

Ministério da Saúde

Fundação Oswaldo Cruz

Centro de Pesquisas René Rachou

Curso de Pós-graduação em Ciências da Saúde

***Avaliação do efeito do praziquantel, da oxamniquina e da associação destas
drogas sobre o verme adulto de Schistosoma mansoni***

Fabricia Alvisi de Oliveira

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

Coorientador: Dr. John Robert Kusel

Maio 2005

O48a Oliveira, Fabrícia Alvisi de
2005

Avaliação do efeito do praziquantel, da oxamniquina e da associação destas drogas sobre o verme adulto de *Schistosoma mansoni* / Fabrícia Alvisi de Oliveira. – Belo Horizonte: Fundação Oswaldo Cruz/Centro de Pesquisas René Rachou, 2005.

XV, 82f: il;29,7 x 21,0cm.

Bibliografia: f.68-82

Dissertação (mestrado) – Dissertação para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde pelo Programa de Pós- Graduação do Centro de Pesquisas René Rachou.

1.Schistosoma mansoni 2 oxamniquina 3 praziquantel I. Título.
II. Coelho, Paulo Marcos Zech (orientador); III. Kusel, John Robert (coorientador)

CDC-22. ed.616.963

Fundação Oswaldo Cruz

Centro de Pesquisas René Rachou

Curso de Pós-graduação em Ciências da Saúde

Esta Dissertação intitulada:

***Avaliação do efeito do praziquantel, da oxamniquina e da associação destas
drogas sobre o verme adulto de Schistosoma mansoni***

apresentada por

Fabricia Alvisi de Oliveira

Foi avaliada pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Dr. _____

John Robert Kusel

Profa. Dra. _____

Symone Fulgêncio Lima

Prof. Dr. _____

Marcus Luiz de Oliveira Penido

Dissertação defendida e aprovada em 30 de maio de 2005

Dedico este trabalho aos meus queridos pais, José Ibrahim e Marilene e irmãos Thomaz e Matheus por todo amor e incentivo que sempre me dedicaram. Ao Adriano Augusto, pela presença, pelo amor e companheirismo em todos os momentos.

Agradecimentos

Agradeço primiramente a Deus, por estar sempre ao meu lado, iluminando meu caminho, guiando minhas ações e colocando pessoas especiais em minha vida:

Ao Dr. Paulo Marcos Zech Coelho, meu orientador, exemplo de pessoa humana e amiga, pela confiança e oportunidade, pela atenção e por estar sempre presente, participando e, incentivando o meu trabalho.

Ao Dr. John Robert Kusel, meu querido coorientador, pessoa iluminada que tive a honra de conhecer e a oportunidade de trabalhar. Meu muito obrigado pela amizade, pelo carinho, pela dedicação, pelos ensinamentos e pelas horas agradáveis de trabalho.

À Neusa Araújo pela grande ajuda, paciência e pelos ensinamentos.

À Fernanda Mello pela ajuda nas perfusões.

Aos meus amigos do Laboratório de Esquistossomose, Ana Karine, Rodrigo, Glauco e Fábio pela ajuda e pela agradável convivência. Foi muito bom trabalhar com Vocês!!!

Ao Áureo, à Vanda, à Vanessa e a D. Vera por estarem sempre dispostos a ajudar, obrigada pela atenção e pelo auxílio. Vocês foram imprecindíveis!!!

À Ana Carolina de Mattos, uma grande amiga que descobri por aqui, muito obrigada por sua ajuda, pelo incentivo, pelas correções, pelas sugestões, pela amizade pelo carinho e pelas horas agradáveis que passamos juntas. Com certeza você tem uma participação especial neste trabalho.

À Ana Thereza Chaves, quem me incentivou e me ajudou a seguir em frente em um momento muito difícil pra mim. Obrigada pela amizade e pelo carinho.

À professora Symone pela atenção, apoio, pelas sugestões e correções e ensinamentos na entrega final deste trabalho.

À estatística Ana Carolina Lustosa Lima, pela paciência e presteza.

Ao Martim pelo incentivo, pelas horas de conversa e sugestões.

Aos amigos Pollanah e Cristiano pelo incentivo e pela convivência agradável.

Aos meus amigos do Laboratório de Pesquisas Clínicas: Cláudia, Eliane, Luís, Rachel, Denílson, Karine e em especial à Fernanda pela amizade, incentivo e também pelas horas agradáveis que passamos juntas.

Ao Laboratório de Triatomíneos pela concessão do microscópio de fluorescência.

Ao pessoal do biotério: Marcílio, Jaci, D.Vera e Wanderley pela colaboração e simpatia durante meu trabalho experimental.

Ao bibliotecário Segemar, pela atenção, simpatia e presteza.

Aos colegas do curso de Pós-Graduação do CPqRR/FIOCRUZ

Ao Centro de Pesquisas René Rachou/FIOCRUZ pelo suporte técnico e científico que me proporcionou o desenvolvimento deste trabalho.

À Dra. Virgínia Torres Schall, coordenadora do curso de Pós-Graduação pelo empenho e dedicação a este programa.

Aos demais funcionários, pela acolhida e carinho com que sempre me trataram.

As minhas avós Neide e Margarida, tios e tias e todos os familiares pelo incentivo e colaboração para que este momento pudesse se realizar.

À D. Lourdes e Sr. Luís pelo carinho, torcida e incentivo.

A vocês que estiveram ao meu lado nas horas em que chorei e nas horas em que sorri, nas horas em que me lamentei e nas horas em que me mostrei alegre. Agradeço pelo sorriso diário, pela convivência agradável. Agradeço mais uma vez a todos que de alguma forma contribuíram para este momento de grande alegria em minha vida.

Obrigada a todos por tudo!

*“A alegria está na luta, na tentativa, no
sofrimento envolvido. Não na vitória
própriamente dita”.*

Gandhi

Sumário

1 Introdução.....	1
1.1. Esquistossomose	17
1.2. Oxamniquina.....	21
1.2.1. Química e farmacocinética	21
1.2.2. Mecanismo de ação.....	22
1.2.3. Efeitos adversos e toxicidade.....	22
1.3. Praziquantel	23
1.3.1. Química e farmacocinética	24
1.3.2. Mecanismo de ação.....	25
1.3.3. Efeitos adversos e toxicidade.....	27
1.4. Associação oxamniquina/praziquantel	28
1.5. Resistência aos agentes esquistossomicidas: oxamniquina e praziquantel.....	32
2 Objetivos.....	35
2.1. Objetivo geral	35
2.2. Objetivos específicos	35
3 Materiais e métodos.....	36
3.1. Animais e parasitos	36
3.2. Teste de toxicidade aguda.....	36
3.3. Testes “ <i>in vivo</i> ” para avaliação da eficácia da associação oxamniquina/praziquantel.....	37
3.3.1. Obtenção, concentração, contagem de cercárias e infecção dos animais	37
3.3.2. Tratamento	37
3.3.3. Perfusão – Recuperação dos vermes adultos	38
3.4. Experimentos “ <i>in vitro</i> ” - Avaliação da atividade excretora e do dano causado no tegumento através de sondas fluorescentes	39
3.4.1. Fluorescência (Microscopia de Fluorescência)	39
3.4.2. Marcação dos parasitos com sondas fluorescentes.....	39
3.4.3. Perfusão – Obtenção dos parasitos para uso nas técnicas de fluorescência	43
3.4.4. Experimento 1 - Avaliação da atividade do sistema excretor do verme adulto de <i>S. mansoni</i> exposto ao PZQ, antes ou após marcação com a sonda Resorufin	44
3.4.5. Experimento 2 - Avaliação da atividade do sistema excretor do verme adulto de <i>S. mansoni</i> expostos à diferentes concentrações de praziquantel	45

3.4.6. Experimento 3 - Avaliação da atividade do sistema excretor do verme adulto de <i>S. mansoni</i> expostos às drogas isoladamente ou em associação.....	46
3.4.7. Experimento 4 - Avaliação do dano causado ao tegumento do verme adulto de <i>S. mansoni</i> expostos à oxamniquina e ao praziquantel isoladamente ou em associação..	48
3.4.8. Experimento 5 - Tratamento “ <i>in vivo</i> ” com oxamniquina e praziquantel e marcação dos parasitos com Resorufin, “ <i>in vitro</i> ”	49
3.4.9. Experimento 6 - Tratamento “ <i>in vivo</i> ” com oxamniquina e praziquantel e marcação dos parasitos com Alexa-Fluor 488, Hoechst 33258, lectin de <i>Glicina max</i> soja (SBA) e AF-18 “ <i>in vitro</i> ”	51
3.5. Microscopia de Fluorescência (preparo das lâminas para leitura).....	52
3.6. Imagens fotográficas.....	52
3.7. Análises estatísticas	52
4 Resultados.....	54
4.1. Efeito tóxico da associação OXA/PZQ	54
4.2. Eficácia da associação OXA/PZQ	54
4.2.1. Proporção entre machos e fêmeas relacionada ao uso de OXA ou PZQ.....	59
4.2.2. Reprodutibilidade dos experimentos	59
4.3. Resultados dos experimentos “ <i>in vitro</i> ”	60
4.3.1. Efeito do PZQ sobre a excreção da Resorufin (Experimento 1)	60
4.3.2. Efeito de diferentes concentrações de PZQ sobre o sistema excretor do verme adulto de <i>S. mansoni</i> (Experimento 2).....	61
4.3.3. Efeito das drogas OXA e PZQ, usadas isoladamente ou em associação, sobre a atividade excretora do verme adulto de <i>S. mansoni</i> (Experimento 3)	63
4.3.4. Efeito das drogas OXA, PZQ usadas isoladamente ou em combinação sobre o tegumento do verme adulto de <i>S. mansoni</i> (Experimento 4).....	65
4.3.5. Efeito do tratamento “ <i>in vivo</i> ”, com as drogas OXA e PZQ, isoladas ou em associação, sobre o sistema excretor do verme adulto de <i>S. mansoni</i> (Experimento 5)	68
4.3.6. Efeito do tratamento “ <i>in vivo</i> ”, com as drogas OXA e PZQ, isoladas ou em associação, sobre o tegumento do verme adulto de <i>S. mansoni</i> (Experimento 6)	69
5 Discussão	74
6 Conclusões.....	83
7 Referências bibliográficas	84

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Número de animais vivos e mortos (observados durante 24 hs), após administração das respectivas DLs50.

Tabela 2 - Número de vermes vivos recuperados após perfusão das veias do mesentério e fígado de camundongos infectados com 50 cercárias, e tratados com OXA, PZQ e a associação OXA/PZQ

Tabela 3 - Número de vermes vivos recuperados após perfusão das veias do mesentério e fígado de camundongos infectados com 50 cercárias, e tratados com OXA, PZQ e a associação OXA/PZQ. Trinta dias após tratamento.

Tabela 4 - Número de vermes vivos recuperados após perfusão das veias do mesentério e fígado de camundongos infectados com 50 cercárias, e tratados com OXA, PZQ e a associação OXA/PZQ. Trinta dias após tratamento.

Lista de Figuras

Figura 1 – Ciclo evolutivo do *S. mansoni*

Figura 2 – Oxamniquina

Figura 3 – Praziquantel

Figura 4 - Esquema de infecção, tratamento e perfusão

Figura 5 – Estrutura molecular da Resorufin

Figura 6 - Estrutura molecular da Hoechst 33258

Figura 7 – Estrutura molecular da Alexa Flúor faloidina

Figura 8 – Estrutura molecular da rodamina isotiocianato

Figura 9 – Estrutura molecular da AF-18

Figura 10 – Inserção da sonda AF- 18.....

Figura 11 - Esquema do experimento 1

Figura 12 - Esquema do experimento 2

Figura 13 - Esquema do experimento 3

Figura 14 - Esquema do experimento 4

Figura 15 - Esquema do experimento 5

Figura 16 - Esquema do experimento 6

Figura 17 - Gráficos representativos....

Figura 18 – Marcação dos parasitos com Resorufin

Figura 19 - Marcação dos parasitos com Resorufin após exposição com PZQ

Figura 20 – Marcação dos parasitos com Resorufin

Figura 21 - Marcação dos danos através das sondas Hoechst....

Figura 22 – Atividade excretora após tratamento “*in vivo*”

Figura 23 - Marcação dos danos causados no tegumento....

Figura 24 – Marcação dos danos causados no tegumento....

Figura 25 – Marcação dos danos através da lectin....

Lista de Gráficos

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

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

Gráfico 3 - Gráfico de dispersão do número total de vermes vivos recuperados por animal dos grupos controle e experimentais e suas respectivas medianas referentes ao experimento 3.

