

Ministério da Saúde

Fundação Oswaldo Cruz

Centro de Pesquisas René Rachou

Curso de Pós-Graduação em Ciências da Saúde

*Avaliação do efeito de drogas esquistossomicidas sobre a fase intramolusco do
Schistosoma mansoni*

Ana Carolina Alves de Mattos

Dissertação apresentada com vistas à obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde na área de Doenças Infecciosas e Parasitárias.

Orientador: Dr. Paulo Marcos Zech Coelho

Março

2006

Fundação Oswaldo Cruz

Centro de Pesquisas René Rachou

Curso de Pós-Graduação em Ciências da Saúde

Esta Dissertação intitulada:

*Avaliação do efeito de drogas esquistossomicidas sobre a fase intramolusco do
Schistosoma mansoni*

apresentada por

Ana Carolina Alves de Mattos

Foi avaliada pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Dr. _____

Paulo Marcos Zech Coelho

Prof. Dr. _____

Zilton de Araújo Andrade

Prof. Dr. _____

Marcos Pezzi Guimarães

Dissertação defendida em 31 de março 2006

Catálogo-na-fonte
Rede de Bibliotecas da FIOCRUZ
Biblioteca do CPqRR
Segemar Oliveira Magalhães CRB/6 1975

M435a Mattos, Ana Carolina Alves de.
2006

Avaliação do efeito de drogas esquistossomicidas sobre a fase intramolusco do *Schistosoma mansoni* / Ana Carolina Alves de Mattos. – Belo Horizonte, 2006.

xviii, 91 f.: il; 29,7 x 21,0 cm.

Bibliografia: f. 81-91

Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Fundação Oswaldo Cruz/Centro de Pesquisas René Rachou/Área de concentração: Doenças Infecciosas e Parasitárias

Schistosoma mansoni 2. Fase intramolusco 3. drogas esquistossomicidas I. Título. II. Coelho, Paulo Marcos Zech (Orientador).

CDD – 22. ed. – 616.963

Dedico este trabalho aos meus queridos pais, Sérgio e Nilza, exemplos de carinho e dedicação, pelo incentivo. Ao Bruno, meu incentivador e

Agradecimentos

Ao meu orientador, Dr. Paulo Marcos, pelos ensinamentos, atenção, paciência e confiança em mim depositada. Obrigada pelos ótimos momentos de conversa.

Ao querido Dr. John Kusel, pela oportunidade de trabalhar ao seu lado. Obrigada pelos ensinamentos, amizade e incentivo, e pelos ótimos momentos de convivência. Você é uma pessoa especial.

Ao Dr. Paulo Filemom Pimenta e à Dra. Nágila Secundino, pela colaboração imprescindível na reta final deste trabalho.

Ao Dr. Naftale Katz, pela oportunidade de aprender e trabalhar no Laboratório de Esquistossomose.

À Delza, Dílcia, Sueleny e Liana, pelos ensinamentos e pelas agradáveis horas de trabalho e convivência. Vocês foram fundamentais na execução deste trabalho.

Ao Dr. Luciano Andrade Moreira, pelos inúmeros empréstimos da máquina fotográfica.

À Dra. Diana Bahia e à estudante Lívia das Graças Avelar, pelos ensinamentos no cultivo dos esporocistos.

À Neusa Araújo, pela amizade, pelas conversas e enorme ajuda na perfusão dos camundongos.

Aos amigos do Laboratório de Esquistossomose: Ana Karine, Áureo, Daniela, Fábio, Gardênia, Luís André, Priscila, Rodrigo, Symone, Vandinha, Vanessa Borges e D. Vera, pela ótima convivência durante estes anos, pela amizade e ajuda.

À Vanessa Lopes, pela dedicação e presteza, pronta a ajudar sempre que necessário.

A todos do Laboratório de Entomologia Médica do CPqRR, em especial a Cris e a Tati, pela ajuda nas análises de microscopia laser confocal. Ao Gustavo, pela paciência e ajuda na formatação das imagens.

À estatística Anna Carolina Lustosa, pela paciência e boa vontade.

À Fabrícia Alvisi, minha grande amiga, pelo companheirismo e pelos momentos agradáveis de convivência. Obrigada pela ajuda, correções e sugestões. Você faz muita falta.

Aos amigos do Laboratório de Pesquisas Clínicas, em especial à Fernanda, pela ajuda na formatação deste trabalho, pela amizade e pelos ótimos momentos de descontração.

Às amigas: Ana Bahia, Ana Thereza, Luciene, Paola e Pollanah, pela amizade, incentivo e pelos importantes e agradáveis momentos de conversa.

A todos os amigos do Curso de Pós-Graduação do CPqRR/FIOCRUZ.

Aos Coordenadores e funcionários do Programa de Pós-Graduação, pela acessibilidade e presteza.

À Equipe do Biotério, Central de Esterilização e ao Segemar, pela ajuda e colaboração sempre que necessário.

À minha irmã Antonietta e ao meu cunhado Sérgio, pelos momentos de descontração.

A Deus, afinal, sem Ele nada é possível.

A vocês que, de alguma forma, estiveram ao meu lado, obrigada pelo incentivo, torcida, carinho e contribuição neste momento de realização em minha vida.

“Não existem erros, apenas lições. O crescimento é um processo de tentativa e erro: experimentação. As experiências que não deram certo fazem parte do processo, assim como as bem-sucedidas. As respostas estão dentro de você. Tudo o que tem a fazer é analisar, ouvir e acreditar.”

(Albert Einstein)

"Nunca ande pelo caminho traçado, pois ele conduz somente até onde os outros já foram."

(Alexandre Graham Bell)

Sumário

<u>1</u>	<u>Introdução.....</u>	<u>20</u>
1.1.	<u>Esquistossomose.....</u>	<u>20</u>
1.2.	<u>Oxamniquina.....</u>	<u>24</u>
1.3.	<u>Praziquantel.....</u>	<u>25</u>
1.4.	<u>Ação de diferentes drogas sobre a fase intramolusco do parasito.....</u>	<u>27</u>
1.5.	<u>Associação oxamniquina e praziquantel.....</u>	<u>30</u>
1.6.	<u>Resistência ao praziquantel.....</u>	<u>31</u>
<u>2</u>	<u>Objetivo.....</u>	<u>33</u>
2.1.	<u>Objetivo geral.....</u>	<u>33</u>
2.2.	<u>Objetivos específicos.....</u>	<u>33</u>
<u>3</u>	<u>Materiais e Métodos.....</u>	<u>34</u>
3.1.	<u>Avaliação do efeito das drogas PZQ e OXA na fase intramolusco do parasito.....</u>	<u>34</u>
3.1.1.	<u>Caramujos e parasitos.....</u>	<u>34</u>
3.1.2.	<u>Infecção dos caramujos.....</u>	<u>34</u>
3.1.3.	<u>Tratamento experimental.....</u>	<u>34</u>
3.1.4.	<u>Avaliação da eliminação de cercárias.....</u>	<u>36</u>
3.2.	<u>Experimentos “in vitro”.....</u>	<u>37</u>
3.2.1.	<u>Obtenção e transformação “in vitro” de miracídios em esporocistos primários.....</u>	<u>37</u>
3.2.2.	<u>Marcação dos parasitos com sondas fluorescentes.....</u>	<u>38</u>
3.2.3.	<u>Experimento 1 – Avaliação da ação do PZQ sobre esporocistos transformados “in vitro”.....</u>	<u>39</u>
3.2.4.	<u>Experimento 2 – Avaliação do efeito do PZQ sobre a membrana de esporocistos transformados “in vitro”.....</u>	<u>40</u>
3.2.5.	<u>Experimento 3 – Avaliação da presença de lisossomos em esporocistos e da ação do PZQ sobre essas organelas ácidas.....</u>	<u>40</u>
3.2.6.	<u>Fluorescência (Microscopia de Fluorescência e Laser Confocal).....</u>	<u>41</u>
3.2.7.	<u>Preparo e leitura das lâminas.....</u>	<u>41</u>
3.2.8.	<u>Imagens fotográficas.....</u>	<u>42</u>
3.3.	<u>Avaliação da suscetibilidade do S. mansoni ao PZQ após vários tratamentos na fase intramolusco.....</u>	<u>42</u>
3.3.1.	<u>Primeira Etapa.....</u>	<u>42</u>
3.3.2.	<u>Segunda Etapa.....</u>	<u>43</u>
3.4.	<u>Análise Estatística.....</u>	<u>45</u>

<u>4 Resultados.....</u>	<u>47</u>
<u>4.1. Avaliação do efeito das drogas PZQ e OXA na fase intramolusco do parasito.....</u>	<u>47</u>
<u>4.2. Experimentos “in vitro”.....</u>	<u>58</u>
<u>4.2.1. Experimento 1 – Avaliação da ação do PZQ sobre esporocistos transformados</u> <u>“in vitro”.....</u>	<u>58</u>
<u>4.2.2. Experimento 2 – Avaliação do efeito do PZQ sobre a membrana de esporocistos</u> <u>transformados “in vitro”</u>	<u>58</u>
<u>4.2.3. Experimento 3 – Avaliação da presença de vesículas ácidas semelhantes a</u> <u>lisossomos em esporocistos e do efeito do PZQ sobre essas organelas ácidas.....</u>	<u>61</u>
<u>4.3. Avaliação da suscetibilidade do S. mansoni ao PZQ após vários tratamentos na</u> <u>fase intramolusco.....</u>	<u>62</u>
<u>4.3.1. Reprodutibilidade dos experimentos.....</u>	<u>66</u>
<u>5 Discussão.....</u>	<u>70</u>
<u>6 Conclusões.....</u>	<u>79</u>
<u>7 Referências bibliográficas.....</u>	<u>81</u>

Lista de Quadros

Quadro 1 - Grupos experimentais e tratamentos.....	36
Quadro 2 - Esquemas terapêuticos.....	44

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Número de vermes vivos recuperados após perfusão das veias mesentéricas e do fígado de camundongos infectados com 25 cercárias das cepas LE e LE – PZQ de <i>S. mansoni</i> e tratados com diferentes dosagens de PZQ, trinta dias após o tratamento.....	63
Tabela 2 - Número de vermes vivos recuperados após perfusão das veias mesentéricas e do fígado de camundongos infectados com 25 cercárias das cepas LE e LE – PZQ de <i>S. mansoni</i> e tratados com diferentes dosagens de PZQ, trinta dias após o tratamento.....	65
Tabela 3 - Número de vermes vivos recuperados após perfusão das veias mesentéricas e do fígado de camundongos infectados com 25 cercárias das cepas LE e LE – PZQ de <i>S. mansoni</i> e tratados com diferentes dosagens de PZQ, trinta dias após o tratamento.....	68

Lista de Figuras

Figura 1 - Desenvolvimento do <i>S. mansoni</i> -fase intramolusco (Jannotti-Passos, 1998)	23
Figura 2 - Ciclo evolutivo do <i>S. mansoni</i>	23
Figura 3 - Avaliação da ação do PZQ sobre os esporocistos transformados "in vitro". (A) esporocisto não exposto ao PZQ; morfologia normal. A seta indica a perda da placa ciliar. (B) esporocisto exposto a 5µg/mL de PZQ. (C) esporocisto exposto a 10µg/mL de PZQ; nítida contração e alteração no formato do parasito. Imagens visualizadas em microscopia óptica comum. Barras = 20µm.....	58
Figura 4 - Avaliação da ação do PZQ sobre a membrana de esporocistos transformados "in vitro". (A – C) parasitos marcados com Hoechst 33258. Imagens visualizadas por microscopia de fluorescência. (A) esporocisto controle; (B e C) esporocistos expostos a 5µg/mL e 10µg/mL de PZQ, respectivamente. É possível verificar leve marcação no controle e um aumento na fluorescência naqueles expostos à droga. (D - I) esporocistos marcados com lectina de Glicine max. (D e E) parasitos controles; (F e G) esporocistos expostos a 5µg/mL de PZQ; (H e I) esporocistos expostos a 10µg/mL de PZQ. A marcação com a sonda só é visível nos esporocistos expostos à droga. Imagens geradas por microscopia laser confocal. Barras = 20µm.....	60
Figura 5 - Avaliação da presença de organelas ácidas semelhantes a lisossomos em esporocistos transformados "in vitro" e do efeito do PZQ sobre essas organelas. (A e B) esporocistos marcados com 5µL de LysoTracker Red e não expostos ao PZQ; presença de algumas vesículas ácidas; (C e D) esporocistos marcados com LysoTracker Red e expostos a 5µg/mL de PZQ; (E e F) esporocistos marcados com LysoTracker Red e expostos a 10µg/mL de PZQ. Presença de uma maior área marcada. Imagens geradas por microscopia laser confocal. Barras: A, C, E e F = 20µm; B e D = 10µm.....	62
Figura 6 - Gráficos representativos da reprodutibilidade dos experimentos 1 e 2. Comparação do número de vermes recuperados entre os grupos controles infectados com cercárias LE (A); grupos controles infectados com cercárias LE – PZQ (B); grupos infectados com cercárias LE tratados com 200mg/Kg de PZQ (C); grupos infectados com cercárias LE - PZQ tratados com 200mg/Kg de PZQ (D); grupos infectados com cercárias LE tratados com 400mg/Kg de PZQ (E); grupos infectados com cercárias LE - PZQ tratados com 400mg/Kg de PZQ (F); grupos infectados com cercárias LE tratados com 800mg/Kg de PZQ (G); grupos infectados com cercárias LE - PZQ tratados com 800mg/Kg de PZQ (H).....	67

Lista de Gráficos

Gráfico 1 - Gráfico referente às médias de cercárias eliminadas e ao desvio padrão nos nove exames realizados no 1º experimento (período pré-patente) para avaliação do efeito das drogas na fase intramolusco do parasito. I: caramujos infectados e não tratados; IOR: caramujos infectados e tratados com 500mg/Kg de OXA; IPR: caramujos infectados e tratados com 1000mg/Kg de PZQ.	48
Gráfico 2 - Cinética da mortalidade dos caramujos pertencentes ao 1º experimento. I: caramujos infectados e não tratados; IOR: caramujos infectados e tratados com 500mg/Kg de OXA; IPR: caramujos infectados e tratados com 1000mg/Kg de PZQ; N: caramujos não infectados e não tratados; NOR: caramujos não infectados e tratados com 500mg/Kg de OXA; NPR: caramujos não infectados e tratados com 1000mg/Kg de PZQ.....	49
Gráfico 3 - Gráfico referente às médias de cercárias eliminadas e ao desvio padrão nos seis exames realizados no 2º experimento (período pré-patente) para avaliação do efeito das drogas na fase intramolusco do parasito. I: caramujos infectados e não tratados; IT: caramujos infectados e tratados uma vez com 250mg/Kg de OXA + 500mg/Kg de PZQ.	50
Gráfico 4 - Cinética da mortalidade dos caramujos pertencentes ao 2º experimento. I: caramujos infectados e não tratados; IT: caramujos infectados e tratados com 250mg/Kg de OXA + 500mg/Kg de PZQ; N: caramujos não infectados e não tratados; NT: caramujos não infectados e tratados com 250mg/Kg de OXA + 500mg/Kg de PZQ.....	51
Gráfico 5 - Gráfico referente às médias de cercárias eliminadas e ao desvio padrão nos nove exames realizados no 3º experimento (período pré-patente) para avaliação do efeito das drogas na fase intramolusco do parasito. I: caramujos infectados e não tratados; IT: caramujos infectados e tratados duas vezes com 250mg/Kg de OXA + 500mg/Kg de PZQ.	51
Gráfico 6 - Cinética da mortalidade dos caramujos pertencentes ao 3º experimento. I: caramujos infectados e não tratados; IT: caramujos infectados e tratados com 250mg/Kg de OXA + 500mg/Kg de PZQ; N: caramujos não infectados e não tratados; NT: caramujos não infectados e tratados com 250mg/Kg de OXA + 500mg/Kg de PZQ.....	52
Gráfico 7 - Gráfico referente às médias de cercárias eliminadas e ao desvio padrão nos quatro exames realizados no 4º experimento (período patente) para avaliação do efeito das drogas na fase intramolusco do parasito. I: caramujos infectados e não tratados; IOR: caramujos infectados e tratados com 500mg/Kg de OXA; IPR: caramujos infectados e tratados com 1000mg/Kg de PZQ.	53
Gráfico 8 - Cinética da mortalidade dos caramujos pertencentes ao 4º experimento. I: caramujos infectados e não tratados; IOR: caramujos infectados e tratados com 500mg/Kg de	

OXA; IPR: caramujos infectados e tratados com 1000mg/Kg de PZQ; N: caramujos não infectados e não tratados; NOR: caramujos não infectados e tratados com 500mg/Kg de OXA; NPR: caramujos não infectados e tratados com 1000mg/Kg de PZQ.....	54
Gráfico 9 - Gráfico referente às médias de cercárias eliminadas e ao desvio padrão nos cinco exames realizados no 5º experimento (período patente) para avaliação do efeito das drogas na fase intramolusco do parasito. I: caramujos infectados e não tratados; IT: caramujos infectados e tratados uma vez com 250mg/Kg de OXA + 500mg/Kg de PZQ.	55
Gráfico 10 - Cinética da mortalidade dos caramujos pertencentes ao 5º experimento. I: caramujos infectados e não tratados; IT: caramujos infectados e tratados com 250mg/Kg de OXA + 500mg/Kg de PZQ; N: caramujos não infectados e não tratados; NT: caramujos não infectados e tratados com 250mg/Kg de OXA + 500mg/Kg de PZQ.....	56
Gráfico 11 - Gráfico referente às médias de cercárias eliminadas e ao desvio padrão nos cinco exames realizados no 6º experimento (período patente) para avaliação do efeito das drogas na fase intramolusco do parasito. I: caramujos infectados e não tratados; IT: caramujos infectados e tratados duas vezes com 250mg/Kg de OXA + 500mg/Kg de PZQ.	57
Gráfico 12 - Cinética da mortalidade dos caramujos pertencentes ao 6º experimento. I: caramujos infectados e não tratados; IT: caramujos infectados e tratados com 250mg/Kg de OXA + 500mg/Kg de PZQ; N: caramujos não infectados e não tratados; NT: caramujos não infectados e tratados com 250mg/Kg de OXA + 500mg/Kg de PZQ.....	58
Gráfico 13 - Gráfico de dispersão do número total de vermes vivos recuperados por animal dos grupos controles e experimentais e suas respectivas medianas () referentes ao experimento 1.....	64
Gráfico 14 - Gráfico de dispersão do número total de vermes vivos recuperados por animal dos grupos controles e experimentais e suas respectivas medianas () referentes ao experimento 2.....	66
Gráfico 15 - Gráfico de dispersão do número total de vermes vivos recuperados por animal dos grupos controles e experimentais e suas respectivas medianas () referentes ao experimento passagem 1. * p<0,005 estatisticamente diferente do grupo 1 (LE – controle/400mg/Kg).....	69

Lista de Abreviaturas

OXA – oxamniquina

PZQ – praziquantel

ED₅₀ – dose efetiva para matar 50% dos vermes

IOR – caramujos infectados e tratados com OXA

IPR – caramujos infectados e tratados com PZQ

NOR – caramujos não expostos aos miracídios e tratados com OXA

NPR – caramujos não expostos aos miracídios e tratados com PZQ

IT – caramujos infectados e tratados com associação de OXA + PZQ

NT – caramujos não expostos aos miracídios e tratados com associação de OXA + PZQ

N – caramujos não expostos aos miracídios e não tratados

I – caramujos infectados e não tratados

SFB – soro fetal bovino

MLC – Microscópio Laser Confocal

LE-PZQ – cepa LE de *S. mansoni* submetida a três tratamentos com PZQ na fase intramolusco

Resumo

O presente trabalho avaliou a ação da oxamniquina (OXA), do praziquantel (PZQ) e da associação OXA/ PZQ sobre a fase intramolusco do *Schistosoma mansoni*. Nos estudos “*in vivo*”, caramujos *Biomphalaria glabrata* infectados com *S. mansoni* foram tratados com 500mg/Kg de OXA ou 1000mg/Kg de PZQ ou 250mg/Kg de OXA+ 500mg/Kg de PZQ, na fase pré-patente e patente da infecção. Nos experimentos “*in vitro*”, esporocistos primários transformados “*in vitro*” foram expostos a 5µg/mL e 10µg/mL de PZQ. Avaliou-se, através de marcadores fluorescentes específicos, a ação do PZQ sobre o tegumento e sobre as vesículas ácidas, descritas pela primeira vez em esporocistos primários em nosso trabalho. Nossos resultados mostraram que tanto o tratamento com OXA quanto com PZQ, isoladamente, no período pré-patente, retardam o desenvolvimento do parasito, aumentando em aproximadamente dez dias o período pré-patente. Já o tratamento com a associação OXA/PZQ, neste mesmo período, retardou ainda mais o desenvolvimento do parasito, aumentando em até 56 dias o período pré-patente. O tratamento, no período patente, com OXA ou PZQ, isoladamente, interrompeu a eliminação de cercárias. A eliminação de cercárias foi restabelecida aproximadamente 15 dias após o tratamento, porém em quantidades bem menores às anteriores ao tratamento, quando os caramujos foram tratados com 1000mg/Kg de PZQ. O mesmo resultado não foi observado quando os caramujos foram tratados com 500mg/Kg de OXA. A associação OXA/PZQ, no período patente, não só interrompeu a eliminação de cercárias, como levou à “cura” dos caramujos. Esses resultados sugerem um efeito sinérgico dessas drogas quando administradas associadas. Em relação aos experimentos “*in vitro*”, foi possível verificar que o PZQ causa uma nítida contração na musculatura do esporocisto, alterando o formato do parasito. O PZQ gera, ainda, dano no tegumento do *S. mansoni*, evidenciado pela marcação com as sondas Hoechst 33258 e Lectina de *Glicine max*. Além disso, verificou-se um aumento da área marcada pela sonda LysoTracker Red, após o contato dos esporocistos com a droga, sugerindo maior atividade das vesículas ácidas presentes. A partir dos resultados obtidos, nos quais caramujos infectados e tratados com 1000mg/Kg de PZQ param de eliminar cercárias e retornam a eliminá-las, em números bem menores aos encontrados antes do tratamento, 15 dias após o término do tratamento, avaliamos se cercárias provenientes destes caramujos tratados poderiam gerar vermes adultos menos susceptíveis ao PZQ. Os resultados mostram que não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre o número de vermes recuperados de camundongos infectados com a cepa LE (controle) e LE submetida a três tratamentos com PZQ na fase intramolusco (LE-PZQ), independente da dose de PZQ administrada (200, 400

ou 800mg/Kg). No entanto, quando os camundongos foram infectados com cercárias provenientes de caramujos previamente tratados, porém, submetidos a uma passagem para manutenção do ciclo de vida do parasito, sem novo tratamento, foi possível verificar que os vermes adultos, provenientes de cercárias da LE – PZQ, mostraram-se estatisticamente menos susceptíveis à droga do que os vermes adultos provenientes da cepa LE controle, quando ambos os grupos foram tratados com 400mg/Kg de PZQ. Nossos resultados, utilizando o modelo *B. glabrata*/*S. mansoni*, abrem perspectivas interessantes para estudos de mecanismos de ação de drogas, para verificar se caramujos tratados e “curados” apresentam resistência à reinfecção pelo *S. mansoni*, além da possibilidade de ser útil na seleção de parasitos resistentes a drogas esquistossomicidas.

Abstract

The aim of the present study was to evaluate the activity of oxamniquine (OXA), praziquantel (PZQ), and OXA/PZQ association on the intramolluscan phase of *Schistosoma mansoni*. *In vivo* studies were carried out using *Biomphalaria glabrata* snails, infected with *S. mansoni*, and treated with 500 mg/Kg OXA or 1000 mg/Kg PZQ or 250 mg/Kg OXA + 500 mg/Kg PZQ, at the pre-patent and patent phases of infection. *In vitro* studies were also performed with *in vitro* transformed primary sporocysts, exposed to 5µg/mL and 10µg/mL PZQ. By means of specific fluorescent labels, it was possible to evaluate the activity of praziquantel on the tegument and acidic vesicles in primary sporocysts, described for the first time in our study. Our results showed that treatments administered either with OXA or with PZQ, separately, retarded the parasite's development at the pre-patent phase, and raised up this period for 10 days as well. On the other hand, treatment performed with the association OXA/PZQ delayed even more the parasite's development, increasing up to 56 days the pre-patent period. Treatment carried out with OXA or PZQ, separately, interrupted cercarial shedding. Approximately 15 days after treatment, cercarial shedding was reestablished, but in smaller quantities than those observed before treatment, when the snails were treated with 1000 mg/Kg PZQ. The same result could not be obtained when the snails were treated with 500 mg/Kg PZQ. OXA/PZQ association administered at the pre-patent period, not only interrupted cercarial shedding, but provided also a "cure" for the snails. These results suggested a synergistic effect of these drugs, when they are associately administered. In relation to the *in vitro* experiments, it was possible to observe that PZQ caused an evident contraction of the sporocyst musculature, changing the parasite's structure. PZQ caused damage to the tegument of *S. mansoni*, as it could be seen by labelling using the probes Hoechst 33258 and Lectin of *Glycine max*. Also, it was verified a large delimited area labelled by the probe LysoTracker Red, after contact of the sporocyst with the drug, suggesting a more intense activity of acidic organelles. Taking into account the results, *i.e.*, that infected snails treated with 1000 mg/Kg discontinued cercarial shedding, which after 15 days post-treatment is reestablished, but in lower numbers than those observed before treatment, we evaluated the cercariae proceeding from those treated snails, aiming at verifying whether they could generate adult worms less susceptible to PZQ. The results obtained showed that there were not statistically significant differences between the number of recovered worms from snails infected with the LE strain (control) and the same strain submitted to three treatments with PZQ, at the intramolluscan phase (LE-PZQ), irrespective of the PZQ doses administered (200, 400 or 800 mg/Kg). Nevertheless, when mice were

infected with cercariae obtained from previously treated snails, but submitted to a passage without treatment, in order to maintain the parasite's life cycle, it was possible to observe that adult worms proceeding from LE strain/PZQ were less susceptible to the drug than adult worms obtained from the LE strain/control, when both groups were treated with 400 mg/Kg PZQ. Our study, using the model *B. glabrata*/*S. mansoni* showed results that could lead to interesting perspectives related to further studies on the mechanisms of drug action, aiming at observing whether treated and "cured" snails could present resistance to *S. mansoni* reinfection. Also, these results may be possibly useful for selecting resistant parasites to schistosomicidal drug compounds.

1 Introdução

As infecções por helmintos são consideradas prioridade na saúde pública em diversas partes do mundo (Urbani & Albonico, 2003). De acordo com Harder (2002), a esquistossomose continua sendo a helmintose de principal significância médica em grande parte do planeta.

