossomose mansônica experimental, o qual poderia se tornar um potencial composto para o desenvolvimento/aprimoramento de novos fármacos para o tratamento desta doença.

1 6. ANEXOS

2

3 6.1 Anexo 1. Parecer CEUA-UEL



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

OF. CIRC. CEUA Nº 196/2018

Londrina, 28 de novembro de 2018.

Prezado (a) professor (a)

Certificamos que o projeto intitulado: "Avaliação da ação de microcápsulas contendo nanopartículas biogênicas de prata associadas ao calcipotriol no modelo experimental de esquistossomose mansônica" protocolo CEUA nº 21274.2018.62 sob a responsabilidade de Milena Menegazzo Miranda Sapla, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Londrina (CEUA/UEL), em reunião realizada em 27/11/2018.

Este projeto tem por objetivo avaliar a ação esquistossomicida da nanopartícula biogênica de prata (AgNp-bio) *in vitro* sobre esquistossômulos e vermes adultos de *S. mansoni* (cepa BH) e analisar a ação das AgNp-bio associadas ao calcipotriol no modelo *in vivo*, quanto à ação esquistossomicida, imunomoduladora e alterações hepáticas e histológicas. Grau de invasividade=3

Finalidade	() Ensino (x) Pesquisa científica
Vigência da autorização	28/11/2018 a 28/02/2020
Espécie/ linhagem/ raça	Camundongo isogênico/ BALB/c
Nº de animais	110
Peso/ Idade	25 gramas/ 4 a 6 semanas
Sexo	Machos e Fêmeas
Origem	Os animais solicitados serão provenientes do Biotério da FIOCRUZ de Curitiba
Amostras a serem coletadas	Plasma, Estômago, Intestino, Fígado, Cérebro, Baço, Rins, Ovários, Testículos

Cumpra-se orientar que caso pretendam-se quaisquer alterações no protocolo experimental aprovado, deve-se submeter o novo protocolo à apreciação da CEUA/UEL anteriormente à execução das modificações.

Coloco-me à disposição para quaisquer esclarecimentos que se fizerem necessários. Sem mais para o momento, subscrevo, cordialmente.

Maria Fernanda R. Graciano
 Profa. Dra. Maria Fernanda Rodrigues Graciano
 Coordenadora da CEUA/UEL

Ilmo.(a) Sr.(a)
Prof. (a) Dr (a). Milena Menegazzo Miranda Sapla
 Responsável pelo projeto
 Departamento de Ciências Patológicas/CCB

P
 C/C para a Chefia do Depto de Ciências Patológicas/CCB
 C/C para a Direção de Centro do CCB