Gráfico 4 - Porcentagens de machos e fêmeas vivos após o tratamento com OXA ou com PZQ.

Lista de Abreviaturas

OXA – oxamniquina

PZQ – praziquantel

MIF – mertiolato iodo formol (conservante)

BSA – Albumina de soro bovino

SFB – soro fetal bovino

DL₅₀ – dose letal para 50% dos animais

Pgp – P-glicoproteína

MDR – (multidrug resistance) - resistência a múltiplas drogas

MRP – (multidrug resistance associated protein) – proteína associada a resistência a múltiplas drogas.

SMDR2 – *Schistosoma* multidrug resistance

HPJ – Hoffman, Pons e Janer

Resumo

O presente estudo teve como objetivo avaliar o potencial terapêutico da associação de oxamniquina (OXA) e praziquantel (PZQ), no tratamento da esquistossomose mansoni, por meio de experimentos “*in vivo*” e “*in vitro*”. A ação das drogas em associação foi comparada ao efeito de cada droga utilizada isoladamente, em camundongos experimentalmente infectados. As associações de OXA e PZQ utilizadas (50mg/Kg de OXA + 100mg/Kg de PZQ e 100mg/Kg de OXA + 200mg/Kg de PZQ) mostraram-se mais efetivas na redução do número de vermes quando comparados ao tratamento com 400mg/Kg de PZQ, empregado separadamente. A associação na maior dosagem foi o único esquema terapêutico capaz de eliminar todos os parasitos dos animais. Em adição, a maior susceptibilidade dos parasitos machos à OXA e das fêmeas ao PZQ foi confirmada, podendo explicar pelo menos em parte, a maior eficácia da combinação de ambas as drogas. A possível sinergia das drogas também foi estudada, avaliando-se o efeito dessas isoladamente ou em associação, sobre o sistema excretor e sobre a membrana tegumentar de vermes adultos de *Schistosoma mansoni*, através do uso de marcadores fluorescentes “*in vitro*”. Para tanto, os parasitos foram expostos diretamente às drogas ou recuperados após duas horas do tratamento de animais infectados. Pela primeira vez, foi demonstrada a atuação do PZQ no sistema excretor de vermes adultos de *S. mansoni*. O PZQ atuou inibindo a atividade excretora dos parasitos machos, porém esta atividade foi recuperada, logo após a retirada da droga. Os parasitos fêmeas não acasalados apresentaram nítida atividade excretora, independentemente da exposição às drogas, ao passo que as fêmeas acasaladas somente tiveram seu sistema excretor ativo quando expostos a agentes agressores externos, não apresentando nenhum sinal de atividade, em condições normais (sem exposição às drogas). A associação OXA/PZQ mostrou causar danos mais intensos na membrana tegumentar dos parasitos em relação àqueles provocados pelo uso das drogas usadas separadamente. Os resultados obtidos, com este trabalho, apontam para a vantagem do uso da combinação dessas drogas na eliminação total da carga parasitária, na dose de 100mg/kg de OXA e 200mg/Kg de PZQ. Assim, este esquema pode prevenir o aparecimento de cepas resistentes, principalmente em áreas endêmicas, onde sucessivos tratamentos são realizados.

Abstract

The aim of this study was to evaluate the therapeutic potential related to the oxamniquine (OXA) and praziquantel (PZQ) association in the treatment of schistosomiasis mansoni, by means of *in vivo* and *in vitro* experiments. The efficacy of the associated drugs was compared to the effect of each drug when used in isolation, in mice experimentally infected. The OXA and PZQ associations (50 mg/kg OXA + 100 mg/kg PZQ and 100 mg/kg OXA + 200 mg/kg PZQ) were more effective in the reduction of the worm burden when compared to the treatment administered with 400 mg/kg of PZQ alone. The association using the highest dose was the only therapeutic schedule capable of eliminating completely the worm burden in the animals. In addition, the highest degree of susceptibility of the male parasites to OXA and the female ones to PZQ was confirmed, and this could explain, at least in part, the greater efficacy of the association of both drugs. The possible synergy of the drugs was also studied, through the evaluation of their effect, either in isolation or in association, on the excretory system and on the tegumental membrane of *Schistosoma mansoni* adult worms, by means of fluorescent markers *in vitro*. Therefore, the parasites were directly exposed to the drugs, or recovered after two hours of treatment of the infected animals. It was demonstrated, for the first time, the activity of PZQ in the excretory system of *S. mansoni* adult worms. PZQ was able to inhibit the excretory activity of the male parasites, but this activity was recovered soon after with the drug treatment was discontinued. The unpaired female parasites showed marked excretory activity, independently of the exposure to the drugs, whereas the paired females had their excretory system active only when they were exposed to external aggressive agents, but no activity could be detected under normal conditions (without exposition to the drugs). OXA/PZQ association was shown to be able to cause more severe damage to the tegumental membrane of the parasites, when compared to that caused by drugs used separately. The results obtained in this study show the advantage of the association of the mentioned drugs, as far as the total elimination of the worm burden is concerned, at the dose of 100 mg/kg OXA and 200 mg/kg PZQ. Thus, this schedule may prevent the emergence of resistant strains, mainly in endemic areas, where successive treatments are administered.

1 Introdução

As doenças parasitárias podem ser vistas como um reflexo da situação econômica e social dos países em desenvolvimento, afetando de forma considerável suas populações pobres e marginalizadas. Neste contexto, as esquistossomoses aparecem como uma das infecções parasitárias mais prevalentes no mundo, sendo endêmicas em 76 países e territórios distribuídos pela África, Ásia e Américas (Engels et al. 2002).

1.1. Esquistossomose

Segundo dados da Organização Mundial de Saúde (2002), mais de 200 milhões de pessoas estão infectadas e 600 milhões estão expostas ao risco de contrair a doença. Embora a esquistossomose apresente um baixo índice de mortalidade, sua acentuada morbidade faz com que estes números sejam preocupantes. A doença possui caráter insidioso, não sendo comum seu diagnóstico em seus estágios iniciais, mas sua evolução pode levar ao desenvolvimento de doenças incapacitantes para homens e mulheres em suas idades mais produtivas (Engels et al. 2002).

No decorrer dos últimos 50 anos, muitos países têm implantado programas de controle para diminuir a morbidade e mortalidade causadas pela esquistossomose, como é o caso do Brasil, China, Filipinas e Egito. Por outro lado, em outras localidades, como, por exemplo, a África (subsaariana), são inexistentes os programas de controle e os recursos necessários para o controle da doença são inviáveis, tendo em vista o contexto da saúde pública local (Engels et al. 2002).

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

A esquistossomose mansoni é endêmica em 52 países e territórios distribuídos pela América do Sul, Caribe, África e leste do Mediterrâneo, onde atinge as regiões do delta do Nilo e Sudão (WHO 2002), enquanto as esquistossomoses hematóbica e japônica estão restritas ao continente africano e asiático.

Acredita-se que as principais espécies de *Schistosoma* que infectam o homem chegaram às Américas através de escravos africanos e imigrantes orientais e asiáticos. Entretanto, somente o *S. mansoni* se instalou no Brasil, devido às condições propícias tais

como a presença de bons hospedeiros intermediários e condições ambientais semelhantes às das suas regiões de origem (Melo & Coelho 2004).

As condições de trabalho dos escravos, nas plantações de cana-de-açúcar e posteriormente, nas minas de ouro e diamante, explicam, em grande parte, o processo de endemização da esquistossomose mansoni no Brasil. A falta de condições mínimas de higiene, os hábitos de defecar próximo aos rios e riachos e a existência de instalações sanitárias com descarga direta em coleções aquáticas, associados à presença de caramujos susceptíveis à infecção, criaram condições necessárias para que os parasitos transportados pelos escravos pudessem se reproduzir (Camargo 1980).

A esquistossomose, originalmente limitada às planícies costeiras da região nordeste e leste do Brasil, expandiu-se para o interior do país seguindo a rota da busca do ouro e diamante. Posteriormente, em função dos ciclos da cana-de-açúcar, da borracha, do café e da abertura de novas fronteiras agrícolas, essa parasitose se disseminou para a região norte e sudoeste, transformando-se em uma doença endêmica em vários estados.

Em 1989, estimava-se que 11% do território brasileiro estivesse afetado pela esquistossomose (Silveira 1989). Na década de 90, segundo Katz e Peixoto (2000), o número de portadores de esquistossomose era estimado em 7,1 milhões e 6,3 milhões para os anos de 1996 e 1997, respectivamente. Atualmente, a área endêmica para esquistossomose abrange 19 estados, ocorrendo de forma endêmica e focal desde o estado do Maranhão até Minas Gerais, com certa ocorrência no Espírito Santo. Focos isolados também ocorrem nos estados do Pará, Piauí, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná, Santa Catarina, Goiás, Distrito Federal e Rio Grande do Sul (FUNASA 1998).

Essa endemia está relacionada à pobreza e ao baixo desenvolvimento econômico da população, gerando a necessidade de utilização de águas, muitas vezes contaminadas, para o exercício da agricultura, trabalho e/ou lazer (Katz & Peixoto 2000).

A transmissão e manutenção da doença requerem a presença de hospedeiros intermediários (caramujos do gênero *Biomphalaria*) e hospedeiros vertebrados (principalmente o homem), ambos necessários para o completo desenvolvimento do parasito. O *S. mansoni* possui diferentes estágios de desenvolvimento (vermes adultos, ovos, miracídios, esporocistos, cercárias e esquistossômulos), alternando fases assexuadas e sexuadas de reprodução.

Seu ciclo evolutivo tem início quando os ovos eliminados pelas fezes do hospedeiro vertebrado (geralmente o homem) eclodem no meio aquático, liberando os miracídios, os quais infectam os caramujos (hospedeiro invertebrado). Por meio de reprodução assexuada, inúmeras cercárias são produzidas e eliminadas na água até que entram em contato com o

hospedeiro vertebrado, podendo nele penetrar através da pele. Após a penetração, as cercárias se transformam em esquistossômulos os quais são levados aos pulmões e depois migram para o sistema porta intra-hepático, onde ocorre a maturação dos vermes para posterior acasalamento. Em seguida, os vermes migram para as veias mesentéricas onde ocorre a postura de ovos (reprodução sexuada). Parte desses ovos ganham a circulação e depositam-se no fígado, produzindo a doença (granulomas), enquanto outros podem depositar-se nas paredes intestinais, podendo alcançar a luz intestinal e sendo eliminados pelas fezes, reiniciando o ciclo (Figura 1) (Coles 1973).

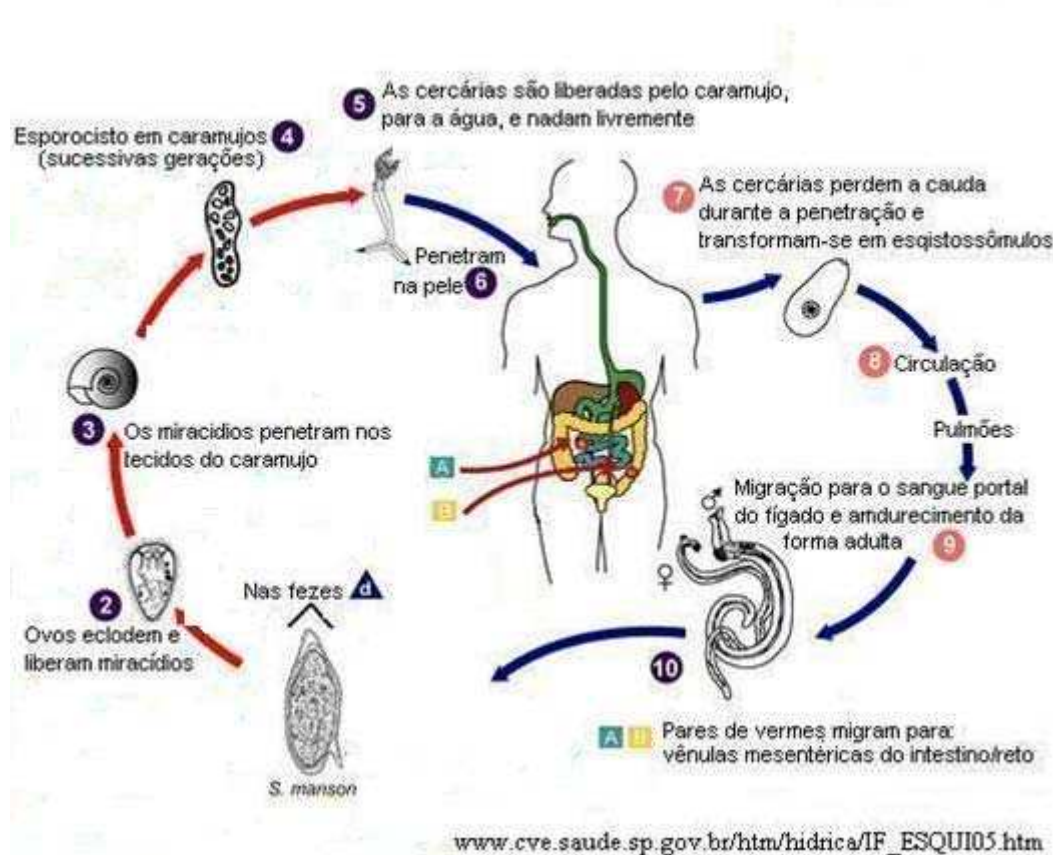


Figura 1 - Ciclo evolutivo do *S. mansoni*

A maioria das pessoas infectadas pode permanecer assintomática, dependendo da intensidade da infecção e da resposta imune individual. Contudo, a sintomatologia clínica corresponde ao estágio de desenvolvimento do parasito no hospedeiro. A esquistossomose apresenta duas fases evolutivas: uma aguda e outra crônica.