1.1. Esquistossomose

A esquistossomose é uma das doenças parasitárias de maior prevalência, sendo endêmica em mais de 76 países e territórios distribuídos pela África, Ásia e Américas (Engels et al., 2002). Está associada à pobreza, ocorrendo principalmente em áreas sem condições sócio – econômicas e sanitárias adequadas e sem acesso a outras medidas de prevenção efetivas.

Estima-se que mais de 200 milhões de pessoas estejam infectadas e aproximadamente 600 milhões expostas ao risco de contrair a doença (Chitsulo et al., 2000). Além disso, aproximadamente 280 mil mortes por ano são atribuídas às esquistossomoses (Van der Werf et al., 2003). Nos últimos 50 anos, houve uma mudança na distribuição da esquistossomose, no entanto, mesmo com programas de controle bem sucedidos, o número de pessoas infectadas ou sob risco de contrair a doença não foi reduzido (Engels et al., 2002).

As esquistossomoses são causadas por trematódeos digenéticos, pertencentes ao gênero *Schistosoma*. Das cinco espécies de *Schistosoma* que parasitam o homem, as de maior relevância são: *Schistosoma mansoni* (Sambon, 1907), *Schistosoma haematobium* (Bilharz, 1852) e *Schistosoma japonicum* (Katsurada, 1904), causadores, respectivamente, da esquistossomose mansoni, esquistossomose hematóbica e esquistossomose japônica.

A esquistossomose mansoni é endêmica em 54 países e territórios distribuídos pela América do Sul, Caribe e África (WHO, 2002), enquanto as esquistossomoses hematóbica e japônica estão restritas ao continente africano e asiático, respectivamente.

No Brasil, a esquistossomose é um grave problema de saúde pública, abrangendo 19 estados. Nas regiões sudeste e nordeste, existem focos de transmissão desde o Maranhão até o Espírito Santo e Minas Gerais, enquanto nas regiões norte e sul, existem apenas áreas de média extensão e focos isolados (Teles, 2005; Coura & Amaral, 2004). Segundo Katz e Peixoto (2000), mais de 8 milhões de pessoas estão infectadas, enquanto outras 30 milhões estão expostas ao risco de infecção.

O *S. mansoni* possui um ciclo evolutivo que envolve uma reprodução assexuada que ocorre no molusco (hospedeiro intermediário) e uma reprodução sexuada que ocorre no

hospedeiro vertebrado. Os hospedeiros invertebrados do *S. mansoni* são moluscos do gênero *Biomphalaria*. No Brasil, existem dez espécies e uma sub-espécie pertencentes a esse gênero, mas somente três já foram encontradas eliminando cercárias em condições naturais. São elas: *B. glabrata* (Say, 1818), *B. tenagophila* (Orbigny, 1835), *B. straminea* (Dunker, 1848) (Paraense, 1975).

O ciclo de vida do *S. mansoni* inicia-se quando ovos são eliminados nas fezes de hospedeiros definitivos (geralmente o homem). Na água, os miracídios eclodem, nadam e penetram nos moluscos através da parte externa do corpo. Após a penetração dos miracídios, ocorre a perda do epitélio ciliar e a degeneração do terebratorium (extremidade anterior do parasito, onde se encontram as terminações das glândulas adesivas e de penetração). Ocorre, ainda, uma série de transformações morfológicas, a larva se torna imóvel e passa a ser chamada de esporocisto primário. Na 2ª semana após a penetração, transformam-se em esporocistos secundários. Ocorre, então, uma migração transtecidual dos esporocistos, até alcançarem a glândula digestiva ou hepatopâncreas. Esses esporocistos secundários sofrem modificações anatômicas, dando início à proliferação das células germinativas e formação das cercárias. A formação completa das cercárias, até a sua emergência, ocorre de 27 a 30 dias após a penetração dos miracídios (Pan, 1965). Essas cercárias são eliminadas pelo molusco, permanecendo na água. Ao encontrar um hospedeiro definitivo, penetram através da pele, perdendo a cauda. Transformam-se em esquistossômulos, que migram em direção aos vasos sanguíneos, e são levados pela circulação periférica aos pulmões. Posteriormente, migram para o fígado, via circulação sanguínea, onde ocorre a maturação dos vermes para posterior acasalamento. Em seguida, os vermes migram para as veias mesentéricas inferiores onde ocorre a postura de ovos. Parte desses ovos ganha a circulação e depositam-se no fígado. Inicia-se, então, uma reação inflamatória ao redor desses ovos, levando à formação de granulomas, o evento patogênico mais grave na esquistossomose. Outros ovos podem depositar-se nas paredes intestinais, produzindo granulomas, enquanto outros podem alcançar a luz intestinal, sendo, então, eliminados pelas fezes, reiniciando o ciclo (Coles, 1973) (Figura 1 e Figura 2).

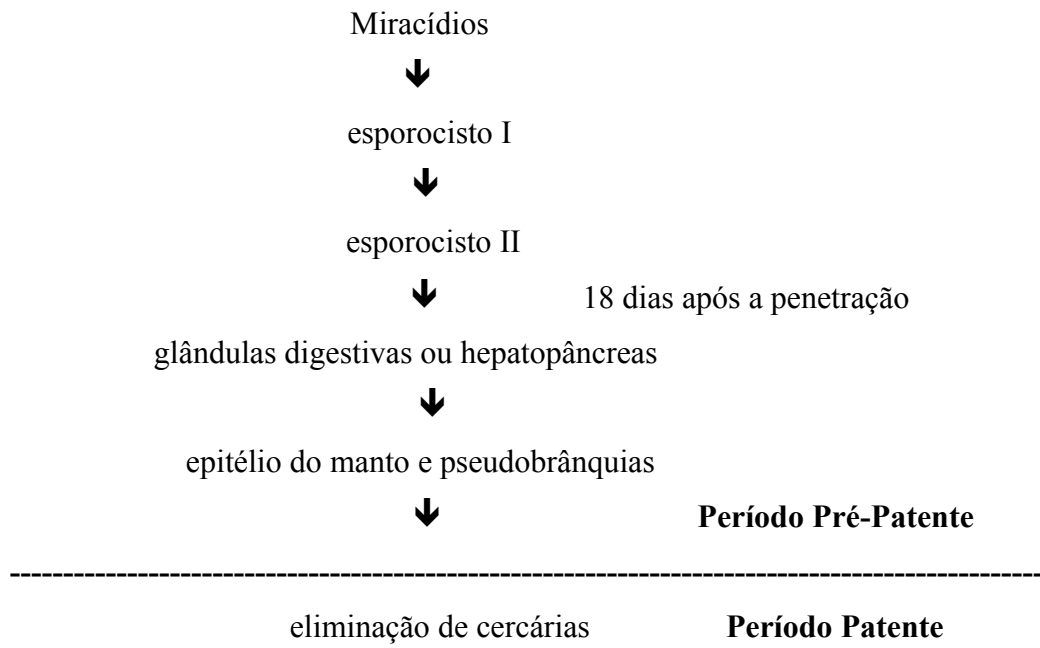


Figura 1 - Desenvolvimento do *S. mansoni*-fase intramolusco (Jannotti-Passos, 1998)

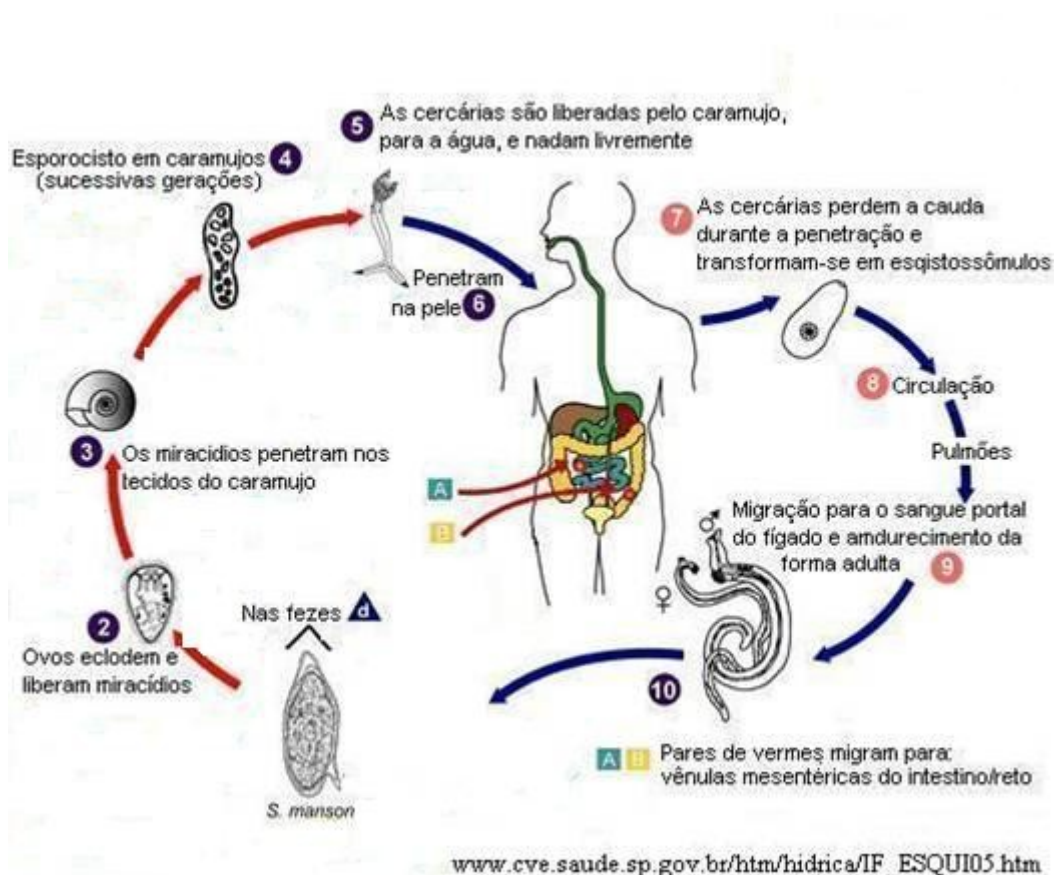


Figura 2 - Ciclo evolutivo do *S. mansoni*

O controle da esquistossomose baseia-se, principalmente, nas seguintes medidas: emprego da quimioterapia em larga escala, educação em saúde e engenharia sanitária, combate ao molusco através do uso de moluscidas, controle biológico e alterações no ambiente aquático. A quimioterapia é a principal alternativa para reduzir a morbidade da doença em áreas endêmicas, bem como tratar casos isolados da doença (WHO, 1993).

As duas principais drogas utilizadas no tratamento da esquistossomose são a oxamniquina (OXA) (Mansil - Pfizer S.A) e o praziquantel (PZQ) (Farmanguinhos - Fundação Oswaldo Cruz/ FIOCRUZ).

Uma vez que a quimioterapia constitui uma das principais medidas para o controle da esquistossomose, estudos visando conhecer os mecanismos de ação de drogas, com envolvimento da relação parasito/hospedeiro, são de grande relevância. A ação de drogas nas diferentes fases evolutivas do *Schistosoma*, tanto nos hospedeiros vertebrados como nos invertebrados, poderá propiciar ferramentas importantes no conhecimento de mecanismos de ação de drogas, seleção de linhagens resistentes em laboratório e representar um novo modelo de triagem de drogas esquistossomicidas com resultados mais rápidos e econômicos.

1.2. Oxamniquina

A OXA tornou-se disponível para o tratamento da esquistossomose nos anos 70, sendo, em passado recente, muito utilizada no tratamento em massa, com aproximadamente 13 milhões de pessoas tratadas na América do Sul e África (Fenwick, 2003).

Essa droga é um metabólito da série das tetrahydroquinoleínas (Richard & Foster, 1969), eficaz somente contra os vermes da espécie *S. mansoni*. É rapidamente metabolizada e excretada, em sua maior parte, pela urina.

O principal mecanismo de ação da OXA é a inibição da síntese de ácidos nucleicos. A enzima sulfotransferase esterifica a droga, e os produtos dessa esterificação são capazes de alquilar o DNA e outras macromoléculas do parasito (Cioli et al., 1993). De acordo com Cioli et al. (1989), essa inibição da síntese de ácidos nucleicos é um processo reversível em vermes resistentes, porém irreversível em parasitos sensíveis. Além disso, os vermes machos são mais sensíveis à droga do que os parasitos fêmeas (Cioli et al., 1995).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (WHO, 1990), a OXA é eficaz em dose única de 20mg/Kg na América do Sul, ilhas do Caribe e oeste da África. No entanto, doses mais elevadas são necessárias em outras partes do continente Africano.

De acordo com Foster et al. (1971), todas as fases evolutivas do *S. mansoni* podem ser tratadas com a droga, porém cercárias e vermes adultos são significativamente mais afetados pela droga. Coelho et al. (1988) demonstraram a ação da OXA na fase intramolusco do parasito.

Atualmente, a produção da OXA vem sendo diminuída e essa droga vem sendo substituída no Brasil pelo PZQ para o tratamento da esquistossomose, tanto em campanhas de saúde pública como na clínica.

1.3. Praziquantel

Atualmente, o PZQ é o medicamento de escolha, segundo a Organização Mundial da Saúde, para o tratamento, em larga escala, da esquistossomose, sendo efetivo contra as cinco espécies de *Schistosoma* (Doenhoff et al., 2002).

O PZQ tem atividade contra uma grande variedade de platelmintos, mas geralmente não é eficaz contra nematódeos (Andrews et al., 1983). Possui baixa toxicidade, sendo eliminado completamente do organismo após 24 horas, principalmente através das fezes e da urina (Cioli & Pica-Mattocci, 2003).

A dose recomendada para o tratamento da esquistossomose mansoni e hematóbica é de 40-60mg/Kg; doses mais elevadas são utilizadas nos casos de esquistossomose japônica (WHO, 2002).

As preparações comerciais da droga são compostas por uma mistura de partes iguais dos isômeros levo (-) e dextro (+). Porém, o enantiômero levo (-) é a forma ativa “*in vivo*” (Andrews et al., 1983; Liu et al., 1986; Xiao et al., 1999) e “*in vitro*” (Xiao & Catto, 1989; Staudt et al., 1992).

Apesar dos inúmeros trabalhos realizados na tentativa de esclarecer o modo de ação do PZQ, existem muitas perguntas a elucidar (Day et al., 1992; Redman et al., 1996; Cioli & Picca-Mattocci, 2003). No entanto, alguns efeitos desta droga sobre o parasito já estão bem esclarecidos, como contração muscular, dano tegumentar e alterações metabólicas.

Pax et al. (1978) e Fetterer et al. (1980) demonstraram que, após exposição do parasito à droga, “*in vivo*” ou “*in vitro*”, observa-se uma rápida e sustentável contração da musculatura. Essa contração tem grande influência na eliminação do parasito, uma vez que, como consequência dessa contração, o verme perde seu poder de fixação nas veias mesentéricas, sendo levado para o fígado e, conjuntamente com outras lesões, decorrentes da ação da droga, será morto, desencadeando uma reação inflamatória, que resultará na reabsorção do parasito e, geralmente, restará uma área fibrosada no local da reação.

Quanto aos danos no tegumento, após o contato com o PZQ, é descrito o aparecimento de bolhas na superfície do verme e consequente vacuolização do tegumento (Becker et al., 1980; Mehlhorn et al.; 1981). Entretanto, este fenômeno sempre ocorre após a morte do parasito, independente da droga utilizada, não constituindo, assim, um mecanismo específico de ação do PZQ no tegumento do *Schistosoma*. Além disso, o PZQ gera alteração na fluidez da membrana do verme e desestabilização do tegumento (Lima et al., 1994a). Essas alterações no tegumento levam à exposição de antígenos do parasito na superfície do verme (Harnett & Kusel, 1986) e consequente ação do sistema imune do hospedeiro sobre o parasito. Vários

trabalhos descreveram que a eficácia do tratamento com PZQ é dependente de uma resposta imune específica do hospedeiro contra o *S. mansoni* (Brindley & Sher, 1987; Fallon et al., 1992; Ribeiro et al., 2004).

Acredita-se, ainda, que a maioria desses mecanismos de ação do PZQ sejam processos dependentes de Ca^{++} (Cioli et al., 1995), uma vez que foi demonstrado, em experimentos “*in vitro*”, realizados em meio de cultura livre de Ca^{++} , o bloqueio dessas respostas (Pax et al., 1978; Wolde Mussie et al., 1982; Xiao et al., 1984). Sugere-se que o PZQ tenha ação sobre proteínas de membrana presentes nos canais de cálcio, e que alterações nessas proteínas levariam à abertura desses canais e ao conseqüente aumento do nível de Ca^{++} nos tecidos do parasito (Kohn et al., 2001).

O PZQ gera, também, uma depleção do conteúdo de glutatona. A glutatona é uma tripeptídeo fundamental para a sobrevivência das células; ela está envolvida em processos que previnem a acumulação de compostos tóxicos na célula (Ishikawa, 1992). Assim, é possível que a quantidade dessa proteína esteja relacionada à suscetibilidade/ resistência do parasito. Em experimentos “*in vitro*”, utilizando esquistossômulos, Ribeiro et al. (1998) observaram uma redução no conteúdo de glutatona após a exposição à droga.

Alguns fatores podem influenciar na eficácia terapêutica do PZQ. A fase de desenvolvimento do parasito foi descrita como fator relevante na eficácia da droga. Muitos trabalhos foram realizados, visando avaliar a ação do PZQ sobre as diferentes fases evolutivas do parasito (Gönnert & Andrews, 1977; Xiao et al., 1985; Ribeiro et al., 1998, 2004; Carneiro-Santos et al., 2001; Liang et al., 2001, 2003; Pica-Mattoccia & Cioli, 2004). Gönnert e Andrews (1977) realizaram os primeiros trabalhos, nos quais as diversas fases de desenvolvimento do parasito (cercárias, esquistossômulos, vermes jovens e adultos) foram expostas ao PZQ, em experimentos “*in vivo*” e “*in vitro*”. De acordo com os resultados, todas as fases evolutivas do parasito são sensíveis à droga, no entanto, o PZQ foi mais eficaz contra cercárias e vermes adultos.

Vários trabalhos também descreveram a ação do PZQ frente aos miracídios (Andrews, 1978; Coles, 1979; Liang et al., 2001, 2003) e esporocistos intramolusco (Coles, 1979; Touassem & Combes, 1986; Yi & Combes, 1987; Coelho et al., 1988; Riley & Chappell, 1990). Nestes estudos, foi possível verificar que tanto os miracídios quanto os esporocistos são afetados pelo PZQ. Nos estudos de Liang et al. (2001, 2003), observou-se que os miracídios, expostos “*in vitro*” ao PZQ, apresentaram uma rápida e marcante alteração em sua morfologia. Além disso, já foi descrito que os miracídios perdem a motilidade e o poder infectante após o contato com o PZQ (Coles, 1979).

A ação do PZQ nas diferentes fases do ciclo de vida do *Schistosoma* vem sendo ultimamente estudada, utilizando-se como ferramenta sondas fluorescentes. Além disso, estas sondas também já foram usadas para demonstrar aspectos morfológicos e fisiológicos do parasito. Lima et al. (1994a,b) demonstraram a presença de dano no tegumento de vermes adultos, após a exposição ao PZQ, utilizando marcadores fluorescentes específicos para componentes da membrana celular. No estudo realizado por Ribeiro et al. (1998), no qual se avaliou o efeito do PZQ sobre o nível de glutathiona, em esquistossômulos, foi utilizada a técnica de microscopia de fluorescência. Oliveira et al. (2006) demonstraram a ação do PZQ sobre o sistema excretor e o tegumento de vermes adultos, utilizando marcadores fluorescentes. Al-Adhami et al. (2003, 2005) demonstraram a presença de compartimentos ácidos em miracídios, esquistossômulos e vermes adultos, utilizando um marcador fluorescente específico para corar lisossomos. Além disso, Carneiro-Santos et al. (2001) descreveram a ausência desses compartimentos em cercárias e, ainda, verificaram a ação do PZQ sobre essas vesículas ácidas em esquistossômulos transformados. A presença de diversas lectinas em esporocistos transformados “*in vitro*” ou presentes em cortes histológicos de tecidos de caramujos também já foi descrita, utilizando-se marcadores fluorescentes específicos (Yoshino et al., 1977; Zelck & Becker, 1990; Uchikawa & Loker, 1991; Johnston & Yoshino, 1996). Dessa forma, esses marcadores fluorescentes são de grande valia no estudo da biologia e do comportamento do parasito nas diferentes fases do seu ciclo de vida, bem como no esclarecimento de alguns aspectos do mecanismo de ação de drogas esquistossomicidas sobre o *S. mansoni*.

1.4. Ação de diferentes drogas sobre a fase intramolusco do parasito

Diversos estudos já demonstraram que drogas que atuam contra vermes adultos e imaturos do *Schistosoma*, no hospedeiro vertebrado, incluindo o PZQ, também atuam na fase intramolusco do parasito, levando à interrupção na eliminação de cercárias (Warren & Weisberg, 1966; Warren, 1967; Coles, 1979; Touassem & Combes, 1986; Yi & Combes, 1987; Coles & Bruce, 1987; Coelho et al., 1988; Riley & Chappell, 1990). Além disso, de acordo com Coles (1973), enzimas presentes em esporocistos migram de maneira semelhante às de vermes adultos em eletroforese. Esses dados apontam para uma similaridade entre as vias metabólicas destas duas diferentes fases do ciclo de vida do *Schistosoma* (Coelho et al., 1988).

Warren & Weisberg (1966) realizaram um estudo em caramujos expostos a miracídios, utilizando o cloranfenicol, um antibiótico inibidor de síntese de proteína. Nesse trabalho, caramujos foram expostos por 24 horas aos miracídios de *S. mansoni* e, em seguida,

colocados em contato com o antibiótico, na concentração de 312 ppm, por 5 semanas. Observou-se que os caramujos permaneceram sem eliminar cercárias por 6 semanas após o término do tratamento. Além disso, caramujos positivos (eliminando cercárias) também foram expostos ao cloranfenicol sob as mesmas condições. Foi possível observar uma supressão na eliminação de cercárias, que se manteve até 4 semanas após o término do tratamento.

A ação do hycanthone, uma droga do mesmo grupo químico da OXA e já usada no tratamento clínico da esquistossomose, foi avaliada por Warren (1967). Nesse estudo, os caramujos, após 24 horas de exposição aos miracídios, foram expostos à droga na concentração de 0.4 ppm, por 5 semanas. Os resultados obtidos foram os mesmos encontrados com o cloranfenicol, uma supressão na eliminação de cercárias por até 6 semanas após o término do tratamento.

Agentes mutagênicos também já foram avaliados na fase intramolusco do parasito. No estudo realizado por Coles & Bruce (1987), caramujos infectados com *S. mansoni* foram expostos ao sulfonato etil metano (ESM), e, posteriormente, cercárias eliminadas de caramujos expostos e não expostos ao ESM foram transformadas em esquistossômulos. Esses esquistossômulos foram, então, expostos ao metrifonato, um agente esquistossomicida. Após 3 dias de contato com o metrifonato, foi possível observar que os esquistossômulos, provenientes de cercárias eliminadas por caramujos previamente expostos ao ESM, possuíam maior atividade do que aqueles provenientes de cercárias de caramujos não expostos ao ESM, 23/14000 e 12/ 14000, respectivamente.

Segundo Coelho et al. (1988), a OXA também possui ação sobre a fase intramolusco do *S. mansoni*. Caramujos *B. glabrata* infectados, submetidos ao tratamento com a droga na concentração de 10 ppm, incorporada a 500mg de ração, tiveram a eliminação de cercárias suprimida por 1 semana após o tratamento. Vários outros compostos (esquistossomicidas ou não) foram testados nesse trabalho e verificou-se que algumas drogas efetivas contra vermes adultos e imaturos também agiam na forma intramolusco do parasito.

Utilizando o PZQ, Coles (1979) encontrou resultados interessantes. Em seu estudo, caramujos infectados foram mantidos em contato com o PZQ, diluído em água, nas concentrações de 3×10^{-5} , 10^{-6} durante 24 horas. Após esse período, foram expostos à luz para verificar a eliminação de cercárias e fixados para análise histopatológica. Observou-se a ausência de cercárias nos caramujos expostos à droga. Nas análises histopatológicas, verificou-se a presença de esporocistos jovens intactos e de cercárias em desenvolvimento, porém poucas possuíam cauda.

Touassem & Combes (1986) submeteram caramujos *B. glabrata* infectados com *S. mansoni* ao tratamento com PZQ por 48 horas. A droga, na concentração de 0,1%, foi

incorporada à alimentação dos moluscos e, após o tratamento, a eliminação de cercárias foi avaliada semanalmente. Os resultados mostraram uma supressão imediata da eliminação de cercárias, porém, esse período perdurou apenas alguns dias após o tratamento. No entanto, o número de cercárias eliminadas permaneceu bem inferior aos números encontrados antes do tratamento. Análises histopatológicas também foram realizadas. Para esse objetivo, caramujos foram fixados durante e após o tratamento. Foi possível observar uma destruição total de cercárias maduras e recém-formadas. O tegumento de esporocistos jovens e de embriões de cercárias permaneceu intacto. Observou-se, ainda, que, durante o tratamento, os esporocistos secundários não produziam cercárias, porém, ao final do tratamento, ocorria uma proliferação intensa de esporocistos, bem como a formação de embriões de cercárias, o que explicaria o reestabelecimento da eliminação de cercárias.

Em outro estudo, realizado por Riley & Chappell (1990), os caramujos foram tratados com PZQ por 72 horas. A droga foi incorporada à ração dos moluscos, em diferentes dosagens: 20, 29, 37 μ g/g. A avaliação da eliminação de cercárias foi realizada por até 8 semanas. Para a análise histopatológica, os caramujos foram fixados pós-tratamento e observados à luz do microscópio óptico e eletrônico. Os resultados mostraram uma redução de, aproximadamente, 90% no número de cercárias eliminadas. Essa redução ocorreu imediatamente após o tratamento com a droga, permanecendo até a 8ª semana. Na análise histopatológica, foi possível verificar a presença de várias cercárias desintegradas, embora algumas permanecessem intactas. Não foi possível observar o processo de desintegração das cercárias, fato esse que sugere uma ação rápida do PZQ sobre elas. Já os esporocistos permaneceram com o tegumento intacto, o que favoreceu o reestabelecimento da eliminação das cercárias.

Estudos avaliando a atividade do PZQ frente aos esporocistos de *S. japonicum* também foram realizados. Yi & Combes (1987) submeteram moluscos *Oncomelania hupensis*, infectados com 10 miracídeos do parasito, ao tratamento com PZQ diluído em água, nas concentrações 3×10^{-5} , 10^{-6} e 10^{-7} por 24 horas, nos períodos pré-patente e patente da infecção. Os resultados referentes ao tratamento no período pré-patente (18 dias p.i.) demonstraram um desenvolvimento normal do parasito, mantendo-se o mesmo período pré-patente nos grupos controles e tratados. Na análise histopatológica, observou-se a presença de embriões de esporocistos jovens se desenvolvendo, sugerindo que os esporocistos primários não são afetados pelo PZQ. Já o tratamento realizado no período patente da infecção gerou resultados um pouco diferentes. Ocorreu uma supressão da eliminação de cercárias, que permaneceu por aproximadamente 25 dias após o tratamento, sendo reestabelecida, em níveis baixos, após esse período. Nos resultados da histopatologia, durante o tratamento, foi possível observar

algumas cercárias maduras mortas e esporocistos com tegumento intacto. Nesse estudo, os autores sugerem que o “tratamento” de caramujos infectados com drogas esquistossomicidas possa ser um método alternativo e barato para triagem de drogas, e ainda ser uma técnica útil na comparação da sensibilidade de cepas de diferentes áreas geográficas.

1.5. Associação oxamniquina e praziquantel

A OXA e o PZQ possuem mecanismos de ação distintos. Dessa forma, a combinação dessas duas drogas pode gerar um efeito sinérgico. De acordo com Delgado et al. (1992), a associação de drogas em baixas dosagens pode ser a alternativa para melhorar a terapêutica de algumas doenças. Essas associações, além de favorecerem a redução dos efeitos tóxicos causados pela droga, podem dificultar o aparecimento de resistência, uma vez que essas serão administradas em dosagens reduzidas.

Resultados distintos já foram obtidos, utilizando a associação OXA/PZQ. Alguns estudos mostraram uma nítida ação sinérgica desta associação tanto em modelo experimental quanto no homem (Shaw & Brammer, 1983; Campos et al., 1985; Zwingenberger et al., 1987; Botros et al., 1989; Campos et al., 1989; Delgado et al., 1992), enquanto outros trabalhos não obtiveram esta mesma resposta (Pugh & Teesdale, 1983; Creasy et al., 1986; Dietze & Prata, 1986; Gryscheck et al., 2004). Metodologias distintas, bem como a época do tratamento são fatores que podem ter levado a resultados tão diferentes.

Oliveira (2005) realizou um estudo “*in vitro*”, utilizando a associação dessas duas drogas. As lesões presentes do tegumento de vermes adultos expostos à associação OXA/PZQ foram comparadas com as causadas pela exposição de vermes adultos à OXA e PZQ, isoladamente. Por meio do uso de marcadores fluorescentes específicos, ficou claro que a associação OXA/ PZQ foi muito mais eficaz em causar dano no tegumento dos parasitos do que as drogas utilizadas isoladamente, o que demonstra, mais uma vez, a ação sinérgica dessas drogas quando utilizadas em associação.

Outro ponto interessante envolvendo a ação sinérgica da associação OXA/ PZQ é o fato do PZQ, segundo Cioli et al. (1995) e Pica Mattoccia & Cioli (2004), ser mais eficaz em eliminar parasitos fêmeas, enquanto a OXA possui maior ação sobre os vermes machos. Dessa forma, a associação dessas duas drogas teria um efeito complementar, levando à redução de ambos os sexos do parasito.

1.6. Resistência ao praziquantel

A disponibilidade de uma droga com baixa toxicidade, administrada oralmente, em dose única e com alta eficácia, possibilita o tratamento da população em larga escala. Porém, o uso da quimioterapia em massa, como principal método de controle da esquistossomose em áreas endêmicas, pode gerar o surgimento de cepas resistentes, através do mecanismo de pressão seletiva (Coelho et al., 1997).

De acordo com Kinotti (1987), o *S. mansoni* possui a capacidade de desenvolver resistência a doses terapêuticas de drogas, principalmente quando submetido a constante pressão desses esquistossomicidas.

Diversos estudos já demonstraram a existência de cepas de *S. mansoni* resistentes ou tolerantes ao PZQ, tanto no campo quanto em laboratório (Fallon et al., 1994, 1995; Stelma et al., 1995; Ismail et al., 1996, 1999; Araújo et al., 1996; Bonesso-Sabadini & Dias, 2000).

A redução na eficácia do tratamento com PZQ envolve diversos fatores. As altas taxas de infecção e re-infecção, o elevado número de vermes e a grande quantidade de vermes imaturos no momento do tratamento podem levar a uma redução da sensibilidade às drogas (Cioli, 2000; Doenhoff et al., 2002).

Vários parâmetros têm sido utilizados para definir a existência de cepas resistentes. Recentemente, Cioli et al. (2004) avaliaram os valores de ED_{50} (dose efetiva para matar 50% dos vermes) para cepas sensíveis e resistentes ao PZQ. Os autores observaram que as cepas resistentes possuem ED_{50} três vezes maior do que as cepas sensíveis à droga. Além disso, a taxa de eclosão de miracídios, o tempo necessário para que o PZQ altere a morfologia do miracídio, bem como a taxa de cercárias que perdem a cauda em contato com PZQ, durante um determinado tempo, já foram sugeridos como parâmetros para se definir a presença ou não de resistência (Liang et al., 2000, 2001). No entanto, devido a diferenças na suscetibilidade ao PZQ entre as espécies e linhagens de *Schistosoma*, esses ensaios devem ser melhor avaliados, comparando-se as respostas das várias espécies e cepas (Liang et al., 2001).

Várias medidas têm sido sugeridas para se tentar reduzir o impacto da resistência a drogas esquistossomicidas: (1) educação sanitária para evitar a reinfecção após o tratamento; (2) aumento da vigilância pelos órgãos oficiais de saúde pública, para monitorar o aparecimento de resistência; (3) desenvolvimento de técnicas simples e factíveis para a detecção de cepas resistentes no campo; (4) desenvolvimento de novas drogas esquistossomicidas; (5) associação de drogas (Bennett et al., 1997).

De acordo com Ross et al. (1993) e Liang et al. (2003), o processo de pressão quimioterápica para seleção de resistência, utilizado em laboratório, é um processo importante

a ser utilizado, uma vez que esses parasitos resistentes podem ser a chave para elucidar os mecanismos de ação de drogas. No entanto, segundo Fallon et al. (1996), os diversos experimentos de indução de resistência, realizados em laboratório, utilizando sucessivas passagens e tratamentos em camundongos, já publicados, são longos e utilizam metodologias distintas, o que dificulta a comparação entre eles, impedindo, assim, uma análise mais aprofundada dos resultados obtidos.

Em função das dificuldades de encontrar um método rápido e confiável para selecionar linhagens de *Schistosoma* resistentes às drogas esquistossomicidas em laboratório e também estabelecer novos modelos para triagem de novos compostos e combinações de drogas esquistossomicidas, bem como, novos procedimentos para esclarecer os mecanismos de ação dessas drogas, o presente trabalho foi conduzido, empregando as duas drogas mais utilizadas na clínica para o tratamento da esquistossomose na fase intramolusco do *S. mansoni*. Dentro das abordagens mencionadas, administramos as drogas, isoladamente ou em associação utilizando caramujos experimentalmente infectados e esporocistos transformados “*in vitro*”.

2 Objetivo

2.1. Objetivo geral

O presente trabalho tem como objetivo estudar o efeito de drogas esquistossomicidas na fase intramolusco do *S. mansoni*.

2.2. Objetivos específicos

1. Verificar o efeito do PZQ e da OXA sobre *S. mansoni* na fase intramolusco;
2. Verificar se existe efeito sinérgico da associação entre PZQ e OXA sobre a fase intramolusco do *S. mansoni*;
3. Descrever as possíveis alterações morfológicas e metabólicas causadas nos esporocistos, quando expostos ao praziquantel, “in vitro”, utilizando microscopia óptica comum, de fluorescência e laser confocal;
4. Verificar uma possível alteração na suscetibilidade da cepa LE ao PZQ, após exposição prévia desta cepa à droga, na fase intramolusco do parasito.

3 Materiais e Métodos

3.1. Avaliação do efeito das drogas PZQ e OXA na fase intramolusco do parasito

Para verificar a ação do PZQ, da OXA, bem como da associação dessas duas drogas na fase intramolusco do *S. mansoni*, seis experimentos distintos foram realizados, sendo três no período pré-patente e outros três no período patente da infecção. No primeiro experimento, realizado no período pré-patente e patente, utilizou-se PZQ e OXA, isoladamente, e nos demais experimentos, as duas drogas em associação.

3.1.1. Caramujos e parasitos

Foram utilizados caramujos da espécie *B. glabrata*, linhagem Barreiro de Cima, mantida rotineiramente por mais de 30 anos no Moluscário do Centro de Pesquisa René Rachou (FIOCRUZ). Os parasitos utilizados foram *S. mansoni* da cepa LE, mantida por mais de 35 anos no Moluscário/ Laboratório de Esquistossomose do Centro de Pesquisa René Rachou (FIOCRUZ).

3.1.2. Infecção dos caramujos

Os caramujos foram expostos, individualmente, a 10 miracídios de *S. mansoni* (cepa LE), segundo a técnica descrita por Souza (1993). Nos experimentos realizados no período patente da infecção, trinta dias após a exposição aos miracídios, os caramujos foram expostos à luz artificial, por 1 hora, para verificar a positividade. Os caramujos que eliminavam cercárias foram selecionados para os experimentos. Já nos experimentos realizados no período pré-patente, os caramujos foram tratados 18 dias após exposição aos miracídios.

3.1.3. Tratamento experimental

Neste estudo foram realizados seis experimentos, sendo que para cada experimento o tratamento correspondia a cinco dias consecutivos de exposição dos caramujos à droga. As drogas utilizadas foram incorporadas à ração da marca Nuvital - Nuvilab (composição: milho integral, farelo de soja, farelo de trigo, carbonato de cálcio, fosfato bicálcio, cloreto de sódio, premix vitamínico, aminoácidos) e fornecida como alimento para os moluscos, diariamente. Essa ração foi autoclavada, triturada e a ela incorporados 10% de carbonato de cálcio. Para o tratamento foi adicionada água, até que a ração adquirisse uma consistência pastosa e possibilitasse a adição/ mistura da droga. Após a adição da droga, a mistura foi

homogeneizada e separada em porções de 100mg de ração, quantidade esta que corresponde à alimentação diária de cada caramujo. Os caramujos foram pesados e a partir do peso obtido, calculada a dosagem em mg/Kg. No primeiro e quarto experimentos, nos quais as drogas foram utilizadas isoladamente, a dosagem fornecida foi de 500mg/Kg de OXA (Mansil - Pfiser S.A) e 1000mg/Kg de PZQ (Cestox - MERCK). Nos experimentos restantes, as drogas foram administradas em associação nas concentrações de 250mg/Kg de OXA + 500mg/Kg de PZQ. O número de caramujos por grupo e o número de tratamentos variou entre os seis experimentos. No primeiro experimento foram formados grupos com 15 caramujos cada e estes caramujos foram tratados no período pré-patente da infecção uma única vez. No segundo e terceiro experimentos foram formados grupos com 30 caramujos cada, e as drogas foram administradas em associação, no período pré-patente. Porém, no segundo experimento, os caramujos foram tratados uma vez, enquanto, no terceiro, os grupos foram tratados duas vezes. No quarto experimento, os caramujos foram tratados apenas uma vez no período patente da infecção e os grupos possuíam 15 caramujos cada. No quinto experimento, os caramujos foram tratados uma vez no período patente e os grupos foram formados contendo 30 caramujos cada. No sexto e último experimento, os grupos possuíam 50 caramujos cada e os caramujos foram tratados no período patente por duas vezes. No primeiro e quarto experimentos, chamamos de IOR e IPR os caramujos infectados e tratados com OXA e PZQ, respectivamente. Havia também caramujos não infectados e tratados com OXA (NOR) e tratados com PZQ (NPR). Nos demais experimentos, chamamos de IT o grupo de caramujos infectados e tratados e de NT caramujos não infectados e tratados. Para todos os experimentos, foram formados grupos controles, não tratados, de caramujos infectados (I) e não infectados (N). Estes foram mantidos sob as mesmas condições dos grupos tratados, porém, sem exposição à droga. Nos experimentos realizados no período pré-patente, os caramujos foram tratados no 18º dia após a exposição aos miracídios (primeiro e segundo experimentos) e também no 32º dia após a infecção (terceiro experimento). Os caramujos dos experimentos do período patente foram tratados aos 32 dias após a exposição aos miracídios (quarto e quinto experimentos) e também aos 42 dias após a infecção, no sexto experimento. Durante todo o experimento, os caramujos foram mantidos individualmente em copos plásticos. Os grupos experimentais e os tratamentos utilizados estão descritos no Quadro 1.

Quadro 1 - Grupos experimentais e tratamentos

	Grupo/ n	n° de tratamentos	Tratamento
1° Experimento Pré-Patente	IOR/ 15	1	500mg/Kg de OXA
	NOR/ 15	1	500mg/Kg de OXA
	IPR/ 15	1	1000mg/Kg de PZQ
	NPR/ 15	1	1000mg/Kg de PZQ
	I/ 15		Controle
	N/ 15		Controle
2° Experimento Pré-Patente	IT/ 30	1	250mg/Kg de OXA + 500mg/Kg de PZQ
	NT/ 30	1	250mg/Kg de OXA + 500mg/Kg de PZQ
	I/ 30		Controle
	N/ 30		Controle
3° Experimento Pré-Patente	IT/ 30	2	250mg/Kg de OXA + 500mg/Kg de PZQ
	NT/ 30	2	250mg/Kg de OXA + 500mg/Kg de PZQ
	I/ 30		Controle
	N/ 30		Controle
4° Experimento Patente	IOR/ 15	1	500mg/Kg de OXA
	NOR/ 15	1	500mg/Kg de OXA
	IPR/ 15	1	1000mg/Kg de PZQ
	NPR/ 15	1	1000mg/Kg de PZQ
	I/ 15		Controle
	N/ 15		Controle
5° Experimento Patente	IT/ 30	1	250mg/Kg de OXA + 500mg/Kg de PZQ
	NT/ 30	1	250mg/Kg de OXA + 500mg/Kg de PZQ
	I/ 30		Controle
	N/ 30		Controle
6° Experimento Patente	IT/ 50	2	250mg/Kg de OXA + 500mg/Kg de PZQ
	NT/ 50	2	250mg/Kg de OXA + 500mg/Kg de PZQ
	I/ 50		Controle
	N/ 50		Controle

IOR: caramujos expostos aos miracídeos e tratados com OXA; NOR: caramujos não expostos aos miracídeos e tratados com OXA; IPR: caramujos expostos aos miracídeos e tratados com PZQ; NPR: caramujos não expostos aos miracídeos e tratados com PZQ; IT: caramujos expostos aos miracídeos e tratados com OXA + PZQ; NT: caramujos não expostos aos miracídeos e tratados com OXA + PZQ; N: caramujos não expostos aos miracídeos e não tratados; I: caramujos expostos aos miracídeos e não tratados.

3.1.4. Avaliação da eliminação de cercárias

Os caramujos foram examinados, para verificar a eliminação de cercárias, antes do tratamento e semanalmente, após o tratamento. A quantificação das cercárias foi realizada por amostragem. Os caramujos foram colocados, individualmente, em beckers pequenos, contendo 4 mL de água sem cloro e expostos à luz artificial por uma hora. O líquido contendo

cercárias foi transferido para tubos cônicos de 10mL e mantidos a 5°C por, aproximadamente, 3 horas. Após esse período, o sobrenadante foi descartado e acrescentados 3mL de formol a 10%. No momento da quantificação, a solução de formol contendo cercárias foi homogeneizada, e 1mL de cada tubo foi transferido para uma placa escavada e contado, utilizando-se microscópio estereoscópio. O número final de cercárias foi multiplicado por 3 (total de mililitros contidos em cada tubo).

3.2. Experimentos “*in vitro*”

Os experimentos “*in vitro*” foram realizados visando verificar a ação do PZQ sobre esporocistos de *S. mansoni* transformados “*in vitro*”, por meio do uso de sondas fluorescentes.

3.2.1. Obtenção e transformação “*in vitro*” de miracídios em esporocistos primários

Dez camundongos infectados com 100 cercárias da cepa LE de *S. mansoni* foram sacrificados, aos 50 dias de infecção, por deslocamento cervical. Com auxílio de pinça e tesoura, tiveram as vísceras expostas e o fígado retirado. O fígado foi mantido em salina 0,85%, contendo 10% de antibiótico penicilina/estreptomicina (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, USA; 10.000 unidades de penicilina e 10mg de estreptomicina/ml) por 30 minutos, à temperatura ambiente, em capela de fluxo laminar. Após esse período, os fígados foram triturados e lavados, seguindo-se a técnica descrita por Pelegrino & Katz (1968), resumidamente: os fígados, em salina 0,85%, foram triturados por aproximadamente 5 minutos em liquidificador, previamente esterilizado com álcool 70% e luz UV por 20 minutos. O líquido, contendo os fígados já triturados, foi “filtrado” com ajuda de uma gaze, colocado em um cálice e o volume completado com salina 0,85%, para 1litro. O líquido foi deixado no escuro, à temperatura ambiente, por 30 minutos, para sedimentar. Após a sedimentação, o sobrenadante foi retirado, com auxílio de bomba de vácuo e o volume novamente completado para 1L, agora com água desclorada. O líquido foi deixado sob as mesmas condições da lavagem anterior, no entanto, por 20 minutos. Este último procedimento foi realizado duas vezes. Após as três lavagens, o sedimento restante foi colocado em balão volumétrico e coberto com papel alumínio, de maneira que apenas uma pequena parte da abertura do balão permanecesse descoberta. O balão foi exposto à luz artificial, favorecendo, assim, a eclosão e a visualização dos miracídios, devido ao fototropismo positivo.

Os miracídios foram coletados em tubos Falcon de 50mL (aproximadamente 8 tubos) e mantidos no gelo por aproximadamente 30 minutos. Após esse tempo, o sobrenadante foi retirado e mantidos 5mL do líquido em cada tubo. Os líquidos contendo os miracídios foram

então transferidos para um único tubo e mantidos novamente por 30 minutos no gelo. Parte do sobrenadante foi retirada, restando, mais uma vez, 5mL de líquido contendo os miracídios.

O cultivo/transformação dos miracídios foi realizado em meio de cultura RPMI – 1640 pH 7,4 (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, USA) suplementado com 5%(v/v) de soro bovino fetal inativado (SBF) (Gibco Limited, Paisley, Scotland) e 20µg/mL de antibiótico gentamicina (Garamox – 80mg/ Hipolabor). Em garrafas de 25cm² (Sarstedt), próprias para cultura de células, foi adicionado 1mL do líquido contendo os miracídios para 15mL do meio de cultura já suplementado. As garrafas foram mantidas fechadas, em estufa incubadora B.O.D., a 26°C, por 24 horas. Passado esse período, as garrafas foram retiradas da B.O.D., observadas em microscópio invertido (Zeiss), para verificar a liberação da placa ciliar miracidiana, o que caracteriza a transformação.

O conteúdo das garrafas foi transferido para dois tubos Falcon de 50mL e estes, mantidos à temperatura ambiente por 30 minutos. Após esse período, retirou-se o sobrenadante, mantendo-se, aproximadamente, 5mL em cada tubo. Todo o líquido foi transferido para um único tubo e o volume completado para 50mL, com meio de cultura RPMI – 1640 (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, USA) não suplementado, em temperatura ambiente. O tubo foi mantido por mais 30 minutos sob as mesmas condições anteriores. Após os 30 minutos, o sobrenadante foi retirado, permanecendo apenas 5mL do líquido contendo os esporocistos. Ao final desse procedimento, os esporocistos foram utilizados em experimentos distintos.

Alguns materiais utilizados nesse procedimento foram adquiridos estéreis, enquanto outros foram esterilizados em autoclave, incluindo a salina e a água desclorada.

3.2.2. Marcação dos parasitos com sondas fluorescentes

Experimentos distintos, utilizando tipos diferentes de sonda, foram realizados, visando verificar a presença de compartimentos ácidos, semelhantes a lisossomos, bem como avaliar a ação do PZQ sobre esses compartimentos e sobre a superfície da membrana dos esporocistos.

a) Hoechst 33258

A sonda Hoechst 33258, (bis benzamida) (2,4 hidroxifenil 5, 4 metil, 1 piperazina 2,5 bi H-benzimidazol), é um marcador que possui afinidade por DNA, só se tornando fluorescente quando se liga a este. Possui, ainda, um caráter hidrofílico e, devido a isso, não consegue se difundir para o interior das células. Essas características o tornam um indicador de integridade de membrana, uma vez que só se ligará ao DNA da célula quando houver algum tipo de lesão. Esta sonda absorve luz no comprimento de onda de 455nm e emite luz no

comprimento de onda 352nm, espectro visível, azul. A Hoechst 33258, utilizada neste estudo, foi obtida da Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, USA, sob a forma de pó e diluída em água destilada, obtendo-se uma solução estoque com concentração final de 10mg/mL.

b) Lectina de *Glicine max* (soybean) (SBA) conjugada a tetrametil rodamina isotiocianato (TRITC)

A lectina de *Glicine max* se liga a carboidratos de membrana, mais especificamente a N-acetilgalactosamina (fração glicídica de glicolipídeos e glicoproteínas), composto abundante nas membranas celulares. A lesão da membrana celular pode levar à exposição de N-acetilgalactosamina, a qual irá se ligar à lectina de *Glicine max* que, por sua vez, está ligada ao fluoróforo TRITC (tetrametil rodamina isotiocianato). Assim, esta sonda absorve luz no comprimento de onda de 543nm e emite luz no comprimento de onda 571nm, espectro visível, vermelho. A fluorescência proveniente da TRITC, determina o local no qual ocorreu a exposição de N-acetilgalactosamina. A lectina de *Glicine max* foi obtida da Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, USA, sob a forma de pó e diluída em meio de cultura RPMI-1640 (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, USA), obtendo-se uma solução estoque com concentração de 1mg/mL.

c) LysoTracker Red DND 99

A sonda LysoTracker Red ($C_{20}H_{24}BF_2N_5O$) é um marcador acidotrópico, específico para lisossomos e compartimentos ácidos em células vivas. A sonda absorve luz no comprimento de onda de 450nm e emite luz no comprimento de onda 590nm, espectro visível, vermelho. A LysoTracker Red, utilizada neste trabalho, foi obtida da Molecular Probes, Eugene, Ore, sob a forma líquida (1mM), sendo diluídos 10 μ L em 1mL meio de cultura RPMI – 1640 (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, USA), perfazendo a concentração final de 0,001mM.

3.2.3. Experimento 1 – Avaliação da ação do PZQ sobre esporocistos transformados “*in vitro*”

Após a transformação dos miracídios “*in vitro*” para obtenção dos esporocistos, 1mL de meio RPMI – 1640 (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, USA), contendo os parasitos, foi distribuído em cada um dos três tubos Falcon de 15mL. Em dois dos três tubos foram adicionados, respectivamente, 10 μ L de uma solução estoque de PZQ 0,1mg/mL (concentração final 1 μ g/mL) e 10 μ L de PZQ a 0,5 mg/mL (concentração final 5 μ g/mL). No tubo controle foram adicionados 10 μ L de metanol, uma vez que o PZQ foi diluído em

metanol. Os esporocistos foram incubados em estufa a 37°C e 5% de CO₂, por 15 minutos. Após esse período, foram confeccionadas lâminas e, em seguida, observadas em microscópio óptico comum.

3.2.4. Experimento 2 – Avaliação do efeito do PZQ sobre a membrana de esporocistos transformados “*in vitro*”

Para realização deste experimento, 1mL de meio RPMI – 1640 (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, USA), contendo esporocistos, foi transferido para cada um dos três tubos Falcon de 15mL. Dois experimentos foram realizados em paralelo, nos quais se empregaram marcadores distintos. Para a sonda Hoechst 33258 (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, USA), 5µL do marcador (solução estoque 10mg/mL) foram adicionados a cada tubo. Os parasitos foram incubados por 30 minutos, em estufa a 37°C e 5% de CO₂. Após a incubação, foram adicionados ao primeiro tubo 10µL de solução estoque de PZQ a 0,5mg/mL, e no segundo 10µL de solução estoque de PZQ a 1mg/mL, perfazendo uma concentração final de 5µg/mL e 10µg/mL, respectivamente. Ao terceiro tubo, controle do experimento, foram acrescentados 10µL de metanol. Os esporocistos foram, então, incubados novamente, agora por 15 minutos, sob as mesmas condições anteriores. Após a incubação, foram preparadas lâminas e examinadas em microscópio de fluorescência. No caso do marcador lectina *Glicine max* (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, USA), adicionaram-se 5µL do marcador (solução estoque 1mg/ml). A partir dessa etapa, o mesmo protocolo foi empregado. No entanto, após a incubação, foram preparadas lâminas e estas foram examinadas em microscópio laser confocal.

3.2.5. Experimento 3 – Avaliação da presença de lisossomos em esporocistos e da ação do PZQ sobre essas organelas ácidas

Neste experimento, 1mL de meio RPMI-1640 (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, USA), contendo esporocistos primários, foi transferido para cada um dos três tubos Falcon de 15mL. Esses esporocistos foram marcados com 20µL de uma solução estoque de 0,001mM da sonda LysoTracker Red (Molecular Probes, Eugene, Ore) e incubados em estufa a 37° C e 5% de CO₂ por 30 minutos. Após esse período, a um dos tubos foram adicionados 10µL de solução estoque de PZQ a 0,5mg/mL, e a um outro, 10µL de solução estoque de PZQ a 1mg/mL, perfazendo uma concentração final de 5µg/mL e 10µg/mL, respectivamente. Ao terceiro tubo, foram adicionados 10µL de metanol, utilizado como controle do experimento.

Os esporocistos foram incubados por 15 minutos, em estufa a 37°C e 5% de CO₂. Após esse período, foram confeccionadas lâminas e examinadas em microscópio laser confocal.

3.2.6. Fluorescência (Microscopia de Fluorescência e Laser Confocal)

O fenômeno da fluorescência pode ser descrito, resumidamente, como um tipo de emissão de luz (luminescência) em que um corpo (sonda fluorescente ou fluoróforo) absorve luz e logo depois a emite. A absorção de luz ocorre de uma fonte de energia, que, no caso da microscopia de fluorescência, provém de fótons emitidos de uma radiação luminosa (lâmpada incandescente de mercúrio, UV). A imagem gerada pode ser visualizada diretamente através das lentes oculares do microscópio ou capturada em máquina fotográfica acoplada a este. Na microscopia laser confocal, a formação da imagem ocorre de forma diferente. A luz emitida pelo corpo fluorescente será absorvida por um ou mais feixes de luz (lasers) que captam intervalos de comprimento de ondas específicos. O Microscópio Laser Confocal (MLC) utilizado possui três lasers: o Argônio, que emite frequências de quatro comprimentos de onda diferentes - 458, 477, 488 e 514nm; o Hélio/Neônio 1 - 543nm e o Hélio/Neônio 2 - 633nm. O MLC gera uma imagem que é digitalizada e visualizada na tela do computador. A principal vantagem do MLC sobre a microscopia de fluorescência é o fato de o MLC ter a capacidade de excluir a fluorescência emitida por pontos que estejam fora do foco desejado, permitindo a formação de imagens de melhor qualidade, sem a interferência de regiões que não possuem interesse no estudo. No entanto, as duas técnicas são complementares, permitem detectar componentes particulares de um complexo biomolecular, inclusive de células vivas, ajudando na visualização de estruturas, compostos ou processos em curso em um determinado material em estudo.