A fase aguda é transitória e se caracteriza em alguns pacientes por uma sintomatologia rica (febre, diarreia, eritema) e uma imunopatologia mais exacerbada (granulomas maiores do tipo necrótico exudativo). Esta fase tem início em torno dos 50 dias após a infecção, terminando por volta do centésimo vigésimo dia, período em que se inicia a fase crônica.

A fase crônica pode se apresentar de três formas: a digestiva intestinal e a hepatointestinal, mais brandas, e a hepatoesplênica, mais grave, podendo esta ser compensada ou descompensada.

As formas intestinal e hepatointestinal apresentam as mesmas características, porém a segunda difere da primeira, devido à presença de hepatomegalia, sendo a forma hepatointestinal mais freqüente na esquistossomose crônica (Siqueira et al. 1997). Dependendo da carga parasitária e da duração da doença, a forma hepatointestinal e eventualmente a intestinal podem evoluir, possibilitando, assim, o desenvolvimento das formas hepatoesplênicas.

Como em outras doenças parasitárias, a patogênese da esquistossomose é dependente da interação parasito-hospedeiro (Andrade et al. 1962, 1992). A cepa, o estágio evolutivo e a carga de infecção são importantes fatores relacionados ao parasito e têm uma influência direta sobre a patogênese. Por outro lado, características associadas ao hospedeiro tais como: constituição genômica, órgão lesado, alimentação, cor, tratamento específico, reinfecções, infecções associadas ao trato gastrointestinal e, sobretudo, o estado imunológico do hospedeiro são fatores muito importantes na determinação e evolução das formas da doença (Lambertucci et al. 1998, Farinazzo et al. 1997). Segundo Warren et al. (1972), o evento patogênico mais importante na esquistossomose é a formação do granuloma, o qual é provocado pelo ovo do parasito. Desse modo, algumas manifestações ectópicas da doença como, por exemplo, a neurológica e a vasculopulmonar são causadas pela presença de granulomas, principalmente, na medula e nos vasos pulmonares, respectivamente.

A esquistossomose é uma doença milenar, sendo seu ciclo evolutivo conhecido há mais de cem anos. Sua ampla distribuição geográfica e a facilidade de expansão no território brasileiro, fazem com que a esquistossomose seja de grande relevância, no país, constituindo, assim, um grande desafio para a saúde pública.

A princípio, seu controle é limitado pela própria epidemiologia da doença, pois sua distribuição é endêmica e, freqüentemente, muito peculiar a uma dada coleção hídrica e às relações que ela estabelece com a população (Silveira 1989).

As medidas para se combater a doença baseiam-se no controle dos hospedeiros intermediários, através do uso de moluscidas, controle biológico e alterações no ambiente aquático; saneamento básico; educação em saúde e o emprego da quimioterapia específica em larga escala. Esta última é considerada a mais relevante, uma vez que seu emprego é um dos meios mais rápidos e eficazes para se conseguir bons resultados na redução do número de indivíduos infectados.

Hoje, estão disponíveis somente duas drogas para o tratamento da esquistossomose: oxamniquina (OXA) (Mansil – Pfizer S.A), muito usada no passado em programas de controle (Katz 1980), e o praziquantel (PZQ), atualmente utilizado e produzido no Brasil pela Farmanguinhos - Fundação Oswaldo Cruz/ FIOCRUZ.

1.2. Oxamniquina

A OXA foi extensamente utilizada para o tratamento em massa da esquistossomose (Katz 1980). No Brasil, mais de 10 milhões de indivíduos foram tratados com OXA, obtendo-se bons resultados em relação à eficácia e tolerância. Estágios avançados e formas graves da doença foram tratados, com segurança, com OXA (Coutinho & Domingues 1980).

Atualmente, sua produção vem sendo diminuída e a OXA vem sendo substituída pelo PZQ para o tratamento da esquistossomose, tanto em campanhas de saúde pública como na clínica.

1.2.1. Química e farmacocinética

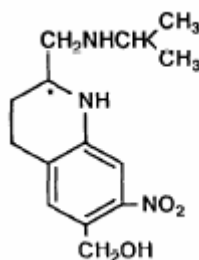


Figura 2- Oxamniquina

A OXA é uma tetrahydroquinolina semi-sintética (Figura 2) (Richard & Foster 1969). É facilmente absorvida por via oral e intramuscular, entretanto, sua administração pela via intramuscular não é recomendável, devido à dor intensa e prolongada (Foster et al. 1987). Após a administração de doses terapêuticas, sua meia vida é cerca de 1,5 a 2 horas. A concentração plasmática máxima (1 a 4 mg/L) é alcançada 1 a 4 horas após utilização de uma dose terapêutica de aproximadamente 15mg/Kg (Kokwaro & Taylor 1991).

A droga é extensamente metabolizada por processos oxidativos, sendo inativos seus principais metabólitos. A maior parte da droga é excretada pela urina, com apenas 0,4 a 1,9% eliminada sob a forma inalterada (Cioli et al. 1995).

Os parâmetros farmacocinéticos da OXA não são influenciados pela gravidade da doença. Segundo estudo feito por Daneshmend e Homeida (1987), indivíduos com a forma

hepatoesplênica avançada não apresentaram diferenças significativas entre a meia vida, a quantidade de fármaco na circulação sistêmica e tempo máximo para alcançar a concentração plasmática máxima, quando comparados a indivíduos saudáveis. Entretanto, variações na farmacocinética de pacientes sudaneses e brasileiros foram relatadas (Foster 1987) e provavelmente essas variações são relacionadas às diferenças genéticas das duas populações. A eficácia na terapêutica da doença está intimamente associada à origem geográfica dos parasitos, os quais apresentam diferenças na susceptibilidade à droga (Kaye 1978). Assim, segundo a Organização Mundial de Saúde (1990), uma única dose oral de OXA de 15 a 20mg/Kg se mostra eficaz no tratamento da esquistossomose na América do Sul, ilhas do Caribe e Oeste da África, enquanto 30 mg/Kg são usados no Leste da África, África Central e na península Arábica. Doses acima de 60 mg/Kg também podem ser necessárias no Egito, Sul da África e Zimbábue para se obter a eficácia terapêutica desejada.

1.2.2. Mecanismo de ação

A OXA atua principalmente na espécie *S. mansoni*, sendo os vermes adultos machos mais vulneráveis à ação da droga que os parasitos fêmeas (Cioli et al. 1995). Todos os estágios de infecção pelo *S. mansoni* podem ser tratados com OXA, embora os estágios invasivos (cercárias) e os vermes adultos sejam significativamente mais afetados pela droga que os estágios do fígado (esquistossômulos) e vermes jovens (Foster et al. 1971).

Apesar das suas propriedades anticolinérgicas, o principal mecanismo de ação da OXA está relacionado com a sua capacidade de inibir a síntese de ácidos nucleicos (Pica Mattoccia et al. 1989). A droga é ativada por esterificação através de enzimas do verme (sulfotransferases) e esta esterificação produz compostos eletrofílicos capazes de alquilar o DNA e outras macromoléculas do parasito (Cioli et al. 1993).

Mudanças morfológicas, não específicas, tais como: deteriorização do tegumento, alterações na glândula vitelínica da fêmea, diminuição do tamanho e pigmentação do sistema digestivo, também foram observadas em vermes provenientes de animais tratados com oxamniquina (Senft *apud* Cioli 1995).

1.2.3. Efeitos adversos e toxicidade

Os efeitos adversos observados, nos pacientes, após a administração de OXA, são normalmente leves, de curta duração e, freqüentemente, estão associados ao sistema nervoso central com o aparecimento de vertigens, sonolência e dores de cabeça que surgem dentro de 1 a 5 horas após a administração do fármaco. Outros sintomas como: desconforto abdominal,

vômito e diarreia, além de sintomas associados à destruição do parasito, como febre e eosinofilia, também são observados (Cioli et al. 1995).

Embora a OXA seja bem tolerada como mostrado por Prata et al. (1975) e seja raro o aparecimento de reações adversas graves, alguns estudos demonstram sérios efeitos no sistema nervoso central, após sua administração (Bina et al. 1976, Krajden et al. 1983, Carvalho et al. 1985).

A OXA demonstrou ter um efeito embriocida em coelhos e camundongos, quando administrada em doses 10 vezes maiores do que as usadas em seres humanos. Contudo, nenhum efeito tóxico para a mãe ou teratogênico foi observado em camundongos e ratos (Chvedoff et al. 1984). Estudos sobre toxicidade crônica em camundongos e hamsters não demonstraram evidências de efeitos carcinogênicos. Quando submetida ao ensaio em camundongos e no sistema de teste em *Salmonella typhimurium*, a OXA demonstrou uma baixa mutagenicidade (Batzinger & Bueding 1977). Também, não foram observadas anormalidades cromossômicas em animais e seres humanos (Ray et al. 1975).

1.3. Praziquantel

O PZQ está disponível para uso humano e veterinário no tratamento de doenças causadas por cestódeos e trematódeos, sendo utilizado na terapêutica da esquistossomose desde 1980 (Dayan et al. 2003). Atualmente, é o medicamento de escolha para o tratamento da esquistossomose causada por todas as espécies de *Schistosoma* (Doenhoff et al. 2002).

Na esquistossomose, a droga é efetiva em pacientes de todas as idades e com diferentes formas clínicas da doença, como, por exemplo, a forma hepatoesplênica descompensada (Bassily et al. 1985). Síndromes neurológicas causadas pelo *S. mansoni* e *S. haematobium* e formas toxêmicas agudas também respondem ao tratamento com praziquantel (Scringeour & Gajdusek 1985, Monson 1987, Nobre et al. 2001).

1.3.1. Química e farmacocinética

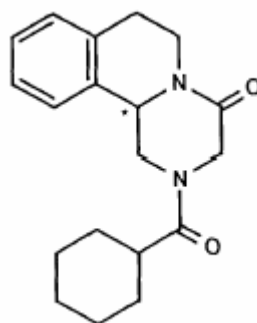


Figura 3- Praziquantel

O PZQ é um derivado sintético da pirazina isoquinolina (Figura 3). Sua preparação comercial é uma mistura racêmica composta de partes iguais de levo R (-) e dextro S (+) isômeros. Embora os dois isômeros apresentem o mesmo grau de toxicidade (Liu et al. 1986), somente o enantiômero (-) possui atividade esquistossomicida (Xiao & Catto 1989, Wu et al. 1991). Como demonstrado por Wu et al. (1991), pacientes tratados com 20mg/Kg de R (-) praziquantel obtiveram a mesma taxa de cura e menos efeitos colaterais quando comparados com pacientes tratados com 40 mg/Kg da mistura racêmica.

O fármaco possui biodisponibilidade de 80% e é rapidamente absorvido após a administração oral, alcançando concentrações séricas máximas de 0,2 a 2µg/mL dentro de 1 a 2 horas após uma dose terapêutica de 40mg/Kg (Mandour et al. 1990). Aproximadamente 80% da droga encontram-se ligada à proteínas plasmáticas. O PZQ sofre um acentuado metabolismo de primeira passagem, tendo como principais metabólitos compostos mono e di-hidroxilados com pouca ou nenhuma atividade antiparasitária (Andrews et al. 1983). Sua meia vida plasmática varia, geralmente, entre 1 a 2 horas na maioria das espécies, enquanto a de seus metabólitos varia de 3 a 8 horas. Sua eliminação é essencialmente renal e biliar, sendo 60 a 80% da droga liberadas na urina sob a forma inalterada, enquanto 15 a 35% são excretadas através das fezes (EMEA 1996).