3.2.7. Preparo e leitura das lâminas

Ao final de cada experimento, foram confeccionadas lâminas para análise. Porém, as preparações foram realizadas de maneiras distintas, em conformidade com a técnica de microscopia utilizada. Para análise em microscópio óptico comum e de fluorescência, as lâminas foram preparadas da seguinte forma: duzentos microlitros do líquido contendo os esporocistos foram transferidos para lâminas delimitadas por pequenas quantidades de vaselina, a fim de se evitar o extravasamento dos parasitos da lâmina e o achatamento deles, após a colocação da lamínula. Para análise em microscópio laser cofocal, as lâminas foram preparadas de outra maneira. Por se tratar de um microscópio invertido, no qual, para leitura, a lamínula deve estar voltada para baixo, em contado com as objetivas, apenas 40µL do

líquido contendo os esporocistos foram transferidos para lâmina. As lâminas também foram delimitadas com vaselina e montadas com lamínula. Após essa etapa, a lamínula foi selada com esmalte, para assegurar o não extravasamento do líquido da lâmina, fato que poderia danificar as objetivas no momento da análise. As lâminas foram observadas em microscópio óptico de fluorescência (K - Zeiss), utilizando filtro DAPI para Hoechst 33258. O exame do material no microscópio laser confocal foi realizado, utilizando o modelo Zeiss LSM 510 (Laboratório de Entomologia Médica/ CPqRR). O laser empregado foi o Hélio/Neônio 1 (543nm) com filtro Rodamina para lectina de *Glicine max* TRITC e LysoTracker Red. A sonda Hoechst 33258 não foi analisada em microscopia confocal, uma vez que não há filtro adequado para leitura deste marcador no microscópio usado.

3.2.8. Imagens fotográficas

As imagens deste estudo, geradas pela análise em microscópio óptico comum e de fluorescência, foram obtidas com máquina fotográfica digital Nikon 4.0 megapixel, gentilmente cedida pelo Dr. Luciano Andrade Moreira (Laboratório de Malária/ CPqRR).

3.3. Avaliação da suscetibilidade do *S. mansoni* ao PZQ após vários tratamentos na fase intramolusco

Para verificar se o PZQ é capaz de gerar alguma alteração na suscetibilidade do *S. mansoni*, caso caramujos infectados sejam submetidos a sucessivos tratamentos com esta mesma droga, o seguinte esquema experimental foi desenvolvido.

3.3.1. Primeira Etapa

3.3.1.1. Caramujos e parasitos

Caramujos da espécie *B. glabrata*, mantidos rotineiramente pelo Moluscário do Centro de Pesquisa René Rachou/ FIOCRUZ foram utilizados. Os parasitos usados foram *S. mansoni*, da cepa LE, mantida no Centro de Pesquisa René Rachou/ FIOCRUZ.

3.3.1.2. Infecção dos caramujos

Os caramujos foram expostos a 10 miracídios de *S. mansoni* (cepa LE), segundo a técnica descrita por Souza (1993). Trinta dias após a exposição aos miracídios, os caramujos foram expostos à luz artificial, por 1 hora, para verificar a presença de cercárias.

3.3.1.3. Tratamento experimental

Os caramujos que eliminavam cercárias foram separados em grupos contendo 50 exemplares cada. Foram formados os seguintes grupos: caramujos infectados e tratados com PZQ (IT) e caramujos infectados e não tratados (I). Para cada um desses grupos, foram formados grupos controles contendo 30 caramujos cada: caramujos não expostos aos miracídios e tratados com PZQ (NT) e caramujos não expostos aos miracídios e não tratados (N). Os caramujos foram pesados e com a média do peso encontrada foi realizado o cálculo de 500mg/Kg (1º experimento) e 100mg/Kg (2º experimento) de PZQ, que foi incorporada à 100mg de ração, para cada caramujo. Esses caramujos foram mantidos individualmente, em copos plásticos com 200mL de água desclorada e tratados três vezes durante 5 dias consecutivos. No 5º dia, após o término do tratamento, os caramujos foram examinados e no dia seguinte (6º dia após o término do tratamento), iniciado o tratamento subsequente. Ao final do terceiro tratamento, os caramujos passaram a ser examinados semanalmente.

A ração utilizada para a incorporação da droga/ alimentação dos caramujos foi ração para camundongo da marca Novital (COMPOSIÇÃO). Essa ração foi autoclavada, triturada e a ela incorporados 10% de carbonato de cálcio. Para o tratamento foi adicionado água, até que a ração adquirisse uma consistência pastosa e possibilitasse a adição/ mistura da droga. Após a adição da droga, a mistura foi homogeneizada e separada em porções de 100mg de ração, quantidade esta que corresponde à alimentação diária de cada caramujo. Os caramujos não tratados foram mantidos nas mesmas condições, porém alimentados com alface.

Para avaliação da eliminação de cercárias, os caramujos foram expostos à luz artificial por 1 hora, individualmente. Os moluscos foram examinados semanalmente, após o término do terceiro e último tratamento. Os camundongos foram infectados, para a continuidade dos estudos, na semana em que os caramujos voltaram a eliminar cercárias em número suficiente para o inóculo individual.

3.3.2. Segunda Etapa

3.3.2.1. Animais e parasitos

Camundongos suíços, fêmeas, com aproximadamente 20g foram utilizados como modelo experimental nesta segunda fase do experimento. Para a infecção desses camundongos, foram utilizadas cercárias da cepa LE de *S. mansoni*, submetida a 3 tratamentos prévios com PZQ na fase intramolusco, esta chamada de LE-PZQ, e cercárias da cepa LE não submetida ao tratamento com PZQ, que serviu como base de comparação.

3.3.2.2. Infecção dos camundongos

Caramujos *B. glabrata* infectados com a cepa chamada LE-PZQ e LE (controle) foram expostos à luz artificial, individualmente, por 2 horas. Após esse período, o líquido contendo as cercárias foi transferido para um único recipiente, obtendo um “pool” de cercárias LE-PZQ e outro LE. De cada becker, foi retirada uma alíquota de aproximadamente 0,3mL e distribuída em uma placa escavada. As cercárias foram mortas com lugol e contadas com o auxílio de lupa. As alíquotas foram ajustadas, a fim de se obter uma concentração equivalente a 25 ± 5 cercárias, em um volume de 0,3mL.

Os camundongos foram inoculados no dorso, individualmente, por via subcutânea, segundo a técnica de Pellegrino e Katz (1968). A infecção foi realizada utilizando uma seringa de aço-inox com volume ajustável. Cinquenta camundongos foram infectados com 25 ± 5 cercárias LE-PZQ e outros cinquenta com 25 ± 5 cercárias da cepa LE, em um volume final de inóculo de 0,3mL por animal.

3.3.2.3. Tratamento experimental

Aos 45 dias de infecção, os animais foram divididos em 8 grupos, 4 com camundongos infectados com cepa LE e outros 4 com LE-PZQ, cada grupo contendo 12 animais. Os camundongos foram pesados individualmente e os cálculos da dose da droga realizados também individualmente. Os camundongos foram tratados com PZQ (Cestox - MERCK) nas dosagens de 200, 400 e 800mg/kg, e grupos controles, não tratados, também foram mantidos nas mesmas condições. Os comprimidos foram pesados e, posteriormente, realizado o cálculo do fator de correção (considerando-se apenas o princípio ativo, excluindo-se o excipiente). Com ajuda de pistilo, os comprimidos foram macerados e diluídos em água. A droga foi administrada com auxílio de seringa de gavagem por via oral, em dose única. Dois experimentos, seguindo o mesmo protocolo, foram realizados, em tempos distintos, para verificar a reprodutibilidade dos resultados. Os grupos e os esquemas terapêuticos utilizados estão descritos no Quadro 2.

Quadro 2 - Esquemas terapêuticos

Grupos	Infecção	Dosagem (PZQ)
1	LE	200mg/Kg
2	LE-PZQ	200mg/Kg
3	LE	400mg/Kg
4	LE-PZQ	400mg/Kg
5	LE	800mg/Kg
6	LE-PZQ	800mg/Kg
7	LE	Controle
8	LE-PZQ	Controle

LE-PZQ: cepa LE de *S. mansoni* submetida a três tratamentos na fase intramolusco do parasito; LE: cepa de *S. mansoni* não submetida a tratamento com PZQ (controle).

3.3.2.4. Recuperação de vermes

Trinta dias após o tratamento, os grupos tratados foram sacrificados por fratura cervical (exceto os grupos controles, que foram sacrificados 45 dias após a infecção). A perfusão foi realizada seguindo-se em linhas gerais a técnica descrita por Pellegrino e Siqueira (1956), resumidamente: conteúdo visceral foi exposto; fígado e mesentério separados pela ligadura da veia renal e a veia porta seccionada. Com o auxílio de uma agulha, acoplada a um pipetador automático (Brewer), injetou-se solução salina 0,85% heparinizada, na aorta descendente, permitindo, assim, a perfusão do sistema porta e das veias mesentéricas, recuperando-se os vermes presentes. Adicionalmente foi realizada a perfusão do fígado através da injeção de salina 0,85%, heparinizada, no hilo hepático. Os vermes foram, então, coletados em beakers de 200mL, contados e separados em macho e fêmea com auxílio de lupa.

Como mencionado acima, quarenta e cinco dias após a infecção, os camundongos dos grupos controle LE e LE-PZQ foram sacrificados e perfundidos. O fígado desses camundongos foi processado de acordo com Pelegrino & Katz (1968) para obtenção de miracídios e posterior infecção de caramujos. Seguindo o mesmo protocolo dos experimentos anteriores, trinta dias após a infecção, os caramujos foram examinados para verificar a presença de cercárias. No entanto, os caramujos não foram tratados; as cercárias, sem passar por um novo tratamento, foram utilizadas para infectar 50 camundongos com 25 ± 5 cercárias da cepa LE e outros 50 camundongos com 25 ± 5 cercárias da cepa LE-PZQ. Esses camundongos foram separados em grupo e tratados seguindo, o mesmo protocolo dos experimentos anteriores, com exceção do tratamento com 200mg/Kg, que não foi realizado devido ao número insuficiente de camundongos. Esse experimento foi chamado de experimento passagem 1.

3.4. Análise Estatística

A análise do efeito das drogas esquistossomicidas, OXA e PZQ, na fase intramolusco do parasito, foi realizada empregando-se o Teste de Kruskal-Wallis seguido das comparações múltiplas de Dunn's ou Tukey (1º e 4º experimentos) e Mann-Whitney (nos demais experimentos). No 5º experimento foi, ainda, realizada uma análise complementar utilizando-se o teste Kruskal-Wallis seguido das comparações múltiplas de Tukey, para comparar o

mesmo grupo nos vários exames. Com esses testes, foi possível verificar a ação das drogas nos diferentes tempos examinados, em um mesmo grupo, podendo-se obter, ao final da análise, uma cinética da eliminação de cercárias para cada um dos grupos. Para realizar a avaliação do efeito das drogas, levando em consideração o grupo controle, foi utilizado, em todos os experimentos, o teste de Kruskal-Wallis, seguido das comparações múltiplas de Dunn's, que permitem comparar simultaneamente os grupos tratados e não tratado (controle) nos diferentes períodos considerados.

Para verificar uma possível alteração na suscetibilidade da cepa LE-PZQ, em função da pré-exposição de caramujos infectados ao PZQ, testes analíticos comparando-se o número de vermes recuperados foram realizados. Uma comparação entre a média de vermes recuperados dos camundongos infectados com a cepa LE e LE-PZQ tratados com dosagem específica de PZQ (200, 400 ou 800mg/Kg) foi realizada. Para isso, utilizou-se o teste de Mann-Whitney, no caso de dados não paramétricos, e o Teste *t* de Student, se paramétricos, isto é, ajustando-se à curva normal de Gauss. Avaliou-se, ainda, o efeito das diferentes dosagens de PZQ (200, 400 e 800mg/Kg) sobre os vermes da cepa LE e LE-PZQ, separadamente. Utilizou-se como padrão de comparação a média de vermes recuperados dos grupos controles LE e LE-PZQ, não submetidos ao tratamento com PZQ. O teste utilizado foi o não paramétrico de Kruskal -Wallis, seguido das comparações múltiplas de Dunn's.

A reprodutibilidade dos experimentos 1 e 2 foi verificada, comparando-se o número de vermes recuperados nos grupos infectados com a mesma cepa e tratados com a mesma dosagem de PZQ, porém realizados em épocas diferentes. Utilizou-se, então, Teste *t*, quando os dados ajustavam-se à distribuição normal de Gauss, e o teste não paramétrico de Mann-Whitney, quando isso não ocorria.

Todas as análises deste estudo foram realizadas com 5% de significância, utilizando-se os programas estatísticos MINITAB 13 e PRISMA 3.

4 Resultados

4.1. Avaliação do efeito das drogas PZQ e OXA na fase intramolusco do parasito

Caramujos positivos (eliminando cercárias) foram tratados na fase pré-patente ou patente com 500mg/Kg de OXA, 1000mg/Kg de PZQ ou 250mg/Kg de OXA + 500mg/Kg de PZQ. A ação dessas drogas na fase intramolusco do parasito foi avaliada mediante a comparação entre a média de cercárias eliminadas pelos grupos tratados e não tratados, nos diferentes exames realizados. Seis experimentos distintos foram realizados e analisados separadamente. Esses experimentos foram divididos em Período Pré-Patente (1º, 2º e 3º experimentos) e Período Patente (4º, 5º e 6º experimentos).

Período Pré-Patente

1º Experimento

Neste primeiro experimento, o tratamento dos caramujos ocorreu aos 18 dias após a exposição aos miracídios. Nove exames pós-tratamento foram realizados, sendo estes 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63 e 70 dias pós-tratamento. Quatorze dias após o tratamento, observou-se que 100% caramujos pertencentes aos grupos tratados com OXA (IOR) e com PZQ (IPR) encontravam-se negativos, sendo estatisticamente diferentes ($p = 0,03$) da média de cercárias eliminadas pelos caramujos do grupo controle não tratado (I). Vinte e um dias após o término do tratamento, 50% dos caramujos do grupo IOR e IPR permaneciam sem eliminar cercárias. No entanto, não foi encontrada diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$), neste segundo exame, quando comparamos o número de cercárias eliminadas pelos grupos IOR e controle. Entretanto, a comparação entre o grupo IPR e controle revelou uma diferença estatisticamente significativa entre esses dois grupos ($p = 0,026$). Isso é possível já que a média de cercárias eliminadas pelo grupo IPR foi menor do que a média do grupo IOR. No terceiro exame realizado, ainda foi possível encontrar diferença estatisticamente significativa entre o grupo IPR e controle (I) ($p < 0,05$). A partir do quarto exame, não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre o número de cercárias eliminadas pelos grupos IOR e IPR quando comparados com o controle, embora, em ambos os grupos tratados, houvesse caramujos negativos (Gráfico 1). Ao final do experimento, apenas 2 dos 8 caramujos vivos do grupo IOR, permaneciam negativos, enquanto, no grupo IPR, 100% dos caramujos voltaram a eliminar cercárias.

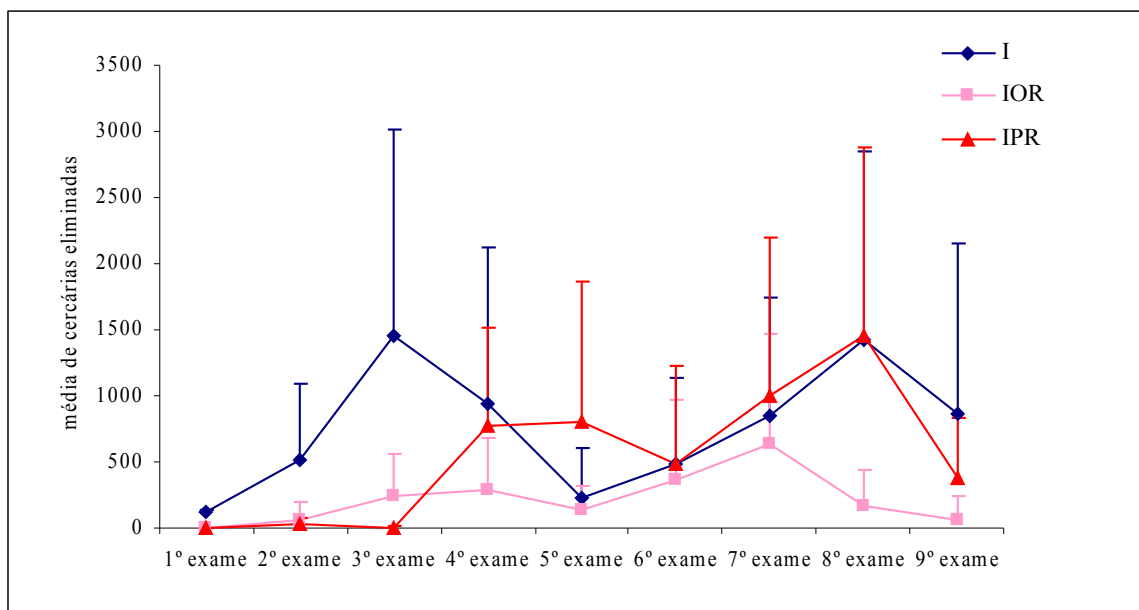


Gráfico 1 - Gráfico referente às médias de cercárias eliminadas e ao desvio padrão nos nove exames realizados no 1º experimento (período pré-patente) para avaliação do efeito das drogas na fase intramulusco do parasito. I: caramujos infectados e não tratados; IOR: caramujos infectados e tratados com 500mg/Kg de OXA; IPR: caramujos infectados e tratados com 1000mg/Kg de PZQ.

Ambas as drogas retardaram o desenvolvimento do parasito em, aproximadamente, 10 dias. O tratamento com PZQ manteve uma redução da eliminação de cercárias por um período maior do que o tratamento com OXA. Observou-se que o tratamento, independente da droga utilizada, não levou à morte dos caramujos, uma vez que o número de caramujos vivos ao final do experimento, nos grupos de caramujos não expostos aos miracídios tratados com OXA (NOR) e tratados com PZQ (NPR), foi o mesmo no grupo de caramujos não expostos aos miracídios não tratados (N), 15. Já a infecção, independente da presença ou não do tratamento, causou a mortalidade de, aproximadamente, 50% dos grupos IOR, IPR e I (Gráfico 2).

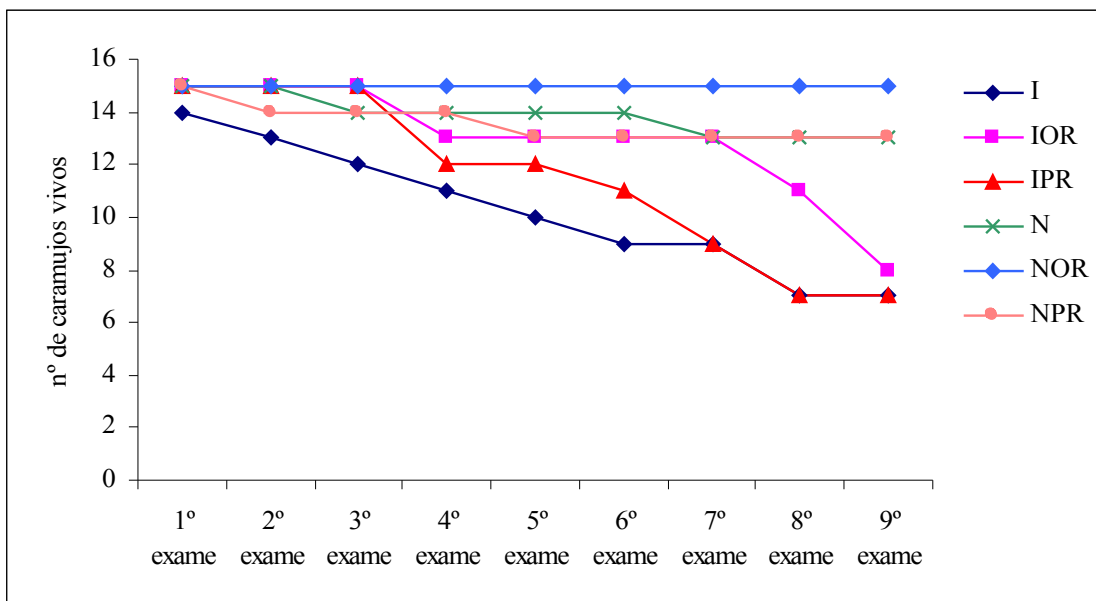


Gráfico 2 - Cinética da mortalidade dos caramujos pertencentes ao 1º experimento. I: caramujos infectados e não tratados; IOR: caramujos infectados e tratados com 500mg/Kg de OXA; IPR: caramujos infectados e tratados com 1000mg/Kg de PZQ; N: caramujos não infectados e não tratados; NOR: caramujos não infectados e tratados com 500mg/Kg de OXA; NPR: caramujos não infectados e tratados com 1000mg/Kg de PZQ.

2º Experimento

Seis exames foram realizados neste segundo experimento, sendo estes 14, 21, 28, 35, 42 e 49 dias após o tratamento. Demonstrou-se que o tratamento, aos 18 dias de infecção com a associação de 250mg/Kg de OXA + 500mg/Kg de PZQ, gerou, até o 4º exame (35 dias pós-tratamento), uma diferença estatisticamente significativa ($p < 0,002$) na média de cercárias eliminadas pelo grupo tratado (IT) em relação ao grupo não tratado (I) (Gráfico 3). No primeiro exame realizado, todos os caramujos do grupo IT permaneciam negativos, enquanto os caramujos do grupo controle (I) estavam eliminando uma média de 1240 cercárias por caramujo.

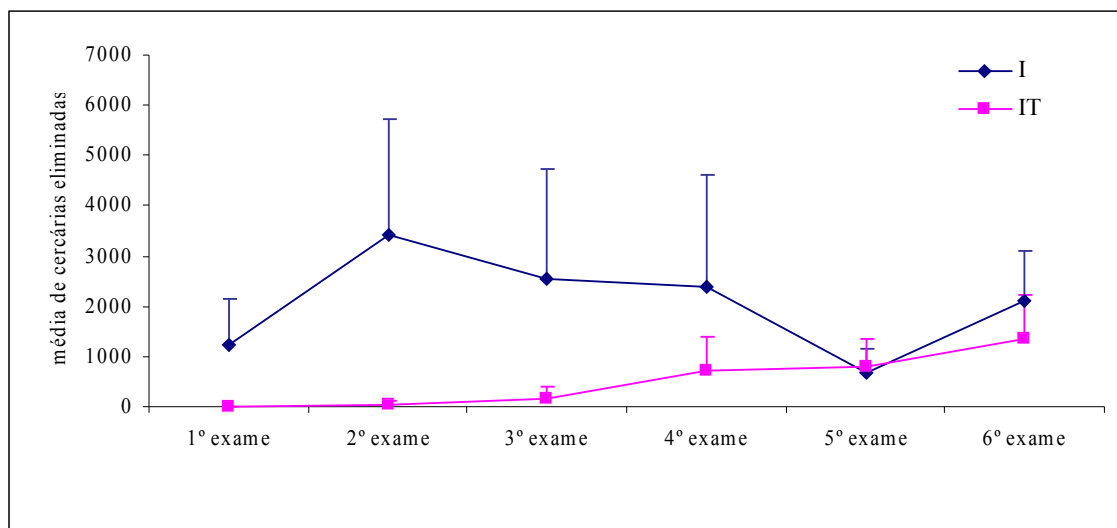


Gráfico 3 - Gráfico referente às médias de cercárias eliminadas e ao desvio padrão nos seis exames realizados no 2º experimento (período pré-patente) para avaliação do efeito das drogas na fase intramolusco do parasito. I: caramujos infectados e não tratados; IT: caramujos infectados e tratados uma vez com 250mg/Kg de OXA + 500mg/Kg de PZQ.

O tratamento com a associação das drogas retardou o desenvolvimento do parasito sendo, o período pré-patente do grupo tratado maior do que o do grupo controle. Quatorze caramujos do grupo I, 22 caramujos do grupo IT e 28 caramujos não expostos aos miracídios e tratados (NT) e não tratados (N) permaneceram vivos até o final do experimento (Gráfico 4), mostrando que um tratamento com a associação OXA/PZQ não é responsável pela morte dos caramujos, já que os caramujos IT sobreviveram mais do que os caramujos infectados e não tratados (I) e os caramujos do grupo NT sobreviveram em mesmo número que os caramujos do grupo N.

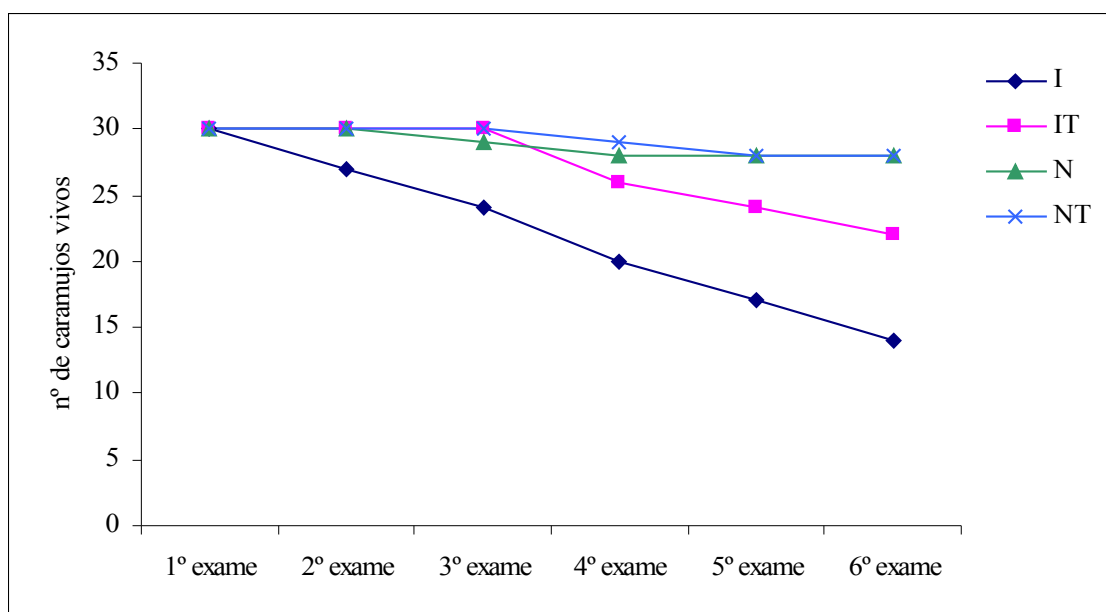


Gráfico 4 - Cinética da mortalidade dos caramujos pertencentes ao 2º experimento. I: caramujos infectados e não tratados; IT: caramujos infectados e tratados com 250mg/Kg de OXA + 500mg/Kg de PZQ; N: caramujos não infectados e não tratados; NT: caramujos não infectados e tratados com 250mg/Kg de OXA + 500mg/Kg de PZQ.

3º Experimento

Dois tratamentos foram realizados no terceiro experimento, sendo estes aos 18 e 32 dias após a infecção. Nove exames foram realizados pós-tratamento, 14 dias após o 1º tratamento, 3, 10, 17, 24, 31, 38, 52, 60 dias pós 2º tratamento. Observou-se uma diferença estatisticamente significativa ($p < 0,02$) na média de cercárias eliminadas pelos caramujos infectados e tratados (IT) em relação à média de cercárias eliminadas pelo grupo de caramujos infectados e não tratados (I) até o 6º exame (31 dias após o 2º tratamento). Neste 6º exame, 95,8% dos caramujos do grupo IT permaneciam sem eliminar cercárias. A partir do 7º exame (38 dias pós-tratamento), não foi possível observar uma diferença estatisticamente significativa entre a média de cercárias eliminadas pelo grupo IT e I (Gráfico 5). No entanto, ao final do experimento, 61,5% dos caramujos do grupo IT permaneceram negativos.

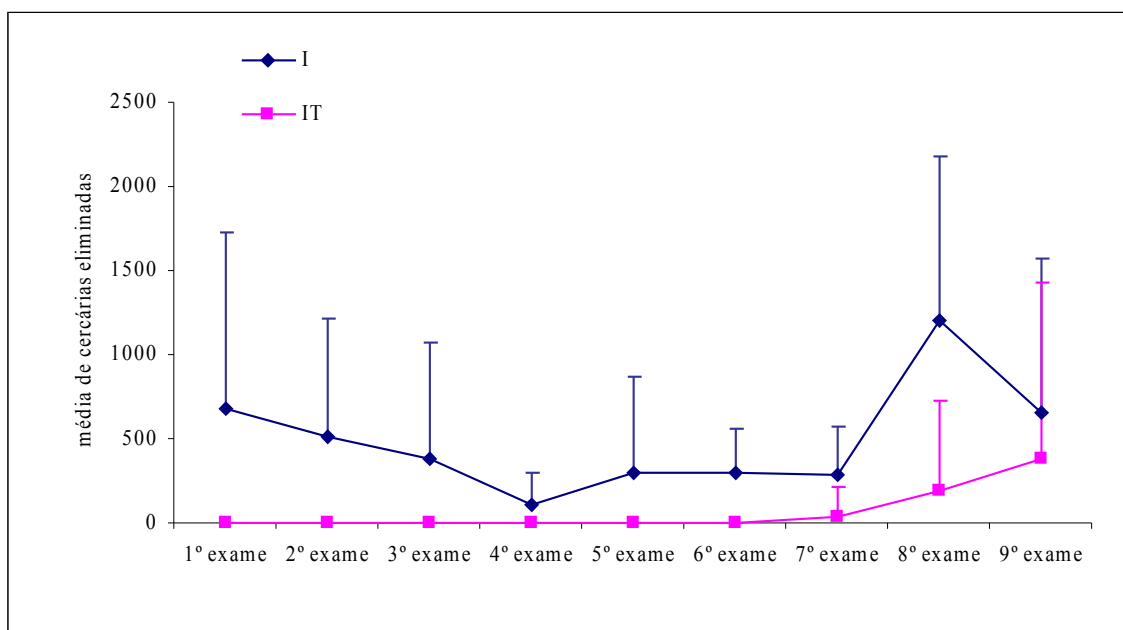


Gráfico 5 - Gráfico referente às médias de cercárias eliminadas e ao desvio padrão nos nove exames realizados no 3º experimento (período pré-patente) para avaliação do efeito das drogas na fase intramolusco do parasito. I: caramujos infectados e não tratados; IT: caramujos infectados e tratados duas vezes com 250mg/Kg de OXA + 500mg/Kg de PZQ.

Dois tratamentos, com a associação das drogas, retardaram ainda mais o desenvolvimento do parasito quando comparamos esses resultados com os obtidos no experimento anterior. Porém não foi suficiente para abortar a infecção. Apenas 2 caramujos I

permaneceram vivos ao final do experimento, enquanto 13 caramujos IT, 25 caramujos não expostos aos miracídios e tratados (NT) e 28 caramujos não expostos aos miracídios e não tratados (N) sobreviveram (Gráfico 6). Esse resultado mostra que dois tratamentos, com a associação OXA/PZQ, na fase pré-patente da infecção, aumentaram a sobrevivência dos caramujos do grupo IT, quando comparados com os caramujos do grupo I.

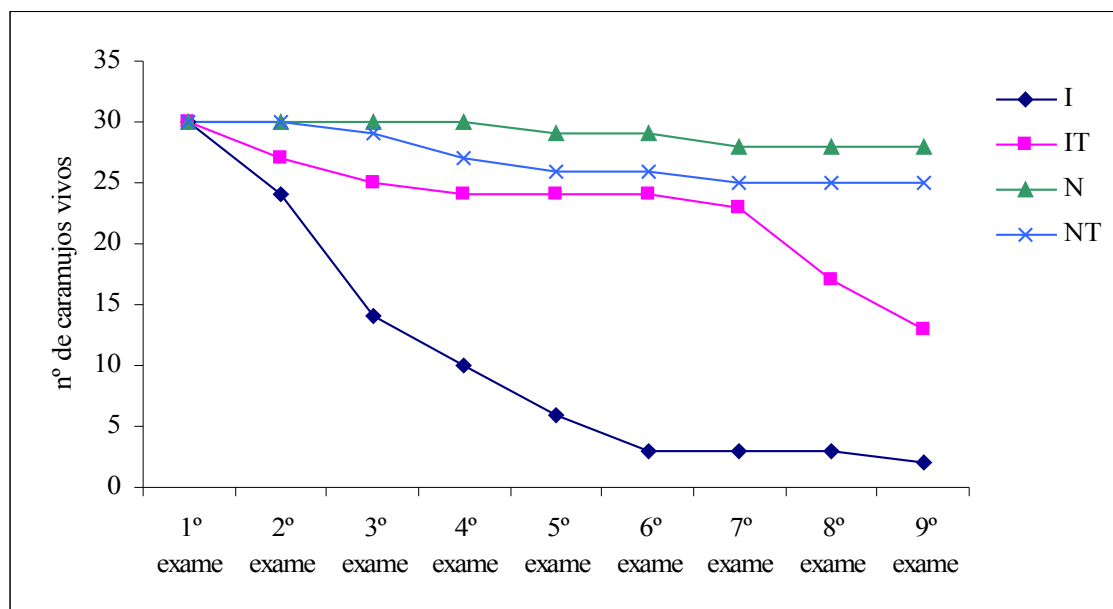


Gráfico 6 - Cinética da mortalidade dos caramujos pertencentes ao 3º experimento. I: caramujos infectados e não tratados; IT: caramujos infectados e tratados com 250mg/Kg de OXA + 500mg/Kg de PZQ; N: caramujos não infectados e não tratados; NT: caramujos não infectados e tratados com 250mg/Kg de OXA + 500mg/Kg de PZQ.

4º Experimento

No quarto experimento, os caramujos foram tratados aos 32 dias após a exposição à miracídios. Quatro exames foram realizados sendo estes aos 5, 12, 19 e 26 dias após o término do tratamento. Cinco dias após o término do tratamento, foi possível observar uma redução estatisticamente significativa ($p < 0,05$) na média de cercárias eliminadas pelos caramujos pertencentes aos grupos tratados (IOR e IPR), quando comparados com o grupo controle não tratado (I). No primeiro exame, 69,2% dos exemplares do grupo de caramujos infectados e tratados com OXA (IOR) estavam negativos, enquanto que 100% dos caramujos infectados e tratados com PZQ (IPR) permaneceram sem eliminar cercárias. No 12º, 19º e 26º dia, após o término do tratamento, ocorreu um aumento na porcentagem de caramujos eliminando cercárias e conseqüente aumento na média de cercárias eliminadas pelos caramujos pertencentes aos grupos IOR e IPR. No entanto, essa média permaneceu estatisticamente menor ($p < 0,05$) quando comparada com o grupo não tratado (Gráfico 7).

Além disso, foi possível verificar, para o grupo IOR, que não há diferença estatisticamente significativa, entre a média de cercárias eliminadas no último exame pós-tratamento e a média eliminada antes do tratamento ($p>0,05$), mostrando que os caramujos voltaram a eliminar cercárias em números semelhantes aos anteriores ao tratamento. Por outro lado, foi possível observar que a média de cercárias eliminadas pelos caramujos do grupo IPR, no quarto exame, é estatisticamente menor do que a média eliminada pelos caramujos deste mesmo grupo, antes do tratamento ($p<0,01$). Demonstrou-se que, após o tratamento com PZQ, os caramujos voltaram a eliminar cercárias, porém em números bem menores do que os observados antes do tratamento.

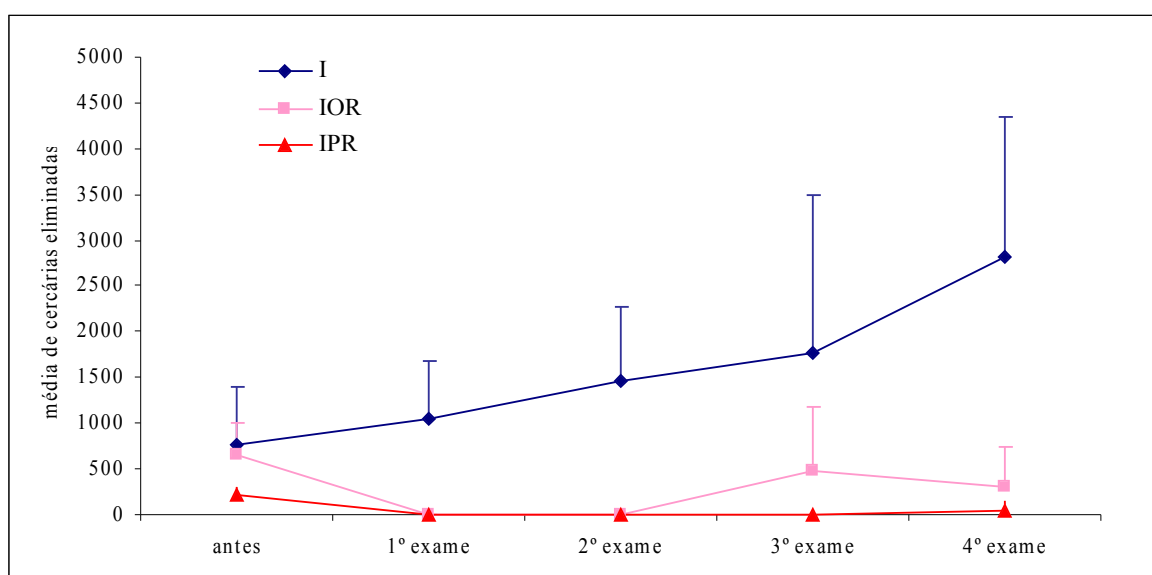


Gráfico 7 - Gráfico referente às médias de cercárias eliminadas e ao desvio padrão nos quatro exames realizados no 4º experimento (período patente) para avaliação do efeito das drogas na fase intramolusco do parasito. I: caramujos infectados e não tratados; IOR: caramujos infectados e tratados com 500mg/Kg de OXA; IPR: caramujos infectados e tratados com 1000mg/Kg de PZQ.

O tratamento com ambas as drogas foi efetivo na redução da eliminação de cercárias quando comparadas com o controle. Além disso, os caramujos tratados com PZQ não voltaram a eliminar cercárias em números semelhantes aos anteriores ao tratamento. O mesmo não foi observado para o tratamento com OXA. A mortalidade foi elevada no grupo IPR: apenas 4 caramujos permaneceram vivos ao final do experimento. Nos grupos IOR e I a taxa de sobrevivência foi maior, sendo encontrados vivos, ao término do experimento, 10 e 9 caramujos, respectivamente. Cem por cento dos grupos controles não expostos aos miracídios e não tratados (N), não expostos aos miracídios e tratados com OXA (NOR) e 13 caramujos não expostos aos miracídios e tratados com PZQ (NPR) permaneceram vivos ao final do experimento (Gráfico 8). Embora grande parte dos caramujos pertencentes ao grupo IPR tenha morrido, observa-se que não foi o tratamento com PZQ o responsável pela morte

destes caramujos, uma vez que mais de 85% dos caramujos do grupo NPR permaneceram vivos.

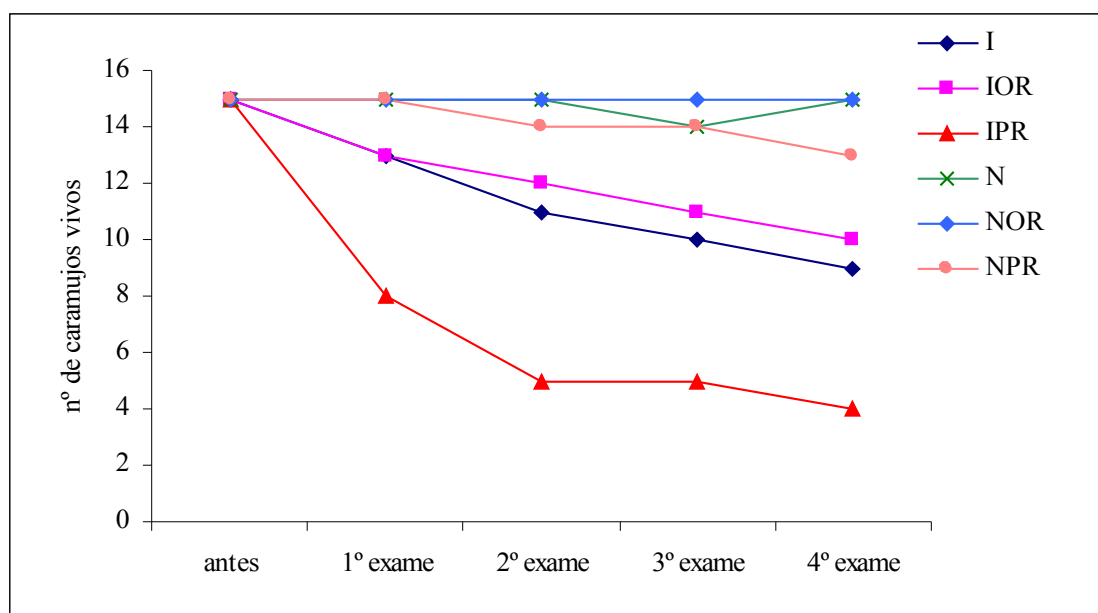


Gráfico 8 - Cinética da mortalidade dos caramujos pertencentes ao 4º experimento. I: caramujos infectados e não tratados; IOR: caramujos infectados e tratados com 500mg/Kg de OXA; IPR: caramujos infectados e tratados com 1000mg/Kg de PZQ; N: caramujos não infectados e não tratados; NOR: caramujos não infectados e tratados com 500mg/Kg de OXA; NPR: caramujos não infectados e tratados com 1000mg/Kg de PZQ.

5º Experimento

No 32º dia após a exposição aos miracídeos, os caramujos do segundo experimento foram tratados com 250mg/Kg de OXA + 500mg/kg de PZQ. Seis exames foram realizados, sendo um antes do tratamento e cinco pós-tratamento: 5, 12, 19, 26 e 33 dias após o término do tratamento. Foi possível observar que, em todos os períodos analisados, houve uma redução estatisticamente significativa ($p < 0,05$) na média de cercárias eliminadas pelo grupo de caramujos infectados e tratados (IT), quando comparado com a média do grupo controle (caramujos infectados não tratados – I). No 1º exame realizado pós-tratamento, todos os caramujos do grupo IT encontravam-se negativos. Ao final do experimento, 50% dos caramujos vivos do grupo IT permaneceram sem eliminar cercárias (Gráfico 9). Quando comparamos a média de cercárias eliminadas pelos caramujos de grupo IT, antes e após o tratamento, verificamos que, ao final do experimento, os caramujos eliminaram uma média de cercárias estatisticamente menor ($p < 0,01$) do que a média eliminada antes do tratamento.

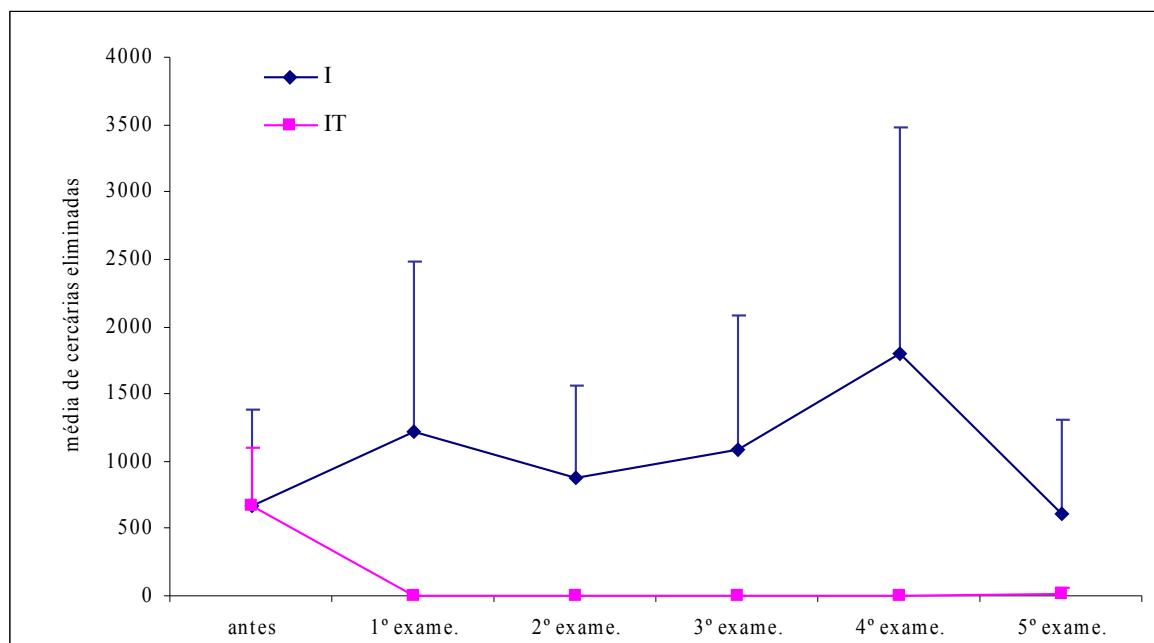


Gráfico 9 - Gráfico referente às médias de cercárias eliminadas e ao desvio padrão nos cinco exames realizados no 5º experimento (período patente) para avaliação do efeito das drogas na fase intramolusco do parasito. I: caramujos infectados e não tratados; IT: caramujos infectados e tratados uma vez com 250mg/Kg de OXA + 500mg/Kg de PZQ.

O tratamento com a associação das drogas foi efetivo na supressão da eliminação de cercarias, levando à “cura” de quatro dos oito caramujos do grupo IT, vivos ao final do experimento. Uma alta mortalidade foi observada nos grupos I e IT. Apenas 9 caramujos do grupo I e 8 caramujos do grupo IT permaneceram vivos ao final do experimento. Acredita-se que a infecção associada ao tratamento tenha sido responsável pela morte dos caramujos, já que nos grupos de caramujos não expostos aos miracídios e tratados (NT) e caramujos não expostos aos miracídios não tratados (N) 100% dos caramujos permaneceram vivos (Gráfico 10).

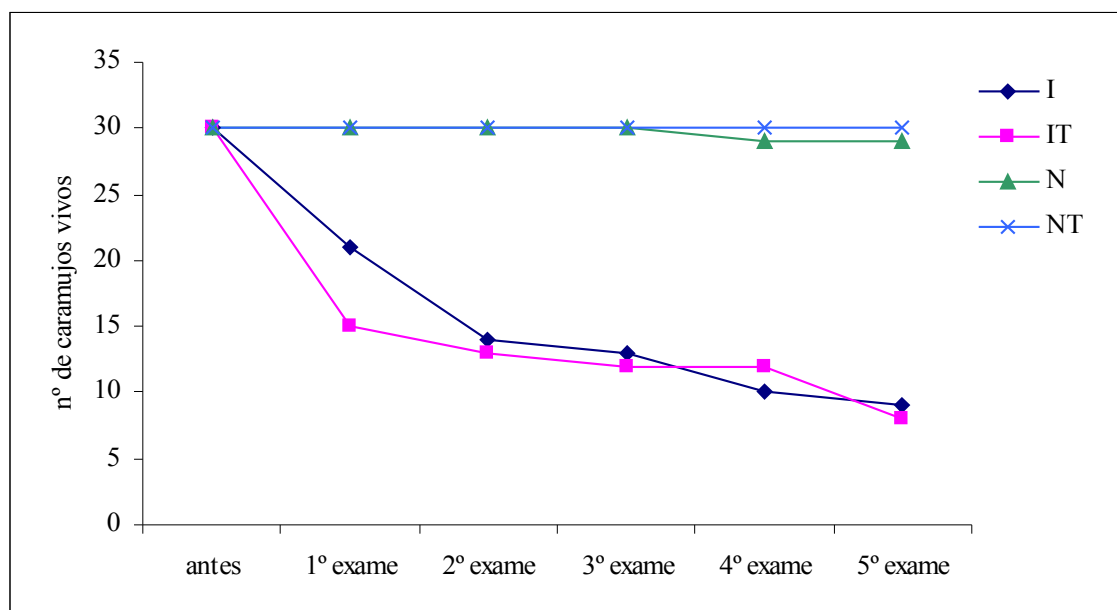


Gráfico 10 - Cinética da mortalidade dos caramujos pertencentes ao 5º experimento. I: caramujos infectados e não tratados; IT: caramujos infectados e tratados com 250mg/Kg de OXA + 500mg/Kg de PZQ; N: caramujos não infectados e não tratados; NT: caramujos não infectados e tratados com 250mg/Kg de OXA + 500mg/Kg de PZQ.

6º Experimento

No sexto experimento, os caramujos foram tratados com 250mg/Kg de OXA + 500mg/Kg de PZQ aos 32 e 42 dias após a exposição aos miracídeos. Os caramujos foram submetidos a cinco exames, sendo estes aos 5 dias após o 1º tratamento e aos 5, 12, 19 e 21 dias após o 2º tratamento. Observou-se uma redução estatisticamente significativa ($p < 0,05$) da média de cercárias eliminadas pelo grupo de caramujos infectados e tratados (IT) em relação à média de cercárias eliminadas pelo grupo de caramujos infectados não tratados (I) até o 2º exame realizado após o tratamento (5 dias após o 2º tratamento). Devido à alta mortalidade observada no grupo de caramujos infectados e não tratados (I) (a partir do 4º exame pós-tratamento não havia caramujos vivos), não foi possível dar continuidade à análise estatística, utilizando este grupo. No entanto, ao final do experimento, sete caramujos do grupo IT permaneciam vivos e sem eliminar cercárias (Gráfico 11). Dessa forma, há uma diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre a média de cercárias eliminadas pelos caramujos do grupo IT, antes e após o tratamento.

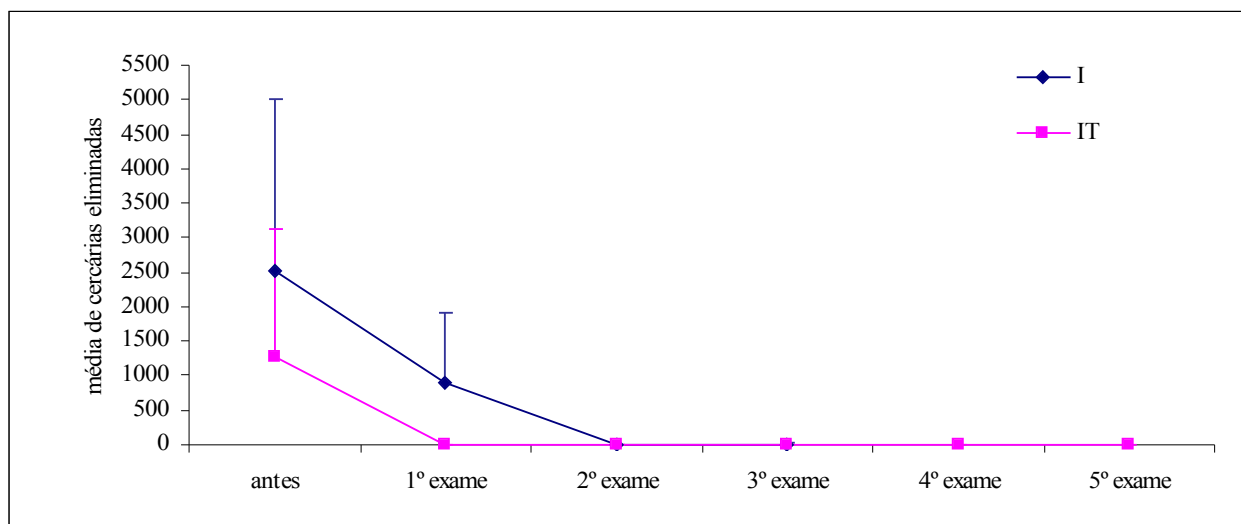


Gráfico 11 - Gráfico referente às médias de cercárias eliminadas e ao desvio padrão nos cinco exames realizados no 6º experimento (período patente) para avaliação do efeito das drogas na fase intramolusco do parasito. I: caramujos infectados e não tratados; IT: caramujos infectados e tratados duas vezes com 250mg/Kg de OXA + 500mg/Kg de PZQ.

Dois tratamentos com a associação das drogas foram efetivos na redução da eliminação de cercárias, levando à “cura” de todos os sete caramujos do grupo IT vivos, ao final de experimento. Ao final do experimento, 100% dos exemplares dos grupos de caramujos não expostos aos miracídios e tratados (NT) e não expostos aos miracídios e não tratados (N) encontravam-se vivos. Embora uma alta mortalidade tenha sido observada no grupo de caramujos infectados e tratados (IT), acredita-se, mais uma vez, que o tratamento foi responsável por aumentar a sobrevivência dos caramujos do grupo IT, já que, ao final do experimento, não havia caramujos do grupo I vivos (Gráfico 12).