A droga é principalmente metabolizada pelo sistema microsomal hepático P450 e, embora não totalmente esclarecido, é provável que as isoformas CYP 2B1 e CYP3A sejam as principais enzimas desse sistema, responsáveis pela biotransformação do fármaco, como demonstrado experimentalmente (Masimirembwa & Hasler 1994, Giorgi et al. 2001). Estudos têm demonstrado que as concentrações plasmáticas do praziquantel aumentam quando a droga é administrada com refeições ricas em carboidratos ou com a administração simultânea de substâncias que inibam a atividade do sistema microsomal P450, como a cimetidina o

cetoconazol e outros (Castro et al. 2003; Metwally 1995a, Diekmann et al 1989, Homeida et al. 1994). No entanto, verifica-se uma acentuada redução da biodisponibilidade da droga quando administrada concomitantemente com drogas indutoras do citocromo P450, como antiepiléticos ou corticosteróides, especialmente a carbamazepina, a fenitoína ou a dexametasona, respectivamente (Na-Bangchang et al. 1995). Diferentemente da OXA, a biodisponibilidade do PZQ está associada ao estado clínico dos pacientes acometidos pela esquistossomose. Assim, segundo El Guiniady et al. (1994), indivíduos com disfunção hepática, em decorrência de formas hepatoesplênicas graves, apresentam menor taxa de metabolização e distribuição do PZQ, em relação àqueles com função hepática normal. Além disso, há uma grande variação individual das concentrações plasmáticas de PZQ atribuída a diferenças farmacocinéticas, inerentes ao metabolismo de cada indivíduo (Metwally et al. 1995b).

1.3.2. Mecanismo de ação

O mecanismo de ação do PZQ não está totalmente esclarecido. Porém, alguns efeitos relacionados à sua ação sobre o parasito, tais como, contração muscular, deformações no tegumento e alterações metabólicas são bem documentados. Acredita-se que todos esses efeitos estejam direta ou indiretamente relacionados ao aumento do influxo de cálcio nos tecidos (Cioli et al. 1995), provocado após exposição do verme à droga.

Embora, não se tenha conhecimento exato deste influxo (Day et al. 1992), sabe-se que não é devido ao transporte direto de cálcio pelo PZQ, já que a droga não atua como um ionóforo (Pax et al. 1978). Uma possível explicação para este influxo seria a desestabilização dos canais de cálcio do parasito. Os canais de cálcio são poros formados por proteínas de membrana, constituídas por várias subunidades, dentre as principais: α_1 , β , α_2 - γ (Catterall 2000). As subunidades β dos canais de cálcio modulam a subunidade α_1 , a fim de manter as concentrações de cálcio em equilíbrio. Uma provável ação do PZQ seria o rompimento desta interação α_1/β culminando na perda do efeito modulatório da subunidade α_1 , pela β (Kohn et al. 2001).

A contração muscular, um dos primeiros efeitos a ser observado, é desenvolvida minutos após o contato com a droga. Este efeito é de grande importância uma vez que, em decorrência da contração, os vermes perdem a capacidade de fixação devido ao relaxamento da ventosa ventral (acetábulo) e são arrastados para o fígado, onde ocorrem reações inflamatórias, com conseqüente eliminação dos parasitos. Estudo realizado por Pax et al. (1978) demonstrou que a contração está diretamente relacionada ao influxo de cálcio nos

tecidos. Os autores observaram que os vermes não eram capazes de se contrair quando mantidos em meio de cultura livre de Ca^{+2} ou com altas concentrações de Mg^{+2} versus Ca^{+2} .

As deformações no tegumento também podem ser observadas logo após a exposição dos vermes à droga. Os machos apresentam extensa vacuolização na base do tegumento, seguida pelo surgimento de bolhas na superfície. O aparecimento de bolhas nas camadas superficiais parece ser desencadeado pelo processo de vacuolização do lado interno para o externo da camada sincicial (Meelhorn et al. 1981). As fêmeas, por sua vez, são mais afetadas nas camadas subtegumentares. Por outro lado, a inserção da molécula de praziquantel na membrana do parasito, descrita por Lima et al. (1994b), sugere que a interação entre o praziquantel e as moléculas lipídicas possa causar uma desestabilização no tegumento.

Em adição, as deformações causadas no tegumento levam à exposição de vários antígenos na superfície do parasito (Harnett & Kusel 1986). Após a exposição dos antígenos, ocorre ligação e penetração das células de defesa do hospedeiro para dentro dos vermes, resultando em lesões e, em consequência, os vermes são eliminados (Doenhoff et al. 1987).

Alguns estudos têm demonstrado que a eficácia terapêutica do PZQ no tratamento da esquistossomose é dependente do estado imune do hospedeiro (Brindley & Sher 1987, Fallon et al. 1992, Ribeiro et al. 2004). Assim, melhores respostas terapêuticas são obtidas em indivíduos que não possuem comprometimento em sua resposta imune. Sabah et al. (1985) mostraram que, em camundongos deficientes de células T, a eficácia da droga era menor do que em animais imunocompetentes. Da mesma forma, Brindley e Sher (1987) observaram que camundongos depletados de células B não respondiam de forma eficaz à terapia com praziquantel. Estes mesmos animais, ao receberem soro contendo anticorpos anti *S. mansoni*, responderam bem ao tratamento, ficando confirmada, assim, a sinergia entre o sistema imune e o PZQ. Além da sinergia entre o sistema imune e o PZQ, Lima et al (1998) relataram a menor eficácia da droga em animais com deficiência protéica.

A atividade esquistossomicida da droga ainda pode ser reforçada pela alteração dos níveis de glutatona no verme. A glutatona é um tripeptídeo fundamental para a sobrevivência da célula, tendo importância em processos vitais, como a síntese do DNA e proteínas, atividade enzimática, transporte e proteção celular (Meister & Anderson 1983). Ribeiro et al. (1998) observaram, após o tratamento de esquistossômulos “*in vitro*” com PZQ, uma diminuição dos níveis de glutatona dos parasitos. Segundo os autores, essa diminuição poderia tornar os vermes mais susceptíveis ao sistema imune do hospedeiro.

O estágio de desenvolvimento do parasito também pode ser considerado um fator que altera a eficiência terapêutica. Gonnert e Andrews (1977) estudaram a eficácia do PZQ nos diferentes estágios de desenvolvimento do parasito: cercárias, esquistossômulos, vermes

jovens e adultos e demonstraram a maior eficácia da droga nos estágios de cercárias e vermes adultos. Apesar desses relatos, Andrews (1981) observou que todos os estágios “*in vitro*” eram susceptíveis ao PZQ. Porém, a maior sensibilidade das cercárias e vermes adultos a essa droga foi confirmada em estudos “*in vivo*” e “*in vitro*” por Xiao et al. (1985), Sabah et al. (1986) e Pica Mattocia e Cioli (2004).

A maior susceptibilidade das fêmeas do parasito ao PZQ deve ser considerada como um fator inerente ao seu mecanismo de ação. Machos e fêmeas de *S. mansoni* apresentam diferenças em relação às propriedades e composição das membranas (Lima et al. 1994b) o que pode ser responsável pela maior atuação da droga nos vermes fêmeas.

Apesar da grande variedade de estudos sugerindo possíveis mecanismos de ação para o PZQ, os mecanismos pelos quais a droga afeta o *Schistosoma* não estão elucidados completamente e, assim, estudos devem ser desenvolvidos objetivando uma melhor compreensão da atuação deste fármaco no parasito.

1.3.3. Efeitos adversos e toxicidade

Os efeitos adversos mais comuns após a administração do PZQ, em pacientes, estão relacionados ao trato gastrointestinal: desconforto ou dor abdominal, náusea, vômito, anorexia e diarreia. Esses sintomas são observados em 50% dos pacientes, porém, são leves e de curta duração (Cioli et al. 1995). Outros efeitos incluem: dor de cabeça, tontura, sonolência, erupções cutâneas e algumas vezes febre e fadiga.

Efeitos colaterais graves e de curta duração tais como: cólica, vômito, urticária e edema foram observados após o tratamento com praziquantel em 352 dentre 422 indivíduos de um foco epidêmico. O aumento da gravidade desses efeitos foi diretamente proporcional à carga da infecção. Isto sugere que os efeitos colaterais estão relacionados não à droga e sim, à sua ação no parasito o que causa imediata exposição de antígenos, levando ao aparecimento de reações alérgicas. Além disso, a morte ou migração dos vermes do mesentério para o fígado pode levar ao congestionamento das veias (embolia) com subsequente cólica intestinal (Stelma et al. 1995).

Testes em animais têm demonstrado que o PZQ possui baixa toxicidade (Frohberg 1989). A droga possui uma ampla faixa de segurança, isto porque sua DL₅₀, em camundongos, é de aproximadamente 2560mg/Kg (Frohberg 1982), sendo a dose terapêutica para estes, cerca de 6,5 vezes menor.

Vários estudos sobre mutagenicidade, carcinogênese, teratogênese e embriotoxicidade indicam que o praziquantel não está associado a esses riscos (Frohberg 1984, Kramers et al. 1991), porém alguns autores sugerem a possibilidade de mutagenicidade e carcinogênese

(Montero et al. 1997). Embora não exista estudo toxicológico sobre o uso do PZQ em mulheres grávidas e lactentes, a experiência clínica com este fármaco sugere baixo potencial para causar efeitos tóxicos tanto para a mãe quanto para o feto (Olds 2003).

1.4. Associação oxamniquina/praziquantel

A associação de diferentes drogas com baixas dosagens de cada uma pode ser uma alternativa para trazer melhoras na terapêutica de várias doenças. Quando fármacos são associados, para um mesmo fim, suas dosagens tendem a ser reduzidas. Este fato é de grande relevância, uma vez que a diminuição nas dosagens pode levar a uma diminuição dos efeitos colaterais e tóxicos. Ao mesmo tempo, em se tratando de organismos vivos, a associação pode ser um recurso para retardar e/ou evitar o aparecimento do fenômeno de resistência. Como a OXA e o PZQ possuem diferentes mecanismos de ação, espera-se da combinação de ambos um efeito complementar (Delgado et al. 1992).

Muitos estudos foram realizados para avaliar a eficácia da associação OXA e PZQ no tratamento da esquistossomose (Shaw & Brammerr 1983, Pugh & Teesdale 1983, Campos et al. 1985, Creasey et al. 1986, Dietze & Prata 1986, Campos et al. 1987, Zwingenberger et al. 1987, Botros et al. 1989, Campos et al. 1989, Farid et al. 1990, Delgado et al. 1992, Gryscheck et al. 2004).

Shaw e Brammer (1983) observaram o efeito sinérgico das drogas no tratamento da esquistossomose mansoni experimental em seu período patente de infecção. Nesse estudo, animais com aproximadamente vinte pares de vermes foram tratados após sete a oito semanas de infecção, utilizando-se as drogas em associação ou isoladamente. O tratamento foi realizado por via oral, em dose única e os animais sacrificados 14 dias após o tratamento. Os autores observaram que a porcentagem de vermes mortos e encapsulados no fígado foi muito maior nos animais tratados com a associação, tendo como base um simples efeito aditivo.

Zwingenberger et al. (1987) compararam a eficácia da associação de baixas doses de OXA (7,5 mg/Kg) e PZQ (20 mg/Kg) com ambas as drogas empregadas isoladamente 18 mg/Kg e 40 mg/Kg, respectivamente, no tratamento da esquistossomose mansoni, em uma área endêmica do nordeste brasileiro (Crato-CE). Para esse estudo, os pacientes foram previamente selecionados, através do diagnóstico parasitológico, e a carga de verme antes do tratamento foi estimada através do número de ovos presente nas fezes, utilizando-se o método de Kato-Katz. Os pacientes foram alocados em três diferentes grupos e tratados com oxamniquina ou praziquantel ou com a associação. O índice de cura, definido como a ausência de ovos nas fezes dos pacientes, foi determinado após três, seis e doze meses do tratamento, utilizando-se o método de Kato-Katz associado à técnica do MIF (mertiolato,

iodo, formol). Os resultados obtidos demonstraram que os três regimes terapêuticos, nas doses utilizadas, foram semelhantes e satisfatórios, no tratamento da forma não complicada da doença. Além disso, a associação foi bem tolerada por todos os pacientes, não sendo observadas reações colaterais diferentes daquelas esperadas para OXA e o PZQ.