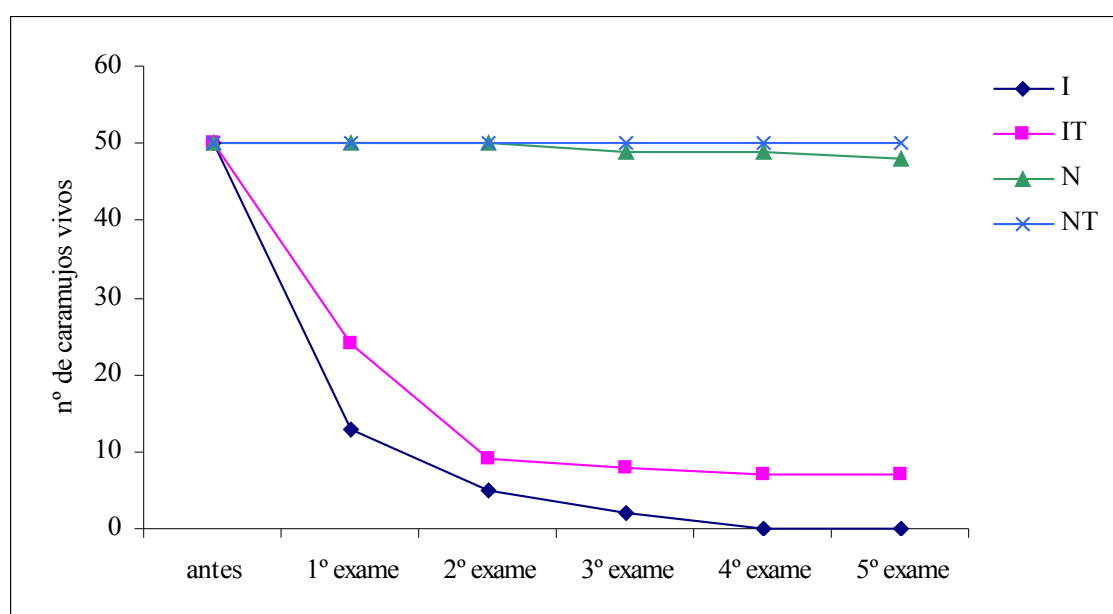


Gráfico 12 - Cinética da mortalidade dos caramujos pertencentes ao 6º experimento. I: caramujos infectados e não tratados; IT: caramujos infectados e tratados com 250mg/Kg de OXA + 500mg/Kg de PZQ; N: caramujos não infectados e não tratados; NT: caramujos não infectados e tratados com 250mg/Kg de OXA + 500mg/Kg de PZQ.

4.2. Experimentos “*in vitro*”

4.2.1. Experimento 1 – Avaliação da ação do PZQ sobre esporocistos transformados “*in vitro*”

Observou-se que o PZQ, independentemente da concentração utilizada (5µg/mL ou 10µg/mL), gera uma nítida contração no esporocisto, facilmente visível à microscopia óptica convencional. É interessante observar que essa contração parece ser diretamente proporcional à concentração da droga, ou seja, em maiores concentrações, a contração se torna mais evidente. (Figura 3). Além disso, é importante salientar que, mesmo apresentando essa alteração morfológica, os esporocistos permaneciam vivos e se movendo.



Figura 3 - Avaliação da ação do PZQ sobre os esporocistos transformados “*in vitro*”. (A) esporocisto não exposto ao PZQ; morfologia normal. A seta indica a perda da placa ciliar. (B) esporocisto exposto a 5µg/mL de PZQ. (C) esporocisto exposto a 10µg/mL de PZQ; nítida contração e alteração no formato do parasito. Imagens visualizadas em microscopia óptica comum. Barras = 20µm.

4.2.2. Experimento 2 – Avaliação do efeito do PZQ sobre a membrana de esporocistos transformados “*in vitro*”

Para avaliar o efeito do PZQ sobre a membrana de esporocistos, dois experimentos em paralelo foram realizados. Em um dos experimentos, foi utilizada a sonda Hoechst 33258 e

em outro, o marcador lectina de *Glicine max*. Os esporocistos foram marcados e, posteriormente, expostos à diferentes concentrações da droga. No que diz respeito à sonda Hoechst 33258, foi possível verificar uma leve marcação no grupo controle (Figura 4A). No entanto, nos grupos, nos quais o PZQ foi adicionado, observou-se que essa marcação foi mais intensa. Dessa forma, além da alteração no formato do esporocisto, foi possível visualizar um aumento na fluorescência naqueles esporocistos submetidos ao contato com a droga (Figura 4B e C), fato esse que sugere a presença de dano na membrana. Em relação à lectina *Glicine max*, os esporocistos controle (não expostos à droga) não apresentaram nenhuma marcação, podendo chamá-los de negativos (Figura 4D e E). Porém, os esporocistos colocados em contato com a droga apresentaram forte marcação, independentemente da concentração de droga utilizada. Ocorreu uma nítida marcação da membrana, ao redor de todo o parasito (Figura 4F – G e 4H-I).

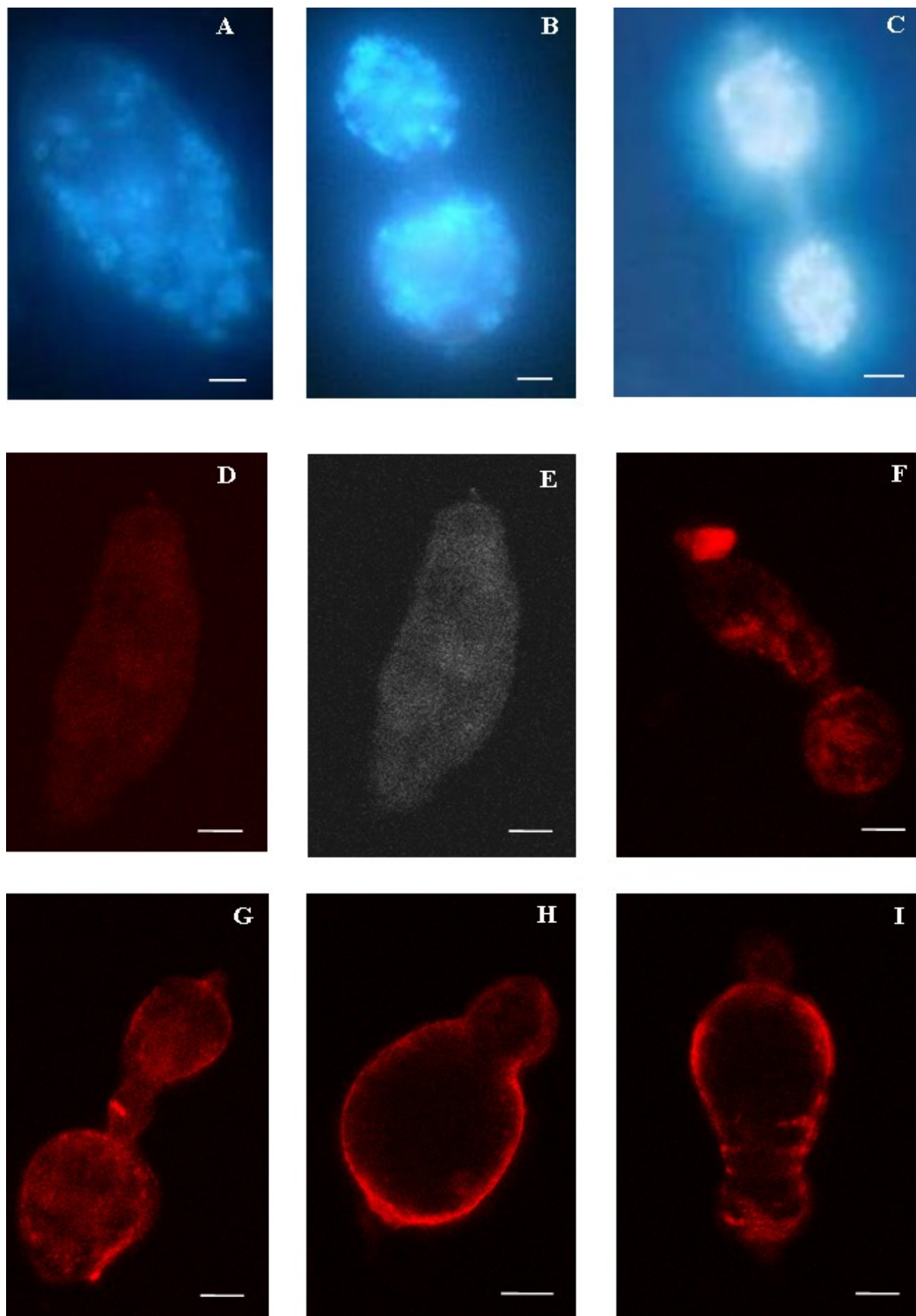


Figura 4 - Avaliação da ação do PZQ sobre a membrana de esporocistos transformados "*in vitro*". (A – C) parasitos marcados com Hoechst 33258. Imagens visualizadas por microscopia de fluorescência. (A) esporocisto controle; (B e C) esporocistos expostos a 5µg/mL e 10µg/mL de PZQ, respectivamente. É possível verificar leve marcação no controle e um aumento na fluorescência naqueles expostos à droga. (D - I) esporocistos marcados com lectina de

Glicine max. (D e E) parasitos controles; (F e G) esporocistos expostos a 5 μ g/mL de PZQ; (H e I) esporocistos expostos a 10 μ g/mL de PZQ. A marcação com a sonda só é visível nos esporocistos expostos à droga. Imagens geradas por microscopia laser confocal. Barras = 20 μ m.

4.2.3. Experimento 3 – Avaliação da presença de vesículas ácidas semelhantes a lisossomos em esporocistos e do efeito do PZQ sobre essas organelas ácidas

Os resultados dos esporocistos expostos à sonda LysoTracker Red mostram uma nítida marcação de vesículas ácidas (lisossomos), demonstrando, pela primeira vez, a presença dessas organelas nesse estágio do ciclo de vida do *S. mansoni*. Além da presença dessas organelas, foi possível verificar que o PZQ interfere na formação desses lisossomos. Os esporocistos expostos ao PZQ nas concentrações de 5 μ g/mL e 10 μ g/mL (Figura 5C-D e 5E-F, respectivamente), além de terem o seu formato alterado, também possuem uma maior área marcada pela sonda do que os esporocistos controle (Figura 5A e B), não expostos à droga.

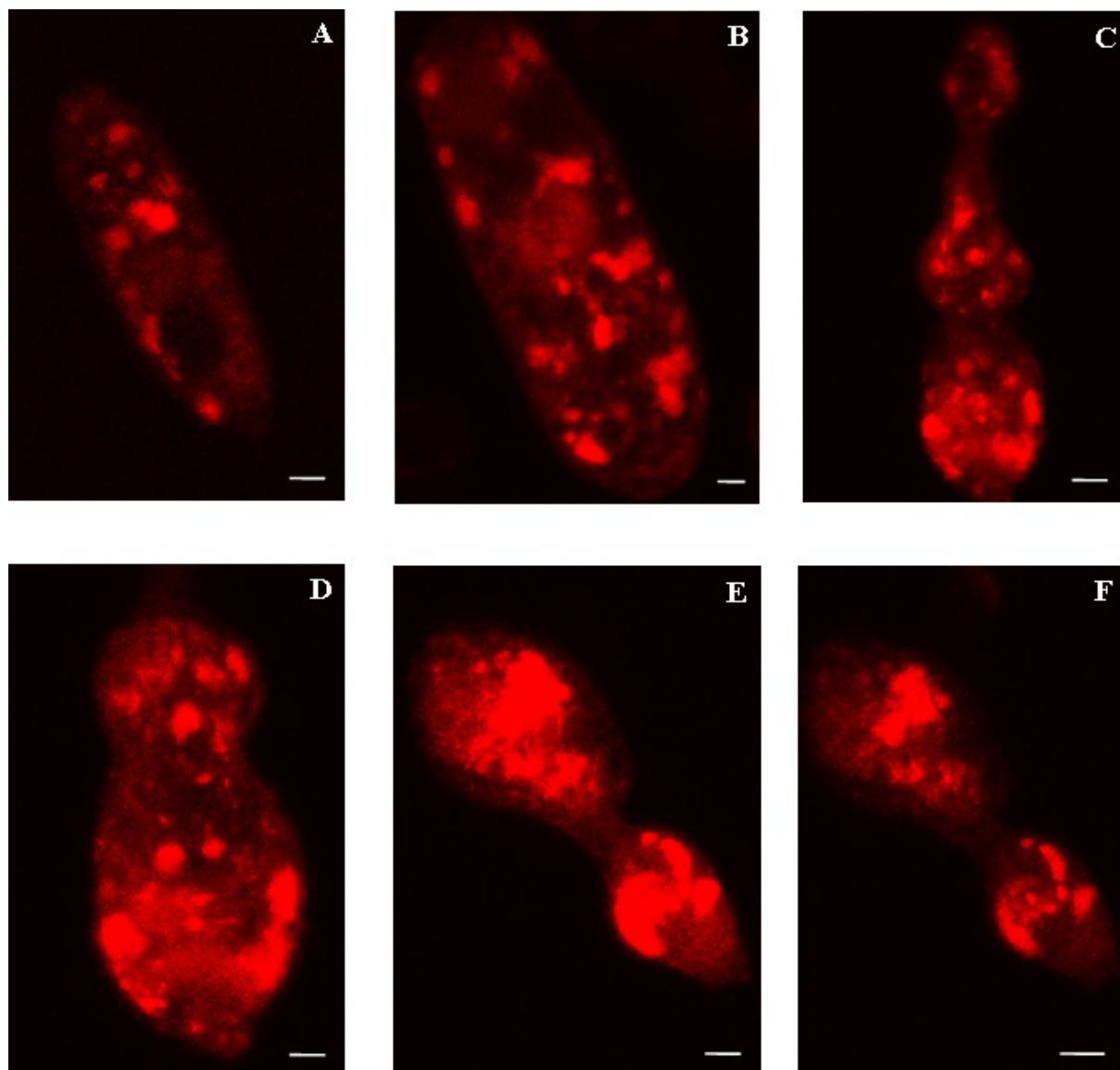


Figura 5 - Avaliação da presença de organelas ácidas semelhantes a lisossomos em esporocistos transformados “*in vitro*” e do efeito do PZQ sobre essas organelas. (A e B) esporocistos marcados com 5 μ L de LysoTracker Red e não expostos ao PZQ; presença de algumas vesículas ácidas; (C e D) esporocistos marcados com LysoTracker Red e expostos a 5 μ g/mL de PZQ; presença de uma maior área marcada. Imagens geradas por microscopia laser confocal. Barras: A, C, E e F = 20 μ m; B e D = 10 μ m.

4.3. Avaliação da suscetibilidade do *S. mansoni* ao PZQ após vários tratamentos na fase intramolusco

Os resultados do experimento “*in vivo*” da ação do PZQ sobre a fase intramolusco do parasito mostraram que o PZQ gera uma interrupção imediata da eliminação de cercárias e que essas voltam a ser eliminadas em números bem menores aos encontrados antes do

tratamento. Diante disso, decidiu-se avaliar se essas cercárias, provenientes de caramujos tratados, poderiam gerar vermes adultos menos susceptíveis à droga do que as cercárias provenientes de caramujos não tratados, em função de uma pressão seletiva quimioterápica. Para isso, dois esquemas terapêuticos diferentes foram utilizados.

O esquema terapêutico utilizado no 1º experimento, no qual os caramujos foram submetidos a três tratamentos, durante cinco dias consecutivos, com 500mg/Kg de PZQ, foi considerado excessivo, uma vez que trinta dias após o último tratamento, os caramujos não haviam voltado a eliminar cercárias, não sendo possível continuar os estudos.

Um segundo experimento, com esquema terapêutico diferente foi, então, realizado. Nesse experimento, os caramujos foram tratados três vezes com 100mg/Kg de PZQ, durante cinco dias consecutivos. Vinte e cinco dias após o último tratamento, os caramujos voltaram a eliminar cercárias. Aos quarenta dias após o último tratamento, os caramujos já estavam eliminando cercárias em quantidade suficiente para infectar o número de camundongos necessários para dar continuidade aos estudos. Dois experimentos, seguindo o mesmo protocolo e esquema terapêutico, foram realizados. Os resultados desses experimentos foram analisados separadamente.

Experimento 1

Tabela 1 - Número de vermes vivos recuperados após perfusão das veias mesentéricas e do fígado de camundongos infectados com 25 cercárias das cepas LE e LE – PZQ de *S. mansoni* e tratados com diferentes dosagens de PZQ, trinta dias após o tratamento.

Tratamento/ Cepa	nº de camundongos vivos ao final do experimento	Distribuição de Vermes (%)		Média de vermes recuperados	Desvio Padrão (DP)	
		Mesentério	Fígado			
200mg/Kg	LE	12	53,0	47,0	3,83	2,368
	LE - PZQ	10	35,83	64,17	3,9	2,514
400mg/Kg	LE	12	16,98	83,01	1,5	1,243
	LE - PZQ	10	10,81	89,19	1,2	1,476
800mg/Kg	LE	12	5,26	94,73	0,75	1,215
	LE - PZQ	10	8,23	91,76	1,0	1,155
controle	LE	12	88,68	11,32	4,416	4,166
	LE - PZQ	11	75,27	24,73	8,4	5,492

Para avaliar o efeito das diferentes dosagens de PZQ sobre a cepa LE e LE – PZQ, foi utilizado o teste de Kruskal – Wallis, seguido das comparações múltiplas de Dunn's. No que diz respeito à cepa LE, o tratamento com 800mg/Kg levou a uma redução da carga parasitária, estatisticamente significativa ($p < 0,05$), quando comparado com o grupo controle. Porém, os

tratamentos com 200mg/Kg e 400mg/Kg de PZQ se mostraram estatisticamente semelhantes ao controle, e ainda geraram resultados estatisticamente similares, quando comparados entre si. Além disso, o tratamento com 800mg/Kg se mostrou, estatisticamente, mais eficiente do que 200mg/Kg ($p < 0,01$), mas semelhante ao de 400mg/Kg. Em relação à média de vermes recuperados dos camundongos infectados com cercárias previamente expostas ao PZQ (LE – PZQ), os tratamentos com 400mg/Kg e 800mg/Kg se mostraram efetivos na redução da carga parasitária, sendo estatisticamente diferentes do grupo controle ($p < 0,01$). Apenas o tratamento com 200mg/Kg foi semelhante ao grupo controle. Em ambas as “cepas”, o tratamento com 800mg/Kg não foi capaz de eliminar todos os parasitos. Quando comparamos, através do teste de Mann – Whitney, a média de vermes recuperados dos camundongos tratados com mesmo esquema terapêutico, porém infectados com cercárias “diferentes” (proveniente de caramujos não tratados – LE (controle) ou provenientes de caramujos tratados - LE – PZQ) não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre elas ($p > 0,05$) (Tabela 1, Gráfico 13).

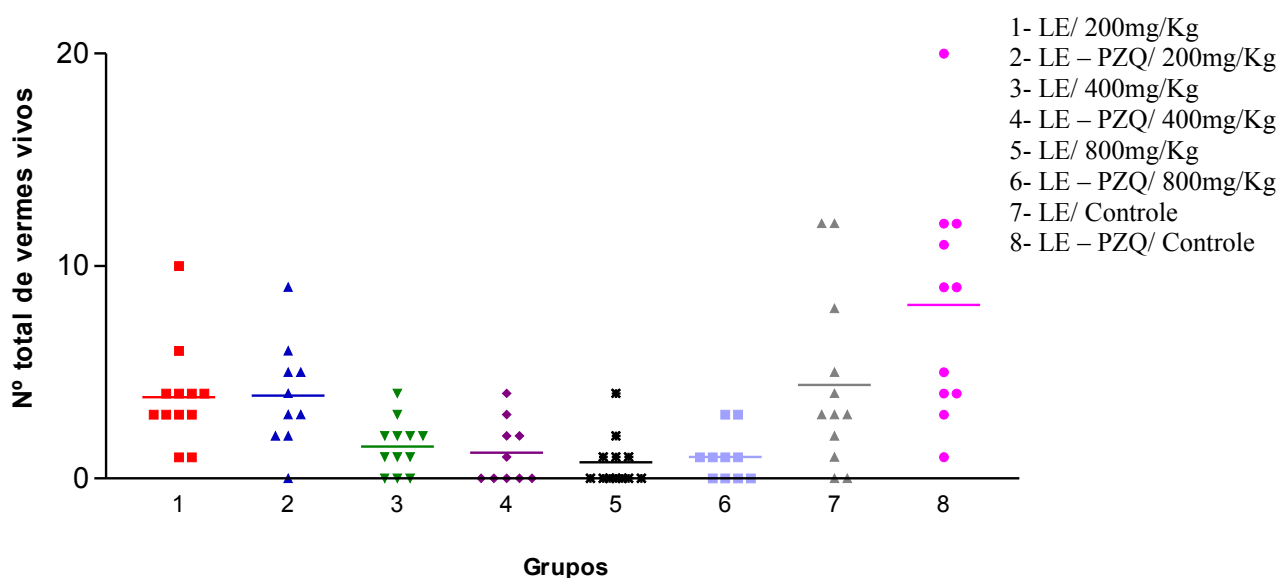


Gráfico 13 - Gráfico de dispersão do número total de vermes vivos recuperados por animal dos grupos controles e experimentais e suas respectivas medianas (—) referentes ao experimento 1.

Experimento 2

Tabela 2 - Número de vermes vivos recuperados após perfusão das veias mesentéricas e do fígado de camundongos infectados com 25 cercárias das cepas LE e LE – PZQ de *S. mansoni* e tratados com diferentes dosagens de PZQ, trinta dias após o tratamento.

Tratamento/ Cepa		n° de camundongos vivos ao final do experimento	Distribuição de Vermes (%)		Média de vermes recuperados	Desvio Padrão (DP)
			Mesentério	Fígado		
200mg/Kg	LE	10	51,02	48,98	3,4	2,675
	LE - PZQ	12	35,85	64,15	2,25	2,137
400mg/Kg	LE	12	12,16	83,84	1,5	1,446
	LE - PZQ	12	5,41	94,59	0,58	0,7930
800mg/Kg	LE	12	1,33	98,67	0,416	0,9962
	LE - PZQ	11	3,70	96,30	0,54	0,6876
controle	LE	12	61,0	39,0	5,3	4,119
	LE - PZQ	12	80,0	20,0	9,58	6,208

Neste segundo experimento, foram analisados os mesmos aspectos do experimento 1. Os mesmos esquemas terapêuticos foram utilizados e através do teste de Kruskal – Wallis, seguido das comparações múltiplas de Dunn's, foi possível verificar, no que diz respeito à cepa LE, que, como no experimento 1, os tratamentos com 200mg/Kg e 400mg/Kg de PZQ não se mostraram estatisticamente diferentes do controle. Apenas o tratamento com 800mg/Kg de PZQ gerou uma redução da carga parasitária estatisticamente diferente do grupo controle ($p < 0,001$). Da mesma forma, o tratamento com 200mg/Kg de PZQ se mostrou estatisticamente diferente do tratamento com 800mg/Kg ($p < 0,05$). Já os tratamentos com 400mg/Kg e 800mg/Kg de PZQ geraram resultados estatisticamente semelhantes na redução da carga parasitária. Na análise da “cepa” LE - PZQ, mais uma vez, os tratamentos com 400mg/Kg e 800mg/Kg de PZQ foram efetivos na redução da carga parasitária, sendo diferentes estatisticamente do grupo controle ($P < 0,001$). O tratamento com 200mg/Kg gerou resultados estatisticamente semelhantes ao grupo controle. E da mesma forma que o experimento anterior, a dose de 800mg/Kg de PZQ não foi suficiente para eliminar todos os parasitos, independente da infecção. No que diz respeito à suscetibilidade, o mesmo resultado do experimento 1 foi encontrado. O teste de Mann – Whitney mostrou que os dois tipos de cercárias (LE e LE – PZQ) responderam da mesma forma quando tratadas com a mesma dosagem de PZQ, não sendo, então, encontradas diferenças estatisticamente significativas quando comparadas entre si ($p > 0,05$) (Tabela 2, Gráfico 14).

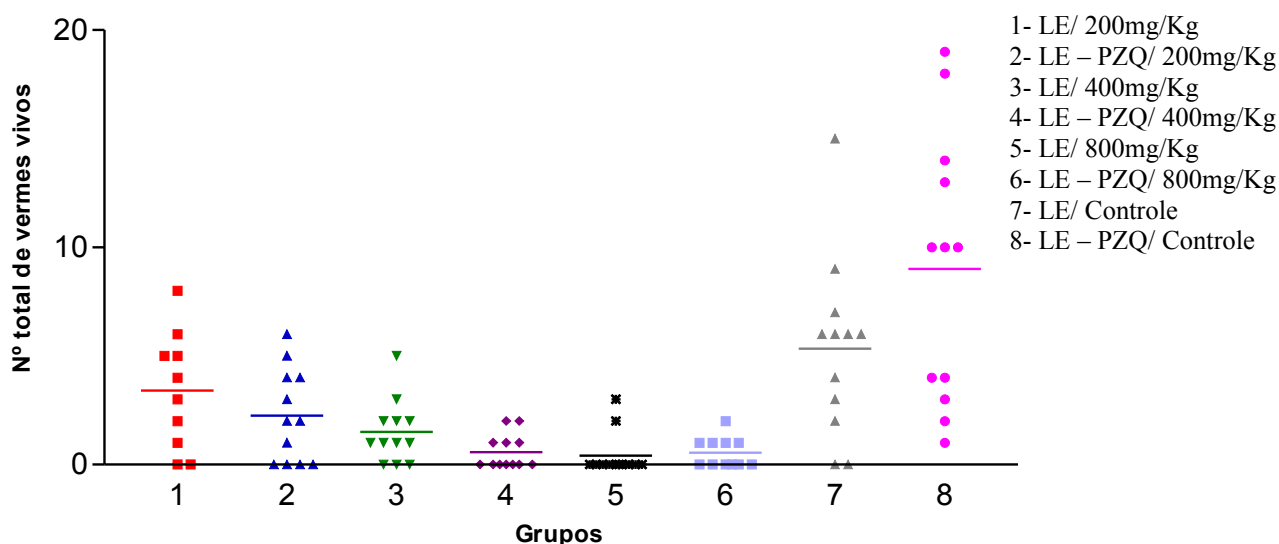
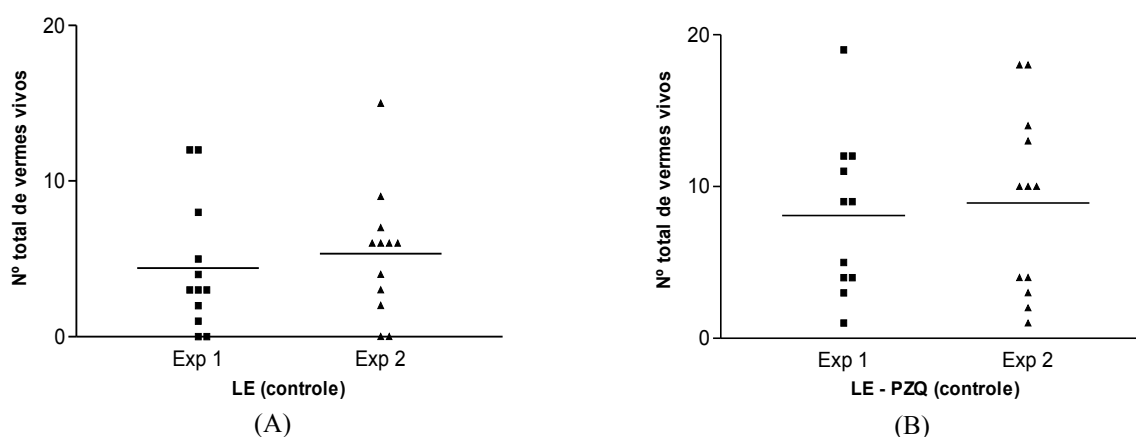


Gráfico 14 - Gráfico de dispersão do número total de vermes vivos recuperados por animal dos grupos controles e experimentais e suas respectivas medianas (—) referentes ao experimento 2.

4.3.1. Reprodutibilidade dos experimentos

A reprodutibilidade dos experimentos 1 e 2 foi avaliada. Os grupos infectados com a mesma cepa e tratados com o mesmo esquema terapêutico, porém, pertencentes a experimentos distintos, foram comparados entre si. A análise revelou que nenhuma diferença estatística foi encontrada entre os grupos controle, tanto da cepa LE ($p = 0,59$), quanto LE - PZQ ($p = 0,69$). Esse resultado comprova a homogeneidade, tanto da infecção dos animais, quanto da perfusão, realizada para recuperação dos vermes. Além disso, para nenhum outro grupo, submetido a tratamento, foi encontrada diferença estatisticamente significativa, demonstrando, também, a homogeneidade no tratamento experimental realizado nos diferentes experimentos (Figura 6).



PZQ (F); grupos infectados com cercárias LE tratados com 800mg/Kg de PZQ (G); grupos infectados com cercárias LE - PZQ tratados com 800mg/Kg de PZQ (H).

Experimento Passagem 1

Tabela 3 - Número de vermes vivos recuperados após perfusão das veias mesentéricas e do fígado de camundongos infectados com 25 cercárias das cepas LE e LE – PZQ de *S. mansoni* e tratados com diferentes dosagens de PZQ, trinta dias após o tratamento.

Tratamento/ Cepa	n° de camundongos vivos ao final do experimento	Distribuição de Vermes (%)		Média de vermes recuperados	Desvio Padrão (DP)	
		Mesentério	Fígado			
400mg/Kg	LE	12	6,25	93,75	0,416 *	0,7930
	LE - PZQ	12	13,2	86,8	1,92 *	1,443
800mg/Kg	LE	12	2,47	97,5	0,25	0,6216
	LE - PZQ	12	3,0	97,0	0,25	0,4523
controle	LE	12	85,7	14,3	2,92	2,937
	LE - PZQ	12	70,0	30,0	3,33	3,114

* $P < 0,01$

O teste de Kruskal – Wallis, seguido das comparações múltiplas de Dunn's, mais uma vez foi utilizado para comparar os esquemas terapêuticos empregados. Para a cepa LE, o tratamento com 400mg/Kg de PZQ se mostrou estatisticamente semelhante ao controle. Apenas a dosagem de 800mg/Kg se mostrou eficaz na redução da carga parasitária, quando comparado com o grupo controle ($p < 0,05$). Neste experimento, o tratamento com 400mg/Kg de PZQ gerou resultados semelhantes aos do tratamento com 800mg/Kg. Em relação à “cepa” LE – PZQ, apenas o tratamento com 800mg/Kg se mostrou estatisticamente diferente do controle, com $p < 0,01$. O grupo tratado com 400mg/Kg não foi efetivo na redução da carga parasitária, sendo estatisticamente semelhante ao controle. Além disso, os tratamentos com 400mg/Kg e 800mg/Kg se mostraram estatisticamente distintos, quando comparados entre si ($p < 0,01$). Neste experimento foi ainda encontrada uma redução na suscetibilidade ao PZQ no grupo infectado com cercárias provenientes de caramujos pré-expostos à droga (LE – PZQ) e tratados com 400mg/Kg de PZQ. Verificou-se que a média de vermes recuperados neste grupo (1,92) é estatisticamente maior ($p < 0,005$) do que a do grupo infectado com a cepa LE e tratado com o mesmo esquema terapêutico (0,416) (Tabela 3, Gráfico 15)

5 Discussão

A oxaminiquina e o praziquantel são, atualmente, as duas drogas disponíveis no mercado para o tratamento da esquistossomose. Segundo Foster et al. (1971), todas as fases evolutivas do *S. mansoni* podem ser tratadas com OXA, enquanto o PZQ apresenta efeito diferenciado em função das fases evolutivas do ciclo de vida do parasito (Gönnert & Andrews, 1977; Coles, 1979; Riley & Chappell, 1990; Carneiro – Santos et al., 2001; Liang et al., 2001, 2003).

Vários autores já demonstraram a ação de diversas drogas, incluindo OXA e PZQ, na fase intramolusco do *Schistosoma*. Essas drogas levam à interrupção na eliminação de cercárias (Warren & Weisberg, 1966; Warren, 1967; Andrews, 1977; Coles, 1979; Touassem & Combes, 1986; Yi & Combes, 1987; Coles & Bruce, 1987; Coelho et al., 1988; Riley & Chappell, 1990). Yi & Combes (1987) e Coelho et al. (1988) após verificarem o efeito do PZQ sobre a fase evolutiva intramolusco do parasito, sugeriram a utilização de caramujos infectados como modelo experimental para triagem de drogas esquistossomicidas e ainda, propuseram que este modelo poderia servir como um teste rápido e fácil para detecção de resistência/ suscetibilidade a drogas.

Em nosso trabalho, utilizamos caramujos na fase pré-patente e patente da infecção para verificar o efeito do PZQ, da OXA e da associação dessas duas drogas sobre a fase intramolusco do parasito. Nossos resultados demonstraram que o PZQ, a OXA e a associação dessas duas drogas possuem ação nesta fase do ciclo evolutivo do *S. mansoni*. Quando o tratamento ocorreu no período pré-patente da infecção, utilizando as drogas isoladamente, foi possível observar um atraso de, aproximadamente, 10 dias, no período pré-patente. Os caramujos tratados, tanto com OXA (500mg/Kg) quanto com PZQ (1000mg/Kg), isoladamente, começaram a eliminar cercárias 39 e 46 dias após a infecção, respectivamente, enquanto os caramujos não tratados eliminaram uma média de 128 cercárias/caramujo 30 dias após a exposição aos miracídios (Gráfico 1). Já foi descrito por Souza, Cunha & Andrade (1995) que os caramujos começam a eliminar cercárias de 27 a 30 dias após o contato com miracídios. Yi & Combes (1987) realizaram um estudo no qual caramujos infectados com *Schistosoma japonicum* foram tratados com PZQ no período de desenvolvimento de esporocistos primários. Observou-se que o período pré-patente dos caramujos tratados foi exatamente o mesmo dos caramujos controles. Além disso, por meio de análise histopatológica, verificou-se que os esporocistos primários permaneciam intactos, contendo inúmeros embriões de esporocistos secundários que se desenvolviam normalmente. No entanto, em nosso trabalho, os caramujos foram infectados com *S. mansoni*, que possui um

período pré-patente de, aproximadamente, 30 dias, enquanto o *S. japonicum* tem um período pré-patente de, aproximadamente, 60 dias e ainda, em nosso estudo, os caramujos foram tratados 18 dias após a infecção, período em que são encontrados, nos moluscos, esporocistos secundários recém-formados e alguns esporocistos primários, sendo esperados resultados semelhantes aos obtidos no período patente. Foi possível verificar ainda, em nossos experimentos, no período pré-patente, que os caramujos tratados com PZQ voltaram a eliminar cercárias mais lentamente e em menor quantidade do que os caramujos tratados com OXA (46 dias após infecção - média de 2,7 cercárias/caramujo e 39 dias pós-infecção - média de 62,4 cercárias/caramujo, respectivamente), sugerindo que os esporocistos sejam mais sensíveis ao PZQ do que à OXA. O tratamento na fase patente da infecção, tanto com OXA quanto com PZQ, isoladamente, gerou uma interrupção imediata da eliminação de cercárias. No entanto, independentemente da droga utilizada, esses caramujos voltaram a eliminar cercárias, aproximadamente, 15 dias após o tratamento (Gráfico 7). Porém, os caramujos tratados com PZQ voltaram a eliminar cercárias em números estatisticamente menores do que os encontrados antes do tratamento. Já os tratados com OXA eliminavam no último exame (26 dias pós-tratamento) uma média estatisticamente semelhante à anterior ao tratamento. Esses resultados, do período patente, corroboram com os encontrados por Yi & Combes (1987), que, utilizando PZQ e *S. japonicum*, observaram que os caramujos tratados permaneceram sem eliminar cercárias por, aproximadamente, 20 dias pós-tratamento, voltando a eliminá-las em números bem menores aos anteriores ao tratamento. Porém, no estudo de Touassem & Combes (1986), utilizando PZQ e *S. mansoni*/*B. glabrata*, os caramujos permaneceram sem eliminar cercárias apenas 4 dias após o tratamento, voltando a eliminá-las em números semelhantes aos de antes do tratamento. Da mesma forma, Riley & Chappell (1990), estudando a ação do PZQ em *B. glabrata* infectada com *S. mansoni*, verificaram uma redução e não uma supressão na eliminação de cercárias e, ao final de oito semanas, estes caramujos tratados eliminavam cercárias em nível semelhante aos anteriores ao tratamento. Acreditamos que essas diferenças, no período de supressão da eliminação de cercárias, tenham ocorrido devido ao uso de metodologias distintas. Embora em ambos os estudos a droga tenha sido adicionada à ração, o tempo de exposição dos caramujos à droga e as dosagens utilizadas foram menores do que as utilizadas em nosso trabalho (2 dias e 0,1% de PZQ e 3 dias e 37mg/Kg de PZQ, respectivamente). As análises histopatológicas realizadas, ainda, por Touassem & Combes (1986) e Riley & Chappell (1990) mostraram a presença de cercárias completamente destruídas e alguns esporocistos secundários intactos, logo após o tratamento. Passados quatro a oito dias, a histopatologia revelou a presença de esporocistos se multiplicando e novas cercárias começando a se desenvolver. Esses dados

explicariam o restabelecimento da eliminação das cercárias pelos caramujos algum tempo após o término do tratamento. Em relação ao tratamento com OXA, isoladamente, nossos resultados vão além dos encontrados por Coelho et al. (1988), que demonstraram que a OXA gera a supressão total da eliminação de cercárias, uma semana após o tratamento.

De acordo com Delgado et al. (1992), como a OXA e o PZQ possuem mecanismos de ação distintos, espera-se da combinação de ambos um efeito complementar. Esse efeito sinérgico, observado por diversos autores (Shaw & Brammer, 1983; Campos et al., 1985; Zwingenberger et al., 1987; Botros et al., 1989; Campos et al., 1989; Delgado et al., 1992), em hospedeiros vertebrados (modelo experimental e homem), também foi verificado em nossos estudos na fase intramolusco do parasito. Delgado et al. (1992) sugerem que, quando fármacos são associados, para um mesmo fim, suas dosagens podem ser reduzidas, diminuindo também os efeitos tóxicos. Dessa forma, os caramujos, na fase pré-patente e patente da infecção pelo *S. mansoni*, foram tratados com a associação das metades da dosagem de OXA e PZQ isoladamente. Quando os caramujos, no período pré-patente da infecção, foram tratados uma vez com 250mg/Kg de OXA + 500mg/Kg de PZQ, observou-se um atraso de, aproximadamente, 10 dias no período pré-patente (2º exame). Os caramujos só começaram a eliminar cercárias, em números semelhantes ao do grupo controle, 60 dias após a exposição aos miracídios (5º exame), sugerindo um efeito residual maior desta associação do que das drogas administradas isoladamente (Gráfico 3). Este efeito residual se mostra ainda maior quando os caramujos são submetidos a dois tratamentos com esta mesma associação OXA/PZQ. Um atraso de, aproximadamente, 30 dias (5º exame) no período pré-patente dos caramujos submetidos ao tratamento foi observado, ou seja, os caramujos só voltaram a eliminar cercárias 60 dias após a exposição aos miracídios. Além disso, esses caramujos só eliminaram cercárias, em números semelhantes ao do controle, 74 dias após a exposição aos miracídios (7º exame) (Gráfico 5). É importante ressaltar que não houve um aumento na taxa de mortalidade quando utilizamos a associação OXA/ PZQ, independente de um ou dois tratamentos.

O efeito sinérgico da associação OXA/ PZQ também foi observado em caramujos submetidos a tratamentos com 250mg/Kg de OXA + 500mg/Kg de PZQ, no período patente da infecção. Um único tratamento com esta associação gerou uma supressão total da eliminação de cercárias no 1º exame, sendo ainda observada uma redução na eliminação de cercárias de quase 98% nos demais exames realizados, quando comparado com os números anteriores aos do tratamento (Gráfico 9). Quando os caramujos foram submetidos a dois tratamentos com esta mesma associação, observou-se uma supressão total da eliminação de cercárias que se manteve até o 5º e último exame, ou seja, os caramujos que antes do

tratamento eliminavam em média 1284 cercárias, após o tratamento se “curaram”, não voltando a eliminar cercárias (Gráfico 11). Acredita-se que a associação OXA/ PZQ possa levar à destruição das cercárias e dos esporocistos, não permitindo, assim, a sua recuperação/multiplicação e conseqüente restabelecimento da eliminação de cercárias. A partir desses experimentos, foi possível verificar que os esporocistos secundários são parcialmente sensíveis à OXA e ao PZQ quando estes são administrados isoladamente e fortemente afetados pela associação dessas drogas, principalmente se o tratamento ocorrer no período patente da infecção.

De acordo com Coles (1973), os esporocistos utilizam oxigênio e produzem ácido láctico assim como os vermes adultos e, ainda, enzimas presentes em esporocistos migram de modo similar às dos vermes adultos, em eletroforese. Coelho et al. (1988) afirmam que esses achados podem sugerir que vias metabólicas semelhantes podem estar presentes no estágio intramolusco do *S. mansoni* e em vermes adultos no hospedeiro vertebrado. Estes relatos explicariam o porquê de drogas que agem sobre os vermes adultos também serem efetivas na fase intramolusco do parasito.

Tendo em vista os nossos resultados e os dados presentes na literatura, que sugerem a resistência de esporocistos primários e secundários ao PZQ e a suscetibilidade das cercárias em desenvolvimento, na fase intramolusco do parasito, nosso trabalho avaliou a ação do PZQ sobre esporocistos primários transformados “*in vitro*”. Após a penetração do miracídio no hospedeiro invertebrado, ocorre uma série de mudanças estruturais e metabólicas, que levam à transformação dos miracídios em esporocistos (Pan, 1965). Por meio do cultivo de miracídios, essas mudanças podem ser acompanhadas e a transformação dos miracídios em esporocistos realizada “*in vitro*”. De acordo com Basch & DiConza (1974), a primeira e principal alteração observada é a perda da camada ciliar presente nos miracídios e ausente nos esporocistos. Essa camada é sustentada por uma camada muscular, que não é perdida durante essa transformação. Após três horas de cultivo, é possível verificar a perda desta camada ciliar e a formação de um novo tegumento, mais fino e com microvilosidades, bem característico de esporocistos. Vinte horas após o cultivo, essas microvilosidades estão bem maiores e o tegumento se assemelha ao de esporocistos primários presentes em caramujos infectados há vários dias.

Apesar de os estudos citados anteriormente demonstrarem, por meio de histologia, que esporocistos, tanto primários quanto secundários, permanecem intactos após contato com o PZQ, uma alteração no formato e uma nítida contração, nos esporocistos primários transformados “*in vitro*”, após a exposição a 5 e 10µg/mL de PZQ, foi observada em nosso trabalho (Figura 3A e B). Embora essa contração da camada muscular seja evidente, a

movimentação dos parasitos também foi nítida, ou seja, o PZQ agiu sobre esses esporocistos, mas não foi capaz de matá-los. Um dos mecanismos de ação do PZQ, já descrito por alguns autores (Pax et al., 1978; Fetterer et al., 1980), é a contração muscular. O contato de vermes adultos com a droga, tanto “*in vivo*” quanto “*in vitro*”, gera uma imediata e sustentável contração da musculatura. Liang et al. (2001, 2003) descreveram essa mesma contração observada em nosso trabalho nos esporocistos primários, em miracídios expostos ao PZQ “*in vitro*”.

Segundo Melhorn et al. (1981), o PZQ é capaz de gerar dano no tegumento do *Schistosoma*. Como observado em nossos resultados, o PZQ foi capaz de gerar uma contração evidente nos esporocistos. Dessa forma, avaliamos, através do uso de marcadores fluorescentes, a influência do PZQ sobre o tegumento de esporocistos. Os marcadores utilizados foram Hoechst 33258 e lectina de *Glicine max*, que se ligam, respectivamente, ao DNA da célula e a carboidratos de membrana (N-acetilgalactosamina). No que diz respeito a Hoechst 33258, foi possível observar uma leve fluorescência nos esporocistos expostos à sonda, mas não à droga (controles) (Figura 4A). Esta marcação se tornou mais evidente após o contato dos esporocistos com a droga, independentemente da dosagem (Figura 4B e C), sugerindo, então, que o PZQ é capaz de gerar dano no tegumento de esporocistos. Porém, devido à presença de uma leve marcação nos esporocistos controles, um segundo marcador foi testado: lectina de *Glicine max*. A presença de N-acetilgalactosamina em esporocistos já foi demonstrada em alguns trabalhos, porém utilizando metodologias bem distintas (Yoshino et al., 1977; Zelck & Becker, 1990; Uchikawa & Loker, 1991; Johnston & Yoshino, 1996). Nossos resultados mostraram uma nítida marcação da membrana dos parasitos expostos ao PZQ, sugerindo que neste local houve a exposição de N-acetilgalactosamina (Figuras 4F, G, H, I). Além disso, não se observou marcação alguma nos esporocistos não expostos à droga (Figura 4D e E). Oliveira et al. (2006) observaram que os danos causados pelo PZQ em vermes adultos expostos à droga “*in vitro*” não são intensos o suficiente para serem marcados pela sonda lectina *Glicine max*. Esse resultado não está de acordo com os obtidos em nosso trabalho, utilizando esporocistos. No entanto, a explicação para tal fato seria a diferença existente entre o tegumento dessas duas diferentes fases evolutivas do parasito. Os vermes adultos possuem um tegumento composto por uma espessa camada acelular e seguida de uma camada celular bi-lipídica (McLaren, 1980); o mesmo não é observado em esporocistos que possuem uma fina camada celular de, aproximadamente, 0,5µm (Smith & Chernin, 1974), possivelmente mais frágil e mais permeável, quando comparado com a dos vermes adultos. Em outro trabalho realizado por Oliveira (2005), sugere-se que a sonda Hoechst 33258 seja muito sensível na marcação de danos no tegumento de vermes adultos, de modo que qualquer

lesão no tegumento, por menor que seja, pode ser marcada por esta sonda. Isso poderia explicar a leve marcação presente nos esporocistos antes do contato com a droga, que, durante o cultivo, podem ter tido sua membrana danificada. Nesse mesmo trabalho, Oliveira demonstrou que essa mesma sensibilidade não foi observada com lectina *Glicine max*. Em seus estudos, utilizando vermes adultos, as lesões marcadas por esta sonda eram maiores do que as marcadas pela Hoechst 33258. Dessa forma, os possíveis danos causados no tegumento dos esporocistos, mantidos em cultura, não foram marcados pela lectina *Glicine max*; em compensação, as lesões causadas pelo PZQ, por serem mais intensas, tornaram-se nítidas. Al-Adhami et al. (2003) demonstraram que cercárias sem lesão aparente no tegumento apresentaram uma leve marcação quando em contato com a sonda Hoechst 33258.

Em nosso trabalho, avaliamos também a presença de organelas ácidas nos esporocistos. Para isso nós utilizamos o marcador fluorescente LysoTracker Red. Esta sonda é um marcador específico para lisossomos de células de mamíferos (Dietl et al., 1996). Os resultados mostraram uma marcação de várias vesículas no interior dos esporocistos primários expostos à sonda (Figura 5A e B). Assim, foi demonstrada, pela primeira vez, a presença de organelas semelhantes a lisossomos neste estágio do ciclo vital do *S. mansoni*. Essas vesículas, segundo Carneiro-Santos et al. (2001), possuem características funcionais semelhantes às de lisossomos e acidocalcinomas. Os acidocalcinomas são organelas conservadas desde bactérias até o homem. Possuem função de armazenamento e são responsáveis pela manutenção do pH intracelular (Do Campo et al., 2005). No entanto, Al-Adhami et al. (2005), utilizando compostos inibidores da formação de vesículas ácidas, semelhantes a lisossomos, demonstraram a inibição da formação dessas vesículas em esquistossômulos. Além disso, nesse mesmo trabalho, definiram a presença de proteínas, presentes em lisossomos de células de mamíferos, em extratos de esquistossômulos. Diversos trabalhos já utilizaram o marcador LysoTracker Red para demonstrar a presença e a ausência desses compartimentos ácidos nas diferentes fases evolutivas do parasito. Carneiro-Santos et al. (2001) demonstraram a presença dessas organelas em esquistossômulos e a ausência delas em cercárias. A presença dessas vesículas em esquistossômulos e a ausência em cercárias foram confirmadas por Al-Adhami et al. (2003, 2005). Neste último trabalho foi mostrado, ainda, que os miracídios não revelam a presença de vesículas quando expostos ao LysoTracker Red, demonstrando que nesta fase do ciclo do parasito essas vesículas também não estão presentes. Os autores sugerem que os lisossomos estejam envolvidos em processos de sobrevivência e adaptação dos esquistossômulos ao seu novo ambiente (hospedeiro vertebrado), o que explicaria o desenvolvimento dessas organelas imediatamente após a transformação das cercárias em esquistossômulos. O mesmo pode ocorrer durante a

transformação miracídio/ esporocistos. Durante esta transformação ocorrem mudanças metabólicas que podem levar ao surgimento dessas vesículas ácidas. Provavelmente estas estruturas exercem um papel fundamental na sobrevivência e na adaptação dos esporocistos no seu novo ambiente (hospedeiro invertebrado). Outro evento que pode ocorrer durante essas transformações é a autofagia. A autofagia é um processo utilizado pelas células para eliminar componentes celulares desnecessários, durante a diferenciação celular (De Duve & Wattiaux, 1966). Sabe-se que esses componentes celulares sem função são capturados e degradados pelos lisossomos para posterior eliminação (Jans et al. 2004). Dessa forma, sugere-se que, durante a transformação, tanto de cercárias para esquistossômulo quanto de miracídio para esporocisto, ocorra um estímulo do processo de autofagia, levando ao desenvolvimento dessas vesículas ácidas.

Após a descoberta de lisossomos nos esporocistos, nós verificamos a influência do PZQ sobre estas organelas. Foi possível verificar um aumento na área marcada pelo LysoTracker Red após a exposição dos parasitos à droga (Figura 5C, D, E, F), sugerindo uma maior atividade dos lisossomos. Isso poderia explicar nossos resultados, “*in vivo*” e “*in vitro*”, da ação do PZQ sobre a fase intramolusco do *S. mansoni*, que mostram que os esporocistos são afetados pelo PZQ, mas que a droga não é capaz de destruí-los. Afinal, segundo Carneiro-Santos et al. (2001), esses lisossomos funcionam como depósitos intracelulares para desintoxicação do parasito. Logo, essas vesículas ácidas poderiam ser capazes de eliminar a droga do parasito, antes de esta destruir o esporocisto. Essa hipótese é sustentada também pelos estudos de Al-Adhami et al. (2005), que revelaram a presença desses compartimentos ácidos em vermes imaturos (estágio do pulmão, naturalmente resistente ao PZQ) e ausentes em vermes adultos, naturalmente sensíveis ao PZQ. Além disso, já foi descrita a ocorrência de autofagia em vermes adultos de *S. mansoni* após o tratamento com drogas (Clarkson & Erasmus, 1984).

Diversos trabalhos já relataram a existência de cepas resistentes ao PZQ, tanto em campo quanto em laboratório (Fallon et al., 1994, 1995; Stelma et al., 1995; Ismail et al., 1996, 1999; Araújo et al., 1996; Bonesso-Sabadini & Dias, 2000). De acordo com Coelho et al. (1997), o uso da quimioterapia em massa, como principal método de controle da esquistossomose em áreas endêmicas, pode gerar o surgimento de cepas resistentes, através do mecanismo de pressão seletiva devido a tratamentos sucessivos. Esse processo de seleção de resistência é um problema que deve ser tratado como prioritário, uma vez que o PZQ é a única droga efetiva disponível contra as três espécies causadoras da esquistossomose de maior importância médica: *S. mansoni*, *S. haematobium* e *S. japonicum*. Dessa forma, é de grande importância a elaboração de testes simples e rápidos para triagem de drogas

esquistossomicidas e, ainda, testes baratos, factíveis e simples para detecção de cepas resistentes.

O processo de pressão seletiva de drogas, utilizado para selecionar linhagens de *S. mansoni* resistentes, é um mecanismo importante a ser utilizado, uma vez que esses parasitos resistentes podem ser a chave para elucidar os mecanismos de ação de drogas (Ross et al., 1993; Liang et al., 2003). Além disso, segundo Coles & Bruce (1987), parasitos resistentes podem ser de grande importância no desenvolvimento de novas drogas esquistossomicidas, bem como de novas combinações terapêuticas.