A combinação de OXA e PZQ também foi estudada nos diferentes estágios da esquistossomose mansoni por Botros et al. (1989). Camundongos foram infectados subcutaneamente com cerca de 100 cercárias. As drogas administradas em combinação (333mg/Kg de PZQ + 66,6mg/Kg de OXA) foram comparadas às drogas usadas isoladamente (OXA: 200 e 66,6mg/Kg; PZQ: 1000mg/Kg e 333mg/Kg). Os tratamentos foram realizados em diferentes estágios do amadurecimento do parasito, administrando-se as drogas 24 horas antes da infecção, 4 horas e 1, 2, 3, 4 e 5 semanas após a infecção. Para medir a eficácia terapêutica, os animais foram sacrificados 8 semanas após a infecção, com subsequente avaliação da carga de vermes e sua distribuição (mesentério/ fígado). A presença de ovos nos tecidos e o oograma foram também avaliados. O resultado mais significativo foi obtido com a associação administrada 4 horas após a infecção, reduzindo em 96% a quantidade dos vermes. Além disso, não foram detectados vermes no fígado ou intestino. Nesse estudo, as drogas PZQ e OXA foram administradas por via oral e intramuscular, respectivamente.

Delgado et al. (1992) investigaram a suscetibilidade de algumas cepas de *S. mansoni* à ação das drogas oxamniquina, praziquantel e suas associações por meio do tratamento experimental em camundongos. Para tanto, animais foram infectados, percutaneamente, com cerca de 60 cercárias e tratados 6 semanas após a infecção com doses altas e subcurativas, bem como diferentes combinações das duas drogas (PZQ: 250 e 500mg/Kg; OXA: 40, 60 e 100mg/Kg; PZQ + OXA: 33 + 25 mg/Kg, 66 + 12,5mg e 250 +40 mg/kg respectivamente). O tratamento foi realizado via intragástrica e em dose única. Oito semanas, após a infecção, os animais foram mortos, por overdose de pentobarbital, e a atividade esquistossomicida foi avaliada mediante a recuperação dos vermes presentes no sistema porta hepático, por perfusão portal, segundo a técnica de Smithers e Terry (1965) e pela contagem total de vermes. Nesse estudo, observou-se a eficácia da associação de baixas doses de OXA e PZQ na redução do número de vermes adultos. Os resultados reforçaram a ação sinérgica da associação, visto que, para obter a mesma taxa de redução de vermes, foram necessárias doses muito mais altas de cada droga, quando estas foram utilizadas isoladamente. Os autores sugerem que o efeito sinérgico, obtido no presente estudo e em outras investigações, possa ser devido à preferencial toxicidade de cada droga contra os diferentes sexos do parasito.

Campos et al. (1985) obtiveram uma boa resposta no tratamento de 35 pacientes adultos acometidos da forma intestinal da esquistossomose, utilizando a associação de

oxamniquina e praziquantel. O diagnóstico prévio foi feito pelo exame de fezes, através dos métodos de sedimentação e de Kato-Katz. A dose medicamentosa empregada correspondeu à metade da dose habitual de OXA (15mg/Kg = 7,5mg/Kg) e um quarto daquela recomendada para o PZQ (60mg/Kg = 15 mg/Kg). Os pacientes ingeriram, inicialmente, a OXA em preparação líquida e em seguida, os comprimidos de PZQ. Efeitos leves e de curta duração como: tontura, náusea, cefaléia, vômito, prurido e dor abdominal foram relatados por 13 dentre 35 pacientes, enquanto, nos demais não foi observada nenhuma reação. Foram considerados curados os indivíduos que não mais apresentaram ovos nas fezes, diagnosticados pelas técnicas referidas, uma vez por mês, durante um período de seis meses. Trinta indivíduos completaram o controle de cura e em apenas um foi observada a positividade no terceiro mês, concluindo o estudo com a eficácia de 96,66% atribuída à associação.

Campos et al. (1989) também obtiveram sucesso no tratamento de camundongos experimentalmente tratados com a mesma associação. Camundongos machos foram infectados subcutaneamente com cerca de 100 cercárias. Cinquenta dias após a infecção, os animais foram divididos em grupos e tratados com 50mg/kg de OXA ou 75mg/Kg de PZQ ou a associação das duas drogas (50mg/Kg de OXA + 75mg/Kg de PZQ). Para avaliar a eficácia das drogas, todos os camundongos foram sacrificados 10 dias após o tratamento quando foi realizada a pesquisa e a identificação dos estágios de desenvolvimento dos ovos, a partir de dois fragmentos do intestino, além da recuperação dos vermes adultos presentes nas veias mesentéricas e porta. Para esses procedimentos foram adotadas as técnicas descritas por Pellegrino e Siqueira (1956) e por Prata (1957). Com a metodologia e as doses escolhidas, os autores demonstraram uma boa eficácia entre a associação OXA e PZQ, a qual foi capaz de zerar a carga parasitária de 19 animais dentre 20 examinados.

Outro estudo interessante refere-se à obtenção de cura de indivíduos infectados pelo *Schistosoma haematobium* ao serem tratados com a associação de baixas doses de OXA (7,5 mg/Kg) e PZQ (15 mg/kg), considerando-se que a OXA tem pouco valor clínico no tratamento de infecções por *S. haematobium* (Pugh & Teesdale 1983).

Embora muitos estudos tenham demonstrado a ação sinérgica da associação, Dietze e Prata (1986) verificaram baixo percentual de cura e aparente ausência de sinergismo da combinação OXA/PZQ, no tratamento de indivíduos com esquistossomose de uma determinada área endêmica do Brasil (Caatinga do Moura –AL). Os pacientes selecionados para esse estudo foram diagnosticados através do exame parasitológico de fezes pelo método de Kato-Katz. Todos os pacientes foram tratados, independentemente do peso, com uma cápsula de OXA (250 mg) e um comprimido de PZQ (300mg), ingeridos simultaneamente. O controle de cura desse estudo consistiu em dois exames de fezes, a cada 45 dias, pelo método

de Kato-Katz, por um período de seis meses. A porcentagem total de cura foi de 39,6%, não evidenciando nenhuma vantagem dessa associação para a terapêutica da esquistossomose.

Campos et al. (1987) também não obtiveram bons resultados com o uso da associação, na terapêutica experimental da esquistossomose, no período pré-patente de infecção. Nesse estudo, os animais foram infectados subcutaneamente com cerca de 100 cercárias e aos 23 dias, posteriores à infecção, divididos em grupos e tratados com OXA (50mg/Kg), PZQ (75 mg/Kg) ou a associação de ambas (50mg/Kg + 75mg/Kg respectivamente). O controle de cura foi realizado 45 dias após a infecção, mediante pesquisa de ovos nas fezes e recuperação dos vermes vivos, através da perfusão realizada 60 dias após a infecção. As análises feitas evidenciaram positividade em todos os animais, observando-se a presença de ovos imaturos e vermes. Assim, os autores concluíram pela ineficácia da associação, com as dosagens e critérios de avaliação citados.

Farid et al. (1990) também não encontraram vantagens no uso de OXA (10 mg/Kg) associada ao PZQ (20 mg/Kg), na terapêutica da esquistossomose mansoni, devido à baixa porcentagem de cura de 20 pacientes submetidos ao tratamento com a associação. Mediante os resultados desse estudo, os autores se mostraram contra o uso de tal associação.

Diferentes dosagens da combinação OXA/PZQ (4mg/Kg + 8 mg/Kg; 7,5 mg/Kg + 15 mg/Kg e 10mg/Kg + 20 mg/Kg), respectivamente, foram testadas por Creasey et al. (1986), no tratamento de crianças infectadas, simultaneamente, com *S. mansoni* (mais de 100 ovos/g de fezes) e *S. haematobium* (acima de 50 ovos/mL de urina). A carga de verme, antes do tratamento, foi determinada através do método de Kato e da filtração convencional. Para avaliação dos índices de cura, exames parasitológicos de fezes foram realizados um, três e seis meses após o tratamento. A associação das drogas mostrou ser efetiva quando usada nas doses mais altas (10mg/Kg de OXA + 20 mg /Kg de PZQ). O efeito colateral mais freqüente foi o desconforto abdominal, relatado por 70% das crianças. A sinergia foi observada somente no tratamento da infecção por *S. mansoni*, diferentemente de Pugh e Teesdale (1983), que mostraram sinergismo entre a associação OXA/PZQ no tratamento da esquistossomose haematóbica. Apesar dos resultados, a associação não exibiu vantagens sobre o PZQ, considerando seu uso isoladamente. Assim, os autores concluíram que a associação de ambas as drogas não possui um papel significativo na terapia da esquistossomose haematóbica.

O estudo mais recente com essa associação foi realizado por Grysccheck et al. (2004). Os autores avaliaram a tolerância e eficácia do tratamento de 131 pacientes com diagnóstico parasitológico de esquistossomose mansoni, confirmado através dos testes HPJ (Hoffman, Pons e Janer) e Kato Katz. Para tanto, os pacientes foram divididos em dois grupos distintos que receberam ambas as drogas em dose única, segundo dois esquemas diferentes: grupo (1)

61 pacientes tratados com 12,5 mg/Kg de ambas as drogas; grupo (2) 70 pacientes, os quais receberam 7,5 mg/Kg e 15 mg/Kg de OXA e PZQ, respectivamente. As reações adversas foram leves, com relatos de tontura, sonolência, náusea vômito e dor abdominal. O controle de cura foi realizado através de exames de fezes, utilizando-se os métodos de HPJ e Kato Katz, sendo os quatro primeiros realizados a intervalos mensais a partir do tratamento e os posteriores a intervalos quinzenais. Os resultados mostraram taxas de cura de 59% e 41% respectivamente, para os grupos 1 e 2. Nesse estudo, a utilização de ambas as drogas empregadas conjuntamente, na terapêutica da esquistossomose, revelou ter pouca toxicidade, porém eficácia inferior àquela observada com o uso de cada droga isoladamente, em esquema de dose única.

1.5. Resistência aos agentes esquistossomicidas: oxamniquina e praziquantel

Apesar dos medicamentos existentes serem eficazes e seguros, o emprego destes em larga escala em áreas endêmicas, bem como tratamentos repetidos, pode resultar no desenvolvimento de cepas resistentes. A resistência é usualmente definida como a perda da sensibilidade dos parasitos à determinadas concentrações de fármaco, às quais esses mostravam-se previamente sensíveis.

A resistência, de algumas cepas de *S. mansoni* à OXA, tem sido demonstrada tanto em laboratório quanto no campo (Katz et al. 1973, Guimarães et al. 1979, Dias et al. 1978, Pedro et al. 1980, Araújo et al. 1980, Dias et al. 1982, Coles et al. 1987, Dias et al. 1988, Drescher et al. 1993, Fallon & Doenhoff 1994, Coelho et al. 1997, Conceição et al. 2000, Bonesso-Sabadini et al. 2002). Segundo Kinotti (1987) o *S. mansoni* possui grande capacidade de desenvolver resistência às doses terapêuticas de OXA empregadas no tratamento da esquistossomose.

Segundo Cioli et al (1992), a resistência à OXA é controlada por um único gene autossômico recessivo. Essa resistência é caracterizada pela perda da enzima ativadora da droga (sulfotransferase) a qual está presente em vermes sensíveis e ausente nos vermes resistentes. Possivelmente, uma inibição irreversível na síntese de RNA e DNA ocorra nos parasitos susceptíveis enquanto, nos resistentes esse fenômeno mostra-se reversível (Cioli et al. 1993).

Katz et al (1991) e Gomes et al (1993) observaram a ineficácia do tratamento, com PZQ, em indivíduos acometidos pela esquistossomose. Entretanto, o primeiro relato de resistência a essa droga foi descrita por Fallon e Doenhoff (1994), em laboratório. A partir disso, alguns estudos têm sugerido a existência de resistência ao PZQ (Fallon et al. 1995, Stelma et al. 1995, Araujo et al. 1996, Ismail et al. 1996, Ismail et al. 1999, Bonesso-Sabadini

et al. 2002). Sugere-se também, que baixos índices de cura, em algumas regiões, possam ser atribuídos à alta carga de vermes, altas taxas de infecção e reinfecção, além da presença, em grandes proporções, de vermes imaturos, responsáveis pela baixa eficácia do PZQ durante o tratamento (Doenhoff et al. 2002).

Segundo Cioli et al. (2004), os valores da ED₅₀, (dose efetiva para matar 50% dos vermes) em cepas menos susceptíveis ao praziquantel, foram, significativamente, diferentes e três vezes maiores do que as doses utilizadas em cepas sensíveis. William e Botros (2004) também relataram uma maior ED₅₀ para isolados menos susceptíveis ao praziquantel. Além disso, observaram uma correlação negativa entre o influxo de cálcio, a contração muscular e a ED₅₀. Alterações na expressão da enzima citocromo-c oxidase em cepas de *S. mansoni* resistentes e susceptíveis ao praziquantel já foram observadas (Pereira et al. 1998). Porém, a relação entre a redução da atividade da enzima e o fenótipo da resistência não foi esclarecido. Uma diminuição na magnitude do dano causado no tegumento dos vermes resistentes quando comparado a schistosomos sensíveis foi também observada (William et al., 2001). Apesar desses estudos, investigações sobre os mecanismos de resistência ao praziquantel são dificultadas devido à ausência de uma clara compreensão do modo de ação desta droga, no *Schistosoma* (Redman et al. 1996).

Nos últimos anos, o sistema excretor de schistosomos tem recebido maior atenção, devido à sua importância na excreção de resíduos metabólicos e xenobióticos críticos para sobrevivência deste organismo. Além disso, evidências sugerem que este sistema possua um importante papel na interação parasito – hospedeiro. Todos os platelmintos, incluindo o *S. mansoni* possuem um sistema excretor protonefridial, responsável pela maior parte da sua atividade excretora (Wilson & Webster 1974). O sistema protonefridial do *Schistosoma* consiste de múltiplas células flama com túbulos ramificados, ligados pelo epitélio, além de possuir uma vesícula excretória (poro) a qual se comunica com o meio externo por meio de um nefridioporo.

Sato et al. (2002) descreveram uma técnica para avaliar a atividade excretora do *S. mansoni*, utilizando o marcador fluorescente denominado Resorufin, o qual é um substrato para a P-glicoproteína (Pgp). A Pgp, assim como outras proteínas associadas à resistência a multi drogas (MRP), são proteínas transportadoras ligadas à membrana e dependentes de ATP, característica que as coloca dentro da superfamília de transportadores ABC (“ATP-binding cassette”) A Pgp é uma proteína de aproximadamente 170 KDa, localizada em superfícies epiteliais e endoteliais do corpo humano, incluindo fígado, rins, trato gastrointestinal e a barreira hematoencefálica, onde tem um papel importante na absorção, eliminação e distribuição de muitos xenobióticos, incluindo uma grande variedade de drogas

(Schinkel et al. 2003). A presença de homólogos de Pgp, MRP, ambos transportadores ABC, vem sendo descrita em protozoários (Ullman 1995, Ouellette et al. 2001), nematódeos e trematódeos, inclusive no *S. mansoni* (Bosch et al. 1994). Estes transportadores vêm sendo frequentemente relacionados com a resistência de células, principalmente tumorais, a várias drogas (Stavrovskaya 2000, Sukhai & Miller 2000, Frézard et al. 2001). Além disso, tem sido observado o envolvimento desses transportadores na resistência de alguns parasitos a drogas antiparasitárias (Gueiros-Filho et al. 1995, Martin et al. 1987). Por meio da utilização de várias substâncias, inibidoras da Pgp e de outros transportadores de membrana, Sato et al (2002) observaram que a Resorufin é excretada dos vermes adultos de *S. mansoni* por uma suposta Pgp expressa no epitélio do sistema excretor do parasito, semelhante à das células dos mamíferos (Bosch et al. 1994). O trabalho de Sato et al. (2002) traz novas perspectivas a fim de se estudar o sistema excretor desse parasito, até então, não estudado devido à falta de técnicas estáveis para monitorar a atividade excretora.

Com base nessas informações, o estudo das drogas OXA e PZQ sobre o sistema excretor deste parasito, é de grande interesse uma vez que não se têm dados sobre a ação destas nesse sistema. Além do mais, a atividade excretora desempenhada pela Pgp, assim como a recuperação do dano causado no tegumento, pela ação do PZQ, são processos que dependem da síntese de novas proteínas. Sabendo-se que a OXA tem como principal mecanismo de ação a inibição da síntese de ácidos nucleicos, seria de grande valia explorar a ação conjunta destas duas drogas (OXA e PZQ), sobre o sistema excretor e sobre a membrana tegumentar do parasito. Apesar de muitos estudos terem sido realizados, a fim de avaliar a eficácia da associação, ainda é polêmico o uso desta não se obtendo, até o momento, um resultado claro sobre esta combinação. Enquanto alguns trabalhos demonstram um efeito sinérgico da associação OXA/PZQ, outros não obtêm uma boa resposta, utilizando-se esta mesma associação. Desta maneira, fica difícil chegar a uma conclusão sobre o tema, principalmente devido a diferenças metodológicas entre os estudos.

Nosso estudo visa contribuir para elucidar as reais vantagens da associação OXA/PZQ, bem como de sua possível sinergia. Ao mesmo tempo, o esclarecimento do local de atuação desta associação no parasito, poderá fornecer subsídios importantes para o desenvolvimento de estratégias, tanto para a síntese de novos compostos, como para novas abordagens metodológicas na terapêutica da esquistossomose, uma vez que se faz necessário, a busca por novas alternativas, a fim de evitar e/ou retardar o aparecimento de cepas resistentes. Desta forma, este trabalho vem discutir a associação OXA/PZQ utilizando para isto, testes “*in vivo*” aliados a técnicas de fluorescência “*in vitro*”.

2 Objetivos

2.1. Objetivo geral

O presente trabalho tem como objetivo estudar o efeito das drogas oxamniquina, praziquantel e da associação destas drogas sobre o verme adulto de *S. mansoni* em experimentos “*in vivo*” e “*in vitro*”.

2.2. Objetivos específicos

1. Verificar e avaliar a eficácia da associação oxamniquina/praziquantel, em comparação com as drogas isoladas, no tratamento da esquistossomose mansoni experimental (cepa LE), através da redução da carga parasitária.

2. Descrever, por meio da microscopia de fluorescência, as possíveis alterações em nível do sistema excretor e do tegumento do parasito, quando expostos às drogas oxamniquina e praziquantel, isoladamente ou em associação, “*in vitro*” e “*in vivo*”.

3 Materiais e métodos

3.1. Animais e parasitos

Camundongos *Mus musculus*, albinos, sem linhagem definida, fêmeas, com aproximadamente dois meses de idade, pesando em média 25g, nascidos e criados no biotério do Centro de Pesquisas René Rachou/Fundação Oswaldo Cruz; foram utilizados nos experimentos, para avaliação da atividade das drogas. Os animais foram mantidos em gaiolas devidamente identificadas e alimentados com ração comercial e água, em todos experimentos.

Os procedimentos realizados com os animais foram submetidos à Comissão de Ética no Uso de Animais da Fundação Oswaldo Cruz (CEUA/FIOCRUZ).

As cercárias de *Schistosoma mansoni*, cepa LE (Belo Horizonte), usadas para infecção, foram fornecidas pelo Moluscário do CPqRR, onde o ciclo do parasito é mantido rotineiramente, por mais de 30 anos, utilizando-se o modelo *Biomphalaria glabrata* – camundongo - *Biomphalaria glabrata*.

3.2. Teste de toxicidade aguda

Para o teste de toxicidade aguda foram selecionados 120 camundongos fêmeas, pesando entre 25 a 30 gramas. Os animais foram pesados e divididos em seis grupos devidamente identificados. Os animais do grupo 1 receberam a DL₅₀ (dose letal efetiva para 50% dos animais) da OXA (Mansil – pfizer), equivalente a 1300mg/Kg de peso (Foster et al. 1973), aos animais pertencentes ao grupo 2 foi administrado a DL₅₀ do PZQ (Farmanguinhos/FIOCRUZ), aproximadamente, 2650mg/Kg segundo Frohberg (1982). O grupo 3 recebeu a associação das correspondentes DL₅₀ de OXA e PZQ (1300mg/Kg + 2650mg/Kg respectivamente). Ao grupo 4 foi administrada a metade das doses correspondentes as DL₅₀ de OXA e PZQ (650mg/Kg + 1325mg/Kg respectivamente). Os grupos 5 e 6 receberam metade da DL₅₀ de OXA (650 mg/Kg) e PZQ (1325 mg/Kg), respectivamente. Com a ajuda de gral e pistilo, os comprimidos de PZQ foram macerados para a obtenção do medicamento em pó. As cápsulas de OXA foram abertas para utilização do pó. Os fatores de correção correspondentes a cada medicamento foram calculados em função da quantidade de princípio ativo de cada comprimido ou cápsula. As drogas foram pesadas separadamente por grupo, considerando-se o peso médio de cada grupo, suspensas em 6mL de água destilada e administradas aos animais individualmente por via oral (gavagem), recebendo cada animal 0,3mL da droga suspensa em água. Nos grupos que

receberam ambas as drogas, essas foram administradas separadamente (0,3 ml de cada droga). Os camundongos foram observados durante 24 horas.

3.3. Testes “*in vivo*” para avaliação da eficácia da associação oxamniquina/praziquantel

Estes testes foram realizados para avaliar a redução da carga parasitária após o tratamento com a associação OXA/PZQ e compará-los às drogas usadas separadamente.

3.3.1. Obtenção, concentração, contagem de cercárias e infecção dos animais

Para obtenção das cercárias, caramujos da espécie *B. glabrata*, infectados há mais de 30 dias com miracídios de *S. mansoni*, foram colocados em um becker contendo água desclorada e expostos à luz artificial, durante duas horas. A contagem das cercárias foi realizada, retirando-se uma alíquota do becker, a qual foi distribuída em uma placa escavada. As cercárias foram mortas com lugol e contadas com auxílio de lupa. As alíquotas foram ajustadas, a fim de se obter uma concentração equivalente a 50 ± 5 cercárias, em um volume de 0,2 mL.

A infecção dos camundongos foi feita individualmente, no dorso, por via subcutânea, segundo Pellegrino e Katz (1968), utilizando uma seringa de aço-inox com volume ajustável. Um total de duzentos e quatro animais foram infectados recebendo cada um 50 ± 5 cercárias.

3.3.2. Tratamento

Após 45 dias de infecção, os camundongos foram pesados com o auxílio de balança eletrônica digital e divididos em grupos de 12 animais cada. Os animais foram tratados com OXA (Mansil – Pfizer S. A) ou PZQ (FIOCRUZ/Brasil) ou a associação OXA/PZQ, com a dose ajustada por quilo de peso de acordo com cada grupo experimental. Com a ajuda de gral e pistilo, os comprimidos de PZQ foram macerados para a obtenção do medicamento em pó. As cápsulas de OXA foram abertas para utilização do pó. Os fatores de correção correspondentes a cada medicamento foram calculados em função da quantidade de princípio ativo de cada comprimido ou cápsula. As drogas foram pesadas em balança analítica, suspensas em água e administradas por via oral com o auxílio de seringa e agulha própria para gavagem. Os tratamentos foram realizados individualmente e em dose única. Três experimentos distintos foram realizados e os seguintes esquemas terapêuticos administrados: Os animais do primeiro experimento foram tratados com 50, 100 e 200 mg/Kg de OXA; 200 e 400 mg/kg de PZQ; 50mg/Kg de OXA associado a 200mg/kg de PZQ e 100mg/Kg de OXA combinado a 200mg/Kg de PZQ. No segundo e terceiro experimentos, foram administrados

100 mg/Kg de OXA; 200 mg/kg de PZQ e 100mg/Kg de OXA combinado a 200mg/Kg de PZQ, sendo que para o terceiro experimento, os grupos foram compostos por 15 animais cada. Os grupos controles dos experimentos não receberam tratamento (Quadro 1).

Quadro 1 - Grupos experimentais e tratamentos

	Grupo	n° de animais	Tratamento
Experimento 1	1	12	Controle
	2	12	200mg/Kg de PZQ
	3	12	400mg/Kg de PZQ
	4	12	50mg/Kg de OXA
	5	12	100mg/Kg de OXA
	6	12	200mg/Kg de OXA
	7	12	50mg/Kg de OXA + 200mg/Kg de PZQ
	8	12	100mg/Kg de OXA + 200mg/Kg de PZQ
Experimento 2	1	12	Controle
	2	12	200mg/Kg de PZQ
	3	12	100mg/Kg de OXA
	4	12	100mg/Kg de OXA + 200mg/Kg de PZQ
Experimento 3	1	15	Controle
	2	15	200mg/Kg de PZQ
	3	15	100mg/Kg de OXA
	4	15	100mg/Kg de OXA + 200mg/Kg de PZQ

3.3.3. Perfusão – Recuperação dos vermes adultos

Trinta dias após o tratamento, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical. A perfusão dos camundongos foi realizada individualmente, segundo a técnica de Pellegrino e Siqueira (1956): após exposição das vísceras, a veia porta foi seccionada, próximo à penetração no fígado e a porção terminal do intestino foi amarrada. Com o auxílio de uma agulha, acoplada a um pipetador automático (Brewer), foi injetada solução heparinizada (0,016% = 0,83 UI/mL) de salina 0,85% na aorta torácica, permitindo assim, a perfusão das veias mesentéricas e a recuperação dos vermes adultos existentes. A perfusão do fígado foi realizada através de injeção da solução de salina descrita anteriormente no hilo hepático. Os parasitos foram coletados em becker de 200 mL, lavados em solução salina e contados com auxílio de lupa, separando-se machos de fêmeas (Figura 4).