Nossos resultados, discutidos acima, demonstraram a ação do PZQ sobre a fase intramolusco do *Schistosoma*, tanto “*in vivo*” quanto “*in vitro*”. Nos experimentos “*in vivo*”, ficou claro que o PZQ gera uma interrupção da eliminação de cercárias e que essas voltam a ser eliminadas em números bem menores aos anteriores ao tratamento. Tendo em vista esses resultados, nós avaliamos se cercárias, provenientes de caramujos tratados, poderiam gerar vermes adultos menos susceptíveis a esta droga em relação às cercárias provenientes de caramujos não tratados, em função de uma pressão seletiva quimioterápica. Observou-se que três tratamentos de cinco dias, com 100mg/Kg/ dia de PZQ, na fase intramolusco, não foram suficientes para alterar a suscetibilidade dos vermes adultos recuperados de camundongos, independente da dose de PZQ utilizada (200, 400 e 800mg/Kg) (Tabela 1 e Gráfico 13; Tabela 2 e Gráfico 14). Nos dois experimentos realizados, os resultados obtidos foram estatisticamente semelhantes, demonstrando o rigor com que esses experimentos foram conduzidos. Acredita-se que mais tratamentos e/ou passagens sejam necessários para que essa alteração de suscetibilidade à droga possa ser verificada nos vermes adultos, considerando-se que em cada uma delas os caramujos seriam novamente tratados. No experimento chamado de passagem 1, os camundongos foram infectados com cercárias provenientes de caramujos previamente tratados, porém submetidas a uma passagem para manutenção do ciclo de vida do parasito, sem que os caramujos fossem tratados novamente. Foi possível verificar que os vermes adultos, provenientes de cercárias da cepa LE submetida a três tratamentos na fase intramolusco (LE – PZQ), mostraram-se menos susceptíveis à droga do que os vermes adultos, provenientes da cepa LE não submetida aos tratamentos na fase intramolusco, quando ambos foram tratados com 400mg/Kg de PZQ (Tabela 3 e Gráfico 15). Para a dose de 800mg/Kg, nenhuma alteração na suscetibilidade foi observada. A dose de 800mg/Kg de PZQ, neste caso, foi excessiva, resultando na eliminação de quase todos os parasitos. No entanto, por se tratar de um único experimento, a repetição do experimento é necessária para confirmar estes resultados.

Nosso trabalho, mostrando a ação do PZQ e OXA sobre a fase intramolusco do parasito, tanto “*in vivo*” quanto “*in vitro*”, bem como a “cura” dos moluscos gerada pelo tratamento com a associação das duas drogas, abre perspectivas interessantes para estudos de mecanismos de ação de drogas, para verificar se caramujos tratados e “curados” apresentam resistência à reinfecção pelo *S. mansoni*, além da possibilidade de ser útil na seleção de parasitos resistentes a drogas esquistossomicidas.

6 Conclusões

Os resultados obtidos neste trabalho nos levam a concluir que:

- Os tratamentos, tanto no período pré-patente quanto patente da infecção, com OXA ou com PZQ, isoladamente, agem na fase intramolusco do parasito, interrompendo a eliminação de cercárias;
- Após o tratamento com PZQ, isoladamente, na fase patente da infecção, os caramujos voltam a eliminar cercárias em números inferiores aos encontrados antes do tratamento. Esse fato não ocorre com os caramujos tratados com OXA, isoladamente, que voltam a eliminar cercárias em números semelhantes aos encontrados antes do tratamento;
- Os tratamentos, tanto com OXA quanto com PZQ, na fase pré-patente da infecção, geram um atraso no período pré-patente;
- Um ou dois tratamentos com a associação de 250mg/Kg de OXA + 500mg/Kg de PZQ, no período pré-patente da infecção, levam a um atraso no período pré-patente, mas não eliminam totalmente a infecção;
- No período patente, um único tratamento com a associação de 250mg/Kg de OXA + 500mg/Kg de PZQ gera uma significativa interrupção/ redução na eliminação de cercárias, mas não é suficiente para eliminar os parasitos dos caramujos;
- Dois tratamentos, com a associação de 250mg/Kg de OXA + 500mg/Kg de PZQ, no período patente da infecção, levam à erradicação do *S. mansoni* intramolusco;
- Os esporocistos primários transformados “*in vitro*” apresentam uma nítida contração, após o contato com 5 e 10µg/mL de PZQ, alterando o formato do parasito;
- O PZQ causa dano no tegumento dos esporocistos primários, sendo estes marcados pelas sondas Hoechst 33258 e lectina de *Glicine max*;
- Os esporocistos primários possuem organelas ácidas, semelhantes a lisossomos;
- O PZQ influencia na formação dessas organelas ácidas, aumentando a área marcada pela sonda LysoTracker Red, após o contato dos esporocistos com a droga;

- Três tratamentos de cinco dias consecutivos, com 100mg/Kg/ dia de PZQ, na fase intramolusco, não foram suficientes para alterar a suscetibilidade dos vermes adultos, independente da dose de PZQ utilizada (200, 400 e 800mg/Kg);
- Os vermes adultos recuperados de camundongos infectados com cercárias provenientes de caramujos previamente tratados com PZQ, porém, submetidos a uma passagem para manutenção do ciclo de vida do parasito, sem que os caramujos fossem tratados novamente, são menos susceptíveis ao PZQ do que vermes adultos da cepa LE (controle), na dose de 400mg/Kg de PZQ.

7 Referências bibliográficas

Andrews P. Effect of praziquantel on the free-living stages of *Schistosoma mansoni*. **Zeitschrift für Parasitenkunde**. 1978; 56: 99-106.

Andrews P, Thomas H, Pohlke R, Seubert J. Praziquantel. **Med. Res. Rev.** 1983; 3:147 – 200.

Al-Adhami BH, Thornhill J, Akhkha A, Doenhoff MJ, Kusel JR. The properties of acidic compartments in developing schistosomula of *Schistosoma mansoni*. **Parasitology**. 2003; 127(3): 253-64.

Al-Adhami BH, Noble C, Sharaf O, Thornhill J, Doenhoff MJ, Kusel R. The role of acidic organelles in the development of schistosomula of *Schistosoma mansoni* and their response to signalling molecules. **Parasitology**. 2005; 130(3): 309-22.

Araújo NP, Souza SP, Passos LKJ, Simpson AJG, Dias Neto E, Pereira TR, Cerutti JRC, Alencar FEC, Dietze R, Katz N. Suscetibilidade aos agentes quimioterápicos de isolados de *Schistosoma mansoni* oriundos de pacientes tratados com oxamniquina e praziquantel e não curados. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** 1996; 29: 467 – 476.

Basch PF, DiConza JJ. The miracidium-sporocyst transition in *Schistosoma mansoni*: surface changes in vitro with ultrastructural correlation. **J Parasitol.** 1974; 60(6): 935-41.

Becker B, Mehlhorn H, Andrews P, Thomas H, Eckert J. Light and electron microscopic studies on the effect of praziquantel on *Schistosoma mansoni*, *Dicrocoelium dendriticum*, and *Fasciola hepatica* (Trematoda) *in vitro*. **Zeitschrift für Parasitenkunde**. 1980; 63: 113-128.

Bennett JL, Day T, Feng-Tao L, Ismail M, Farghaly A. The development of resistance to anthelmintics: a perspective with an emphasis on the antischistosomal drug praziquantel. **Experimental Parasitology**. 1997; 87: 260-267.

Bonesso-Sabadini PIP, Dias LCS. Altered response of *Schistosoma mansoni* to oxamniquine and praziquantel. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**. 2002; 97 (3): 381 – 385.

Botros S, Soliman A, El-Gawhary M, Guirguis N. Efficacy of combined low dose praziquantel and oxamniquine on different stages of schistosome maturity. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** 1989; 83: 86 – 89.

Brindley PJ, Sher A. The chemotherapeutic effect of praziquantel against *Schistosoma mansoni* is dependent on host antibody response. **J. Immunol.** 1987; 139: 215 – 20.

Campos R, Pinto PLS, Sant'ana EJ, Moreira AAB, Amato-Neto V, Padilha LAA, Levai EV, Catalano CM. Esquistossomose clínica e terapêutica: A associação oxamniquine e praziquantel no tratamento da esquistossomose mansônica. **Congresso da Soc. Bras. Med. Tropical**, 21. 1985, p. 51.

Campos R, Pinto PLS, Neto VA, Moreira AAB. Tratamento da esquistossomose mansônica por meio da associação de oxamniquine com praziquantel. II– observações experimentais relativas à fase patente. **Rev. Hosp. Clin. Fac. Med. São. Paulo.** 1989; 44 (3): 111 – 114.

Carneiro-Santos P, Thornhill JÁ, Doenhoff MJ, Hagan P, Kusel JR. Acidic vesicles of *Schistosoma mansoni*. **Parasitol Res.** 2001; 87(12): 1001-6.

Chitsulo L, Engels D, Montresor A, Savioli L. The global status of schistosomiasis and its control. **Acta Trop.** 2000; 77(1): 41-51.

Cioli D, Pica Mattoccia L, Archer S. Binding of oxamniquine to the DNA of schistosomes. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** 1989; 83: 89 – 96.

Cioli D, Pica Mattoccia L, Archer S. Drug resistance in schistosomes. **Parasitol. Today.** 1993; 9 (5): 162-166.

Cioli D, Pica Mattoccia L, Archer S. Antischistosomal drugs: past, present and future. **Pharmacol. Ther.** 1995; 68 (1): 35-85.

Cioli, D. Praziquantel: is there real resistance and are there alternatives? **Curr Opin Infect Dis.** 2000; 13(6): 659-663.

Cioli D, Pica-Mattoccia L. Praziquantel. **Parasitol Res.** 2003; 90 (Supp 1): S3-9.

Cioli D, Botros SS, Francklow KW, Mbaye A, Southgate V, Tchuente TLA, Pica-Mattoccia L, Troiani AR, Seif el Din SH, Sabra AA, Albin J, Engels D, Doenhoff MJ. Determination of ED₅₀ values for praziquantel in praziquantel-resistant and susceptible *Schistosoma mansoni* isolates. **Int. J. Parasitol.** 2004; 34: 979 – 987.

Clarkson J, Erasmus DA. *Schistosoma mansoni*: an *in vivo* study of drug-induced autophagy in the gastrodermis. **J Helminthol.** 1984; 58(1): 59-68.

Coelho PMZ, Katz N, Rocha MO, Souza CP, Mello RT. *Schistosoma mansoni*: infected snails as a tool to screen antischistosomal drugs. **International Parasitology.** 1988; 18 (2): 167-170.

Coelho PMZ, Lima FCS, Nogueira JAM. Resistance to oxamniquine of a *Schistosoma mansoni* strain isolate from a patient submitted to repeated treatments. **Rev. Ins. Med. Trop. São Paulo.** 1997; 39: 101-106.

Coles CG. The metabolism of Schistosomes: a review. **Int. J. Biochem.** 1973; 4: 319 – 337.

Coles GC. The effect of praziquantel on *Schistosoma mansoni*. **Journal Helminthol.** 1979; 53: 31-33.

Coles GC, Bruce JI. *In vitro* selection of drug resistant *Schistosoma mansoni*. **International Journal for Parasitology.** 1987; 17(3): 767-771.

Coura JR, Amaral RS. Epidemiological and control aspects of schistosomiasis in Brazilian endemic areas. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** 2004; 99(5 Suppl 1): 13-9.

Creasey AM, Taylor P, Thomas JEP. Dosage trial a combination of oxamniquine and praziquantel in the treatment of schistosomiasis in Zimbabwean schoolchildren. **Cent.. Afr. J. Med.** 1986; 32 (7): 165 – 167.

Day TA, Bennett JL, Pax RA. Praziquantel: the enigmatic antiparasitic. **Parasitol. Today.** 1992; 8: 342 – 344.

De Duve C, Wattiaux R. Functions of lysosomes. **Annu Rev Physiol.** 1966; 28: 435-92.

Delgado VS, Suárez DP, Cesari IM, Incani RN. Experimental chemotherapy of *Schistosoma mansoni* with praziquantel and oxamniquine: differential effect of single or combined formulations of drugs on various strains and both sexes of the parasite. **Parasitol. Res.** 1992; 78: 648 – 654.

Dietze R, Prata A. Baixa eficácia da associação oxamniquine e praziquantel na cura da esquistossomose mansônica. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** 1986; 19: 247 – 249.

Dietl P, Haller T, Wirleitner B, Friedrich F. Two different store-operated Ca²⁺ entry pathways in MDCK cells. **Cell Calcium.** 1996; 20(1): 11-9.

Docampo R, de Souza W, Miranda K, Rohloff P, Moreno SN. Acidocalcisomes - conserved from bacteria to man. **Nat Rev Microbiol.** 2005; 3(3): 251-61.

Doenhoff MJ, Kusel JR, Coles GC, Cioli D. Resistance of *Schistosoma mansoni* to praziquantel: is there a problem? **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** 2002; 96: 465-469.

Engels D, Chitsulo L, Montresor A, Savioli L. The global epidemiological situation of schistosomiasis and new approaches to control and research. **Acta Trop.** 2002; 82: 139-146.

Fallon PG, Cooper RO, Probert A.J, Doenhoff M.J. Immune-dependent chemotherapy of schistosomiasis. **Parasitol.** 1992; 105: S41 - S48.

Fallon PG, Doenhoff MJ. Drug resistant schistosomiasis: resistance to praziquantel and oxamniquine induced in *Schistosoma mansoni* in mice is drug specific. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 1994; 51 (1): 83 – 88.

Fallon PG, Sturrock RF, Capron A, Niang M, Doenhoff MJ. Short report: Diminished susceptibility to praziquantel in a Senegal isolate of *Schistosoma mansoni*. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 1995; 53 (1): 61 – 62.

Fallon PG, Tao LF, Ismail MM, Bennett JL. Schistosome resistance to praziquantel: Fact or Artifact? **Parasitology Today.** 1996; 12(8): 316-320.

Fenwick A, Savioli L, Engels D, Robert Bergquist N, Todd MH. Drugs for the control of parasitic diseases: current status and development in schistosomiasis. **Trends Parasitol.** 2003; 19(11): 509-15.

Fetterer RH, Pax RA, Bennett JL. Praziquantel, potassium and 2,4-dinitrophenol: analysis of their action on the musculature of *Schistosoma mansoni*. **Eur J Pharmacol.** 1980; 64(1): 31-8.

Foster R, Mesmer ET, Chetham BL, King DF. The control of immature *Schistosoma mansoni* in mice by UK 3883, a novel 2-aminomethyltetrahydroquinoline derivative. **Ann. Trop. Med. Parasitol.** 1971; 65:221 – 232.

Foster R. A review of clinical experience with oxamniquine. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** 1987; 81: 55-59.

Gonnert R, Andrews P. Praziquantel, a new broad-spectrum antischistosomal agent. **Z. Parasitenkd.** 1977; 52: 129 – 150.

Gryscheck RCB, Carvalho SA, Amato-Neto V. Eficácia e tolerabilidade da associação oxamniquine com praziquantel no tratamento da infecção humana por *Schistosoma mansoni*. **Rev. Bras. Med.** 2004; 2 (6): 168 –170.

Harder, A. Chemotherapeutic approaches to schistosomes: current knowledge and outlook. **Parasitol Res.** 2002; 88(5): 395-7.

Harnett W, Kusel JR. Increased exposure of parasite antigens at the surface of adult male *Schistosoma mansoni* exposed to praziquantel *in vitro*. **Parasitol.** 1986; 93: 401 – 405.

Ishikawa, T. The ATP-dependent glutathione S-conjugate export pump. **Trends Biochem Sci.** 1992; 17(11): 463-8.

Ismail M, Metwally A, Farghaly A, Bruce J, Tao LF, Bennett JL. Characterization of isolates of *Schistosoma mansoni* from Egyptian villagers that tolerate high dose of praziquantel. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 1996; 55 (2): 214 – 218.

Ismail M, Botros S, Metwally A, William S, Farghally A, Tao LF, Day TA, Bennett JL. Resistance to praziquantel: direct evidence from *Schistosoma mansoni* isolated from egyptian villagers. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 1999; 60 (6): 932 – 935.

Jannotti - Passos LK. **Uso do DNA mitocondrial de *Schistosoma mansoni* em estudos de herança genética e diagnóstico de infecção em *Biomphalaria glabrata*.** 1998. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) Instituto Oswaldo Cruz - FIOCRUZ.

Jans R, Sartor M, Jadot M, Poumay Y. Calcium entry into keratinocytes induces exocytosis of lysosomes. **Arch Dermatol Res.** 2004; 296(1): 30-41.

Johnston LA, Yoshino TP, Analysis of lectin- and snail plasma-binding glycopeptides associated with the tegumental surface of the primary sporocysts of *Schistosoma mansoni*. **Parasitology.** 1996; 112 (Pt 5): 469-79.

Katz N, Peixoto SV. Análise crítica da estimativa do número de portadores de esquistossomose mansoni no Brasil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** 2000; 33 (3): 303-308.

Kinoti GR. The significance of variation in the susceptibility of *Schistosoma mansoni* to the antischistosomal drug oxamniquine. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** 1987; 82(supl. 4): 151-156.

Konh AB, Anderson PAV, Roberts-Misterly JM, Greenberg RM. Schistosome calcium channel β subunits: unusual modulatory effects and potential role in the action of the antischistosomal drug praziquantel. **J. Biol. Chem.** 2001; 276: 36873 – 36876.

Liang YS, Coles GC, Doenhoff MJ. Detection of praziquantel resistance in schistosomes. **Trop Med Int Health.** 2000; 5(1): 72.

Liang YS, Coles GC, Doenhoff MJ, Southgate VR. *In vitro* responses of praziquantel-resistant and -susceptible *Schistosoma mansoni* to praziquantel. **Int J Parasitol.** 2001; 31(11): 1227-35.

Liang YS, Dai JR, Zhu YC, Coles GC, Doenhoff MJ. Genetic analysis of praziquantel resistance in *Schistosoma mansoni*. **Southeast Asian J Trop Med Public Health.** 2003; 34 (2): 274-280.

Lima SF, Vieira LQ, Harder A, Kusel JR. Effects of culture and praziquantel on membrane fluidity parameters of adult *Schistosoma mansoni*. **Parasitol.** 1994a; 109: 57 – 64.

Lima SF, Vieira LQ, Harder A, Kusel JR. Altered behavior of carbohydrate- bound molecules and lipids in areas of the tegument of adult *Schistosoma mansoni* worms damage by praziquantel. **Parasitol.** 1994b; 109: 469 – 477.

Liu YH, Qian MX, Wang XG, Jia J, Wang QN, Jiang YF, Wang RQ, Yan SW, Chen BY, Li JS, Qiu ZY, Shen JK. Comparative efficacy of praziquantel and its optic isomers in experimental therapy of schistosomiasis japonica in rabbits. **Clin. Med. J.** 1986; 99: 935 – 940.

McLaren DJ. **The adult worm.** In *Schistosoma mansoni: the Parasite Surface in Relation to Host Imunity.* 1980 (ed. Brown, KN): 1-27. Chichester, EUA: Research Studies Press.

Mehlhorn H, Becker B, Andrews P, Thomas H, Frenkel JK. *In vivo* and *in vitro* experiments on the effects of praziquantel on *Schistosoma mansoni*. **Arzneimittelforschung.** 1981; 31: 544 – 554.

Oliveira FA. **Avaliação do efeito do praziquantel, da oxamniquina e da associação dessas duas drogas sobre o verme adulto de *Schistosoma mansoni*.** Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde). 2005. Centro Pesquisas René Rachou/FIOCRUZ.

Oliveira FA, Kusel JR, Ribeiro F, Coelho PMZ. Responses of the surface membrane and excretory system of *Schistosoma mansoni* to damage and to treatment with praziquantel and other biomolecules. **Parasitology.** 2006 (*in press*).

Pan CT. Studies on the host-parasite relationship between *Schistosoma mansoni* and the snail *Australorbis glabratus*. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene.** 1965; 14 (6): 931-976.

Paraense WL. Estado atual da sistemática dos Planorbídeos brasileiros. **Arq. Mus. Nac.** 1975; 55: 105-128.

Pax RA, Bennett JL, Fetterer R. A benzodiazepine derivative and praziquantel: effects on musculature of *Schistosoma mansoni* and *Schistosoma japonicum*. **Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmacol.** 1978; 304: 309 – 315.

Pellegrino J, Siqueira AF. Técnica de perfusão para colheita de *Schistosoma mansoni* em cobaias experimentalmente infestadas. **Rev. Bras. Malar.** 1956; 8: 589 – 597.

Pellegrino J, Katz N. Experimental chemotherapy of *Schistosoma mansoni*. **Adv. Parasitol.** 1968; 6: 233 – 291.

Pica Mattoccia L, Cioli D. Sex and stage-related sensitivity of *Schistosoma mansoni* to *in vivo* and *in vitro* praziquantel treatment. **Int. J. Parasitol.** 2004; 34: 527-533.

Pugh RNH, Teesdale CH. Synergy of concurrent low dose oxamniquine and praziquantel in schistosomiasis. **Brit. Med. J.** 1983; 287: 818.

Redman CA, Robertson A, Fallon PJ, Modha J, Kusel JR, Doenhoff MJ, Martín RJ. Praziquantel: an urgent and exciting challenge. **Parasitol. Today.** 1996; 12(1): 14-20.

Ribeiro F, Coelho PMZ, Vieira LQ, Watson DG, Kusel JR. The effect of praziquantel treatment on glutathione concentration in *Schistosoma mansoni*. **Parasitol.** 1998; 116: 229-236.

Ribeiro F, Mello RT, Tavares CAP, Kusel JR, Coelho PMZ. Synergistic action of praziquantel and host specific immune response against *Schistosoma mansoni* at different phases of infection. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo.** 2004; 46 (4): 231 – 233.

Richards HC, Foster R. A new series of 2-aminomethyltetrahydroquinoline derivatives displaying schistosomicidal activity in rodents and primates. **Nature.** 1969; 22: 581 – 582.

Riley EM, Chappell LH. Praziquantel treatment of *Biomphalaria glabrata* infected with *Schistosoma mansoni* - influence on snail fecundity. **Parasitology.** 1990; 101: 211-217.

Ross MH, Kwa MSG, Veenstra JG, Kooyman FNJ, Boersema JH. Molecular aspects of drug resistance in parasitic helminthes. **Pharmac. Ther.** 1993; 60: 331-336.

Shaw JR, Brammer KW. The treatment of experimental shistosomiasis with a combination of oxamniquine and praziquantel. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** 1983; 77 (1): 39-40.

Smith JH, Chernin E. Ultrastructure of young mother and daughter sporocysts of *Schistosoma mansoni*. **J Parasitol.** 1974; 60(1): 85-9.

Souza CP, Cunha R C, Andrade ZA. Development of *Schistosoma mansoni* in *Biomphalaria tenagophila*, *Biomphalaria straminea* and *Biomphalaria glabrata*. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo.** 1995; 37(3): 201-6.

Souza CP. ***Schistosoma mansoni*: aspectos quantitativos da interação hospedeiro-parasito e desenvolvimento em *Biomphalaria glabrata*, *Biomphalaria tenagophila* e *Biomphalaria straminea*.** Tese (Doutorado em Parasitologia). 1993. Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais.

Stelma FF, Talla A, Sow S, Kongs A, Nang M, Polman K, Delder AM, Gryssels B. Efficacy and side effects of praziquantel in an epidemic focus of *Schistosoma mansoni*. **Am. J. Trop. Med. Hyg** 1995; 53(2): 167-170.

Staudt U, Schmahl G, Blaschke G, Mehlhorn H. Light and scanning electron microscopy studies on the effects of the enantiomers of praziquantel and its main metabolite on *Schistosoma mansoni in vitro*. **Parasitol Res.** 1992; 78(5): 392-7.

Teles HM. Geographic distribution of *Schistosoma mansoni* transmitter snail species in State of São Paulo. **Rev Soc Bras Med Trop.** 2005; 38(5): 426-32.

Touassem R, Combes C. Comparative analysis of the *Schistosoma mansoni* and *Schistosoma bovis* production under influence praziquantel. **Zeitschrift für Parasitenkunde.** 1986; 72 (3): 345-351.

Uchikawa R, Loker ES. Lectin-binding properties of the surfaces of *in vitro*-transformed *Schistosoma mansoni* and *Echinostoma paraensei* sporocysts. **J Parasitol.** 1991; 77(5): 742-8.

Urbani C, Albonico M. Anthelmintic drug safety and drug administration in the control of soil-transmitted helminthiasis in community campaigns. **Acta Trop.** 2003; 86(2-3): 215-21.

Van der Werf MJ, de Vlas SJ, Brooker S, Looman CW, Nagelkerke NJ, Habbema JD, Engels D. Quantification of clinical morbidity associated with schistosome infection in sub-Saharan Africa. **Acta Trop.** 2003; 86(2-3): 125-39.

Xiao SH, Friedman PA, Catto BA, Webster LT Jr. Praziquantel-induced vesicle formation in the tegument of male *Schistosoma mansoni* is calcium dependent. **J Parasitol.** 1984; 70(1): 177-9.

Xiao SH, Catto BA, Webster LT. Effects of praziquantel on different developmental stages of *Schistosoma mansoni* *in vitro* and *in vivo*. **J. Infect. Dis.** 1985; 151: 1130 – 1137.

Xiao SH, Catto BA. Comparative *in vitro* and *in vivo* activity of racemic praziquantel and its levorotated isomer on *Schistosoma mansoni*. **J. Infect. Dis.** 1989; 159: 589 – 592.

Xiao S, Chollet J, Booth M, Weiss NA, Tanner M. Therapeutic effect of praziquantel enantiomers in mice infected with *Schistosoma mansoni*. **Trans R Soc Trop Med Hyg.** 1999; 93(3): 324-5.

Zelck U, Becker W. Lectin binding to cells of *Schistosoma mansoni* sporocysts and surrounding *Biomphalaria glabrata* tissue. **J Invertebr Pathol.** 1990; 55(1): 93-9.

Zwingenberger K, Queiroz JAN, Poggensee U, Alencar JE, Valdegunas J, Esmeralda F, Feldmeir H. Efficacy of oxamniquine, praziquantel and a combination of both drugs in schistosomiasis mansoni in Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo.** 1987; 29: 305 – 311.

Warren KS, Weisberger AS. The treatment of molluscan schistosomiasis mansoni with chloramphenicol. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene.** 1966; 15 (3): 342-350.

Warren, KS. Studies on the treatment of molluscan schistosomiasis mansoni with antibiotics, non-antibiotic, metabolic inhibitors, molluscicides and anti-schistosomal agents.

Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. 1967; 61(3): 368-372.

WHO – World Health Organization. Oxamniquine. **WHO Model Prescribing Information.** Drugs used in parasitic diseases 1990.p. 118 – 119. Geneva.

WHO - World Health Organization. The control of schistosomiasis, Second report of WHO expert committee. 1993. **WHO Technical Report Series** n° 830, Geneva.

World Health Organization – WHO. Prevention and control of schistosomiasis and soil-transmitted helminthiasis. **World Health Organ Tech Rep Ser.** 2002; 912 (i-vi): 1-57.

Wolde Mussie E, Vande Waa J, Pax RA, Fetterer R, Bennett JL. *Schistosoma mansoni*: calcium efflux and effects of calcium-free media on responses of the adult male musculature to praziquantel and other agents inducing contraction. **Exp Parasitol.** 1982; 53(2): 270-8.

Yi XM, Combes C. Effect of praziquantel on larval stages of *Schistosoma japonicum*. **Trans R Soc Trop Med Hyg.** 1987; 81(4): 645-50.

Yoshino TP, Cheng TC, Renwranz LR. Lectin and human blood group determinants of *Schistosoma mansoni*: alteration following *in vitro* transformation of miracidium to mother sporocyst. **J Parasitol.** 1977; 63(5): 818-24.