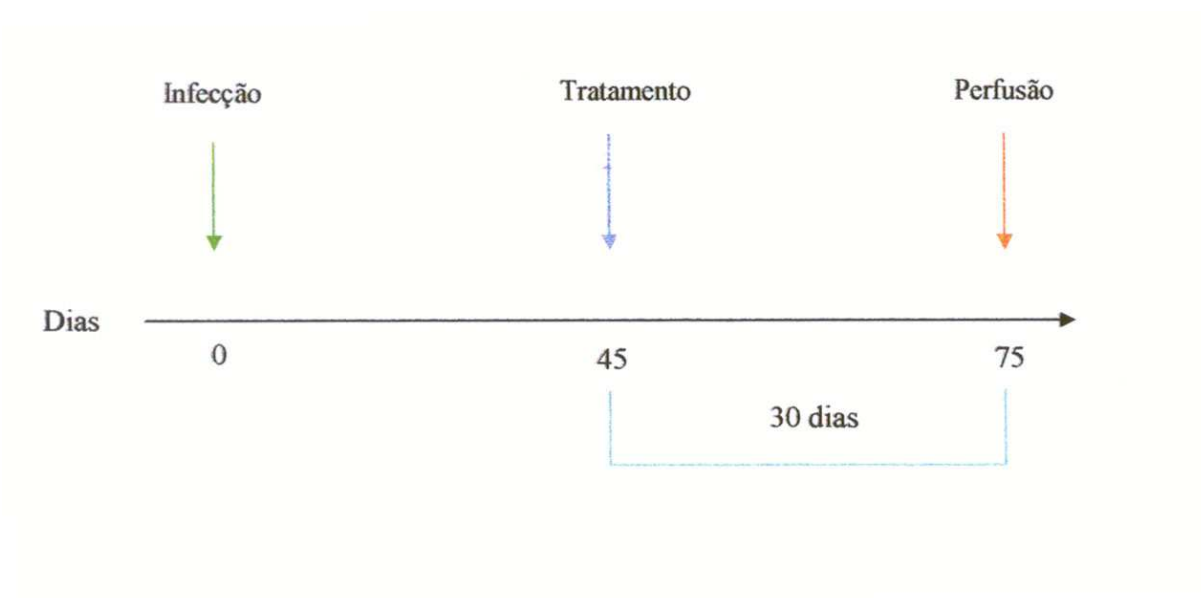


Figura 4 - Esquema de infecção, tratamento e perfusão

3.4. Experimentos “*in vitro*” - Avaliação da atividade excretora e do dano causado no tegumento através de sondas fluorescentes

3.4.1. Fluorescência (Microscopia de Fluorescência)

O fenômeno da fluorescência pode ser descrito sucintamente 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 provem de fótons emitidos de uma radiação luminosa (lâmpada incandescente de mercúrio, UV). Os fluoróforos são projetados para localizar uma área específica da amostra a ser observada ou para responder a um estímulo específico. Assim, esses fluoróforos 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.

3.4.2. Marcação dos parasitos com sondas fluorescentes

Para avaliar o efeito das drogas OXA e PZQ e da associação destas, sobre o funcionamento do sistema excretor e sobre a camada superficial do tegumento do verme adulto de *S. mansoni*, foram realizados diferentes experimentos, utilizando marcadores fluorescentes (sondas) e microscopia de fluorescência.

As sondas utilizadas nos experimentos foram:

a) Resorufin

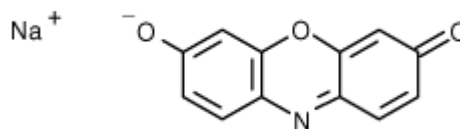


Figura 5 - Estrutura molecular da Resorufin. (fonte: Sato et al. 2002)

A Resorufin (Figura 5) é um sal sódico (7-hidroxi 3-fenoxazina), de natureza fluorescente e um modulador/substrato da P-glicoproteína (Pgp) (utilizada por: Sato et al. 2002). A Resorufin difunde-se passivamente através do tegumento dos vermes adultos de *S. mansoni* e é excretada do mesmo, através de uma suposta Pgp expressa no epitélio excretor. Assim, avaliamos o efeito das drogas OXA e PZQ sobre a atividade excretora, mais precisamente sobre a Pgp, utilizando a Resorufin. A Resorufin 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 de 10 mg/mL.

b) Hoechst 33258

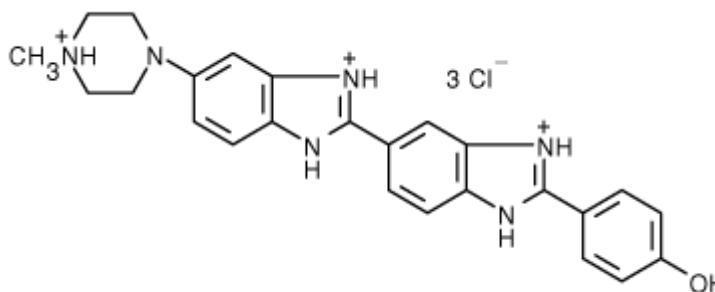


Figura 6 - Estrutura molecular da Hoechst 33258. (fonte: Handbook of fluorescent Probes 2002 - Molecular Probes)

A Hoechst 33258 (Figura 6) (bis benzamida) (2,4 hidroxifenil 5, 4 metil, 1 piperazina 2,5 bi H-benzimidazol) é uma sonda hidrofílica e fluoresce somente quando se liga ao DNA das células. Porém, por ser hidrofílica só consegue se difundir para o interior das células quando há presença de lesões, atuando como um indicador de integridade de membrana. A observação do dano causado pelas drogas OXA e PZQ sobre a membrana tegumentar foi determinada pela fluorescência emitida pela sonda Hoechst 33258, quando está foi capaz de se ligar ao DNA. As áreas com fluorescência (azul) corresponderam a regiões lesadas (utilizada por: Lima et al. 1994a). A Hoechst 33258 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 de 10 mg/mL.

c) Alexa-Fluor 488 faloidina

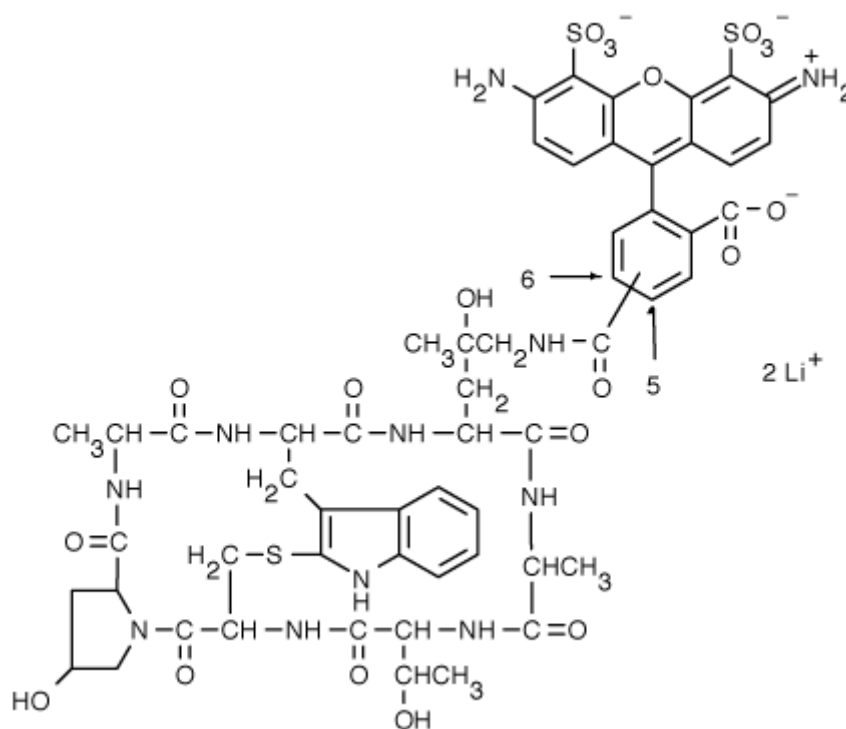


Figura 7 – Estrutura molecular da Alexa Flúor 488 faloidina. (fonte: Handbook of fluorescent Probes 2002 - Molecular Probes)

A AlexaFluor 488 faloidina (Figura 7) liga-se especificamente a actina (Utilizada por Waterman-Store et al. 2000). A actina é um dos constituintes internos dos tubérculos dos vermes adultos de *S. mansoni*. A presença de dano no parasito causado pela ação das drogas OXA e PZQ pode levar à exposição de actina, a qual irá se ligar a faloidina que está conjugada com a Alexa flúor 488 (fluoróforo). Assim, áreas de fluorescência (verde) se referem à áreas onde houve a exposição de actina. A Alexa Flúor 488 utilizada em nossos experimentos foi obtida da Molecular Probes Inc, Eugene, Oregon, USA, sob a forma líquida e diluída em metanol obtendo-se uma solução estoque com concentração de 1mg/mL.

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

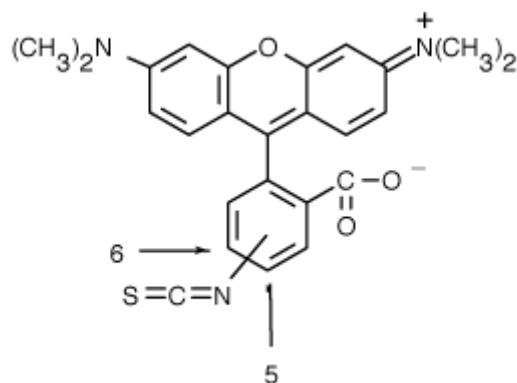


Figura 8 - Estrutura da rodamina isotiocianato. (fonte: Handbook of fluorescent Probes 2002 - Molecular Probes)

As lectinas são proteínas, e entre essas a lectina de *glicine max* se liga à carboidratos de membrana, mais especificamente a N-acetilgalactosamina (fração glicídica de glicolípideos e glicoproteínas) composto abundante nas membranas celulares. A lesão da membrana celular pode levar a 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) (Figura 8). Assim, a fluorescência (vermelha) proveniente da TRITC é referente a locais de dano, onde houve a exposição de N-acetilgalactosamina (utilizada por Lima et al 1994b). 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, obtendo-se uma solução estoque com concentração de 1mg/mL.

e) AF-18 (5-octadecanoilaminofluoresceína)

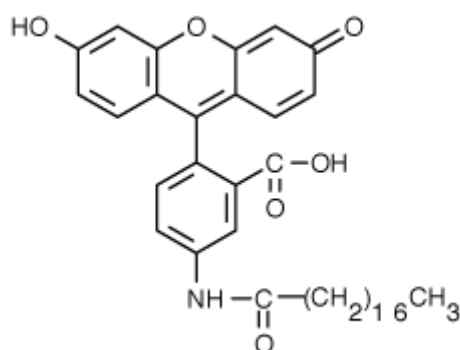


Figura 9 – Estrutura molecular da AF-18. (fonte: Handbook of fluorescent Probes 2002 - Molecular Probes)

A AF-18 (5-octadecanoilaminofluoresceína) (Figura 9) insere-se na monocamada externa da superfície da membrana (Figura 10) e tem sua difusão aumentada para o interior desta quando há presença de lesões. A ocorrência de danos na membrana tegumentar do

parasito, faz com que haja uma internalização da fluorescência que antes ficava restrita a superfície da membrana. A AF-18 foi obtida da Molecular Probes Inc, Eugene, Oregon, USA sob a forma líquida e diluída em metanol obtendo-se uma solução estoque com concentração de 1mg/mL.

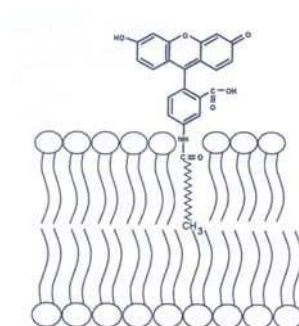


Figura 10 – Inserção da sonda 5-octadecanoilaminofluoresceína (AF-18) dentro da membrana. (fonte: Cox & Radolf. 2001)

Apesar das sondas Alexa-Fluor 488 e AF-18 possuírem comprimentos de ondas próximos, referentes a excitação e emissão, sendo usado para elas um mesmo filtro, foi possível utilizar as duas sondas simultaneamente, devido a diferença de estabilidade entre elas. A Alexa-Fluor é uma sonda estável, ao passo que a AF-18 possui baixa estabilidade. Assim, após poucos minutos sob a incidência de luz ultra violeta (UV), a AF-18 perde a sua capacidade de emitir fluorescência, fenômeno conhecido como “*photobleaching*” enquanto que a Alexa Fluor continua a emitir fluorescência por um longo período de tempo.

3.4.3. Perfusão – Obtenção dos parasitos para uso nas técnicas de fluorescência

Camundongos com 6 a 7 semanas de infecção foram sacrificados por “*overdose*” de pentobarbital sódico 3% (Hypnol - Fontoveter), administrado por via intraperitoneal ($\pm$ 0,2 mL). Os vermes adultos de *S. mansoni* foram obtidos através da perfusão retrógrada do fígado, de acordo com o método de Smithers e Terry (1965): posteriormente à exposição das vísceras abdominais e do coração, a veia porta foi seccionada, na altura dos rins, com o auxílio de uma agulha conectada a uma seringa. Imediatamente, na parte inferior dos ventrículos do coração foi injetado meio de cultura RPMI – 1640, pH 7,4 (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) heparinizado (0,016% = 0,83 UI/mL), obtendo-se assim, os parasitos. Estes foram lavados com meio de cultura RPMI – 1640, contendo 0,3% de soro albumina bovina (BSA) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA).

3.4.4. Experimento 1 - Avaliação da atividade do sistema excretor do verme adulto de *S. mansoni* exposto ao PZQ, antes ou após marcação com a sonda Resorufin

Posteriormente à perfusão, os vermes adultos foram lavados e transferidos para 4 placas de cultura (4 pares por placa), contendo meio de cultura RPMI-1640 (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) suplementado com 5%(v/v) de soro bovino fetal inativado (SBF) (Gibco Limited, Paisley, Scotland) e 10 μ L (100 μ g) de ampicilina (solução estoque 10 mg/mL) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA), perfazendo um volume final de 2 mL para cada placa. Em duas, das quatro placas, adicionaram-se 10 μ L de Resorufin (solução estoque a 10mg/mL) que então, foram incubadas em estufa a 37°C e 5% CO₂ por 30 minutos. Após este período, foram adicionados à uma das placas 10 μ L de metanol (controle), enquanto na outra placa, foram adicionados 10 μ L de uma solução estoque de PZQ a 0,1mg/mL. Estas placas foram novamente incubadas por 15 minutos, nas mesmas condições anteriores. Ao final deste período, os vermes foram lavados 5 vezes com 2mL de meio de cultura RPMI-1640 suplementado com 0,3% (p/v) de soro albumina bovina (BSA) e preparados para a visualização no microscópio. Paralelamente, foram adicionados em uma das duas placas restantes, 10 μ L de metanol, enquanto que na outra, foram adicionados 10 μ L de uma solução estoque de PZQ a 0,1mg/mL. As placas foram incubadas por 15 minutos, como descrito anteriormente. Ao término desta incubação, os vermes foram lavados, uma vez, com 2mL de meio contendo 0,3% (p/v) de BSA e colocados novamente em meio de cultura RPMI-1640 suplementado com SBF inativado e ampicilina, como anteriormente descrito. Em seguida, foram adicionados 10 μ L de Resorufin (solução estoque 10mg/mL), em cada placa, incubando-as por 45 minutos, nas mesmas condições anteriores. Após a incubação, os vermes foram lavados 5 vezes com 2mL de meio de cultura RPMI-1640, suplementado com 0,3% (p/v) de BSA, para posterior observação no microscópio de fluorescência (Figura 11).

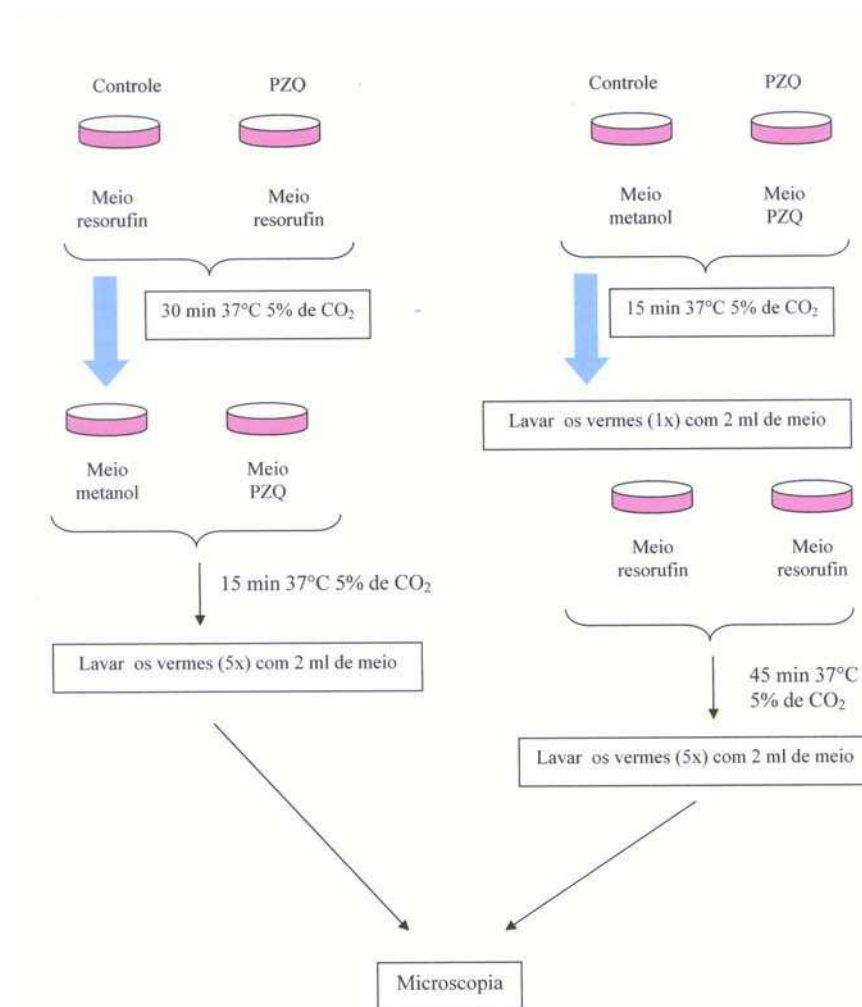


Figura 11 - Esquema do experimento 1

3.4.5. Experimento 2 - Avaliação da atividade do sistema excretor do verme adulto de *S. mansoni* expostos à diferentes concentrações de praziquantel

Após a perfusão e obtenção dos vermes adultos, estes foram lavados e transferidos para 4 placas de cultura (4 pares por placa), contendo meio de cultura RPMI –1640 suplementado com 5% (v/v) de SFB inativado, 10µL (100µg) de ampicilina (solução estoque 10mg/mL). Em seguida, os mesmos foram expostos à diferentes concentrações de PZQ (0,5; 1 e 2 µg/mL), por 15 minutos em estufa a 37°C com 5%CO₂. As soluções estoque de PZQ (0,1; 0,2 e 0,4 mg/mL) foram preparadas em metanol. Ao controle foram adicionados 10µL de metanol. As placas apresentaram um volume final de 2 mL. Após o período de incubação, os vermes foram lavados uma vez com 2 mL de meio de cultura contendo 0,3% (p/v) de BSA. Novamente, estes foram incubados, por 1 hora, nas mesmas condições anteriores, porém sem a presença da droga. Ao fim deste período, o meio de cultura foi trocado e adicionou-se à cada

placa 10µL de Resorufin (solução estoque 10mg/mL). As placas foram colocadas por mais 30 minutos na estufa. Ao término desta terceira e última incubação, os parasitos foram lavados 5 vezes com 2mL de meio de cultura RPMI –1640 contendo 0,3% (p/v) de BSA, para posterior montagem da lâmina e visualização no microscópio (Figura 12).

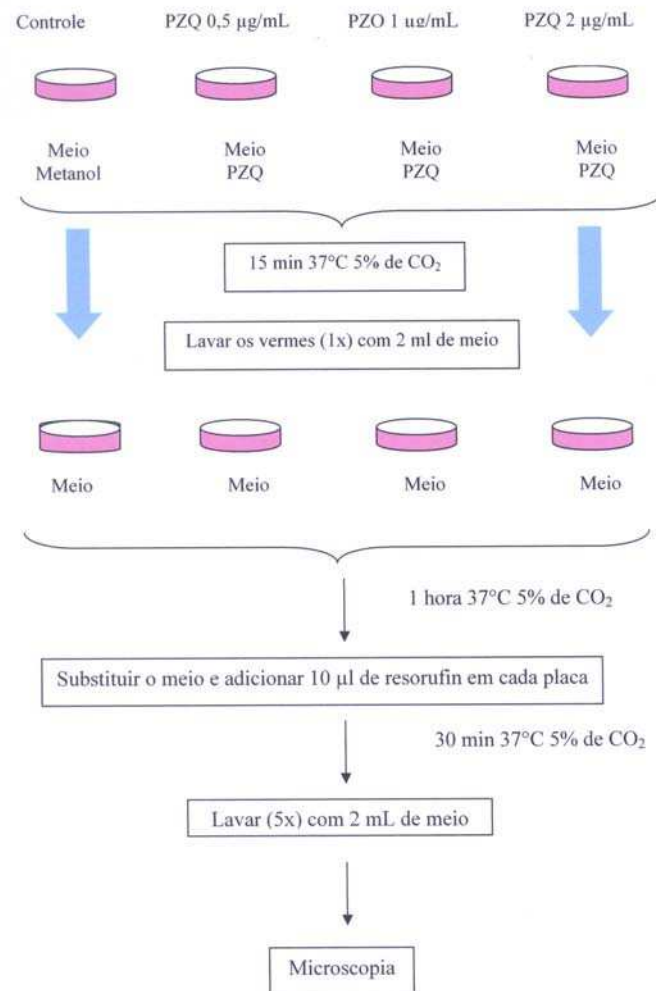


Figura 12 - Esquema do experimento 2

3.4.6. Experimento 3 - Avaliação da atividade do sistema excretor do verme adulto de *S. mansoni* expostos às drogas isoladamente ou em associação

Após a perfusão e lavagem, os vermes adultos de *S. mansoni* foram transferidos para 5 placas de cultura contendo meio de cultura RPMI-1640, suplementado com 5% (v/v) SFB inativado e 10µL de solução de ampicilina a 10mg/mL (100µg). Em cada placa foram colocados 4 pares de vermes. Estes, foram expostos à OXA (50µg/mL) ou ao PZQ (2µg/mL) ou à associação OXA + PZQ (50µg/mL + 2µg/mL e 25µg/mL + 1µg/mL), respectivamente.

Ao grupo controle foram adicionados 10µL de metanol, mantendo assim, as mesmas condições dos grupos onde os parasitos foram expostos às drogas, uma vez que as soluções estoque de OXA (10mg/mL e 20 mg/mL) e PZQ (0,4mg/mL e 0,8mg/mL) foram preparadas em metanol. O volume final de cada placa foi de 2 mL. Em seguida, as placas foram incubadas em estufa a 37°C e 5% CO₂ por 15 minutos. Após o período de incubação os vermes foram lavados uma vez com 2mL de meio de cultura RPMI-1640, contendo 0,3% (p/v) BSA. Após a lavagem, os vermes foram colocados novamente em meio de cultura RPMI-1640 suplementado com 5%(v/v) de SBF inativado e ampicilina, como anteriormente descrito. Os parasitos expostos, inicialmente, à OXA, e à associação OXA/PZQ, foram novamente expostos à OXA na mesma concentração anterior, enquanto nas placas referentes ao controle e ao PZQ foram somente adicionados 10µL de metanol. As placas, contendo os vermes, foram mais uma vez, incubadas nas mesmas condições anteriores por 2 horas. Ao término deste período, foram adicionados 10µL de Resorufin (solução estoque 10mg/mL) em cada placa, incubando-as novamente, por 30 minutos. Decorridos trinta minutos, os vermes foram lavados 5 vezes com meio de cultura RPMI-1640 contendo 0,3%(v/v) de BSAe preparados para observação no microscópio de fluorescência (Figura 13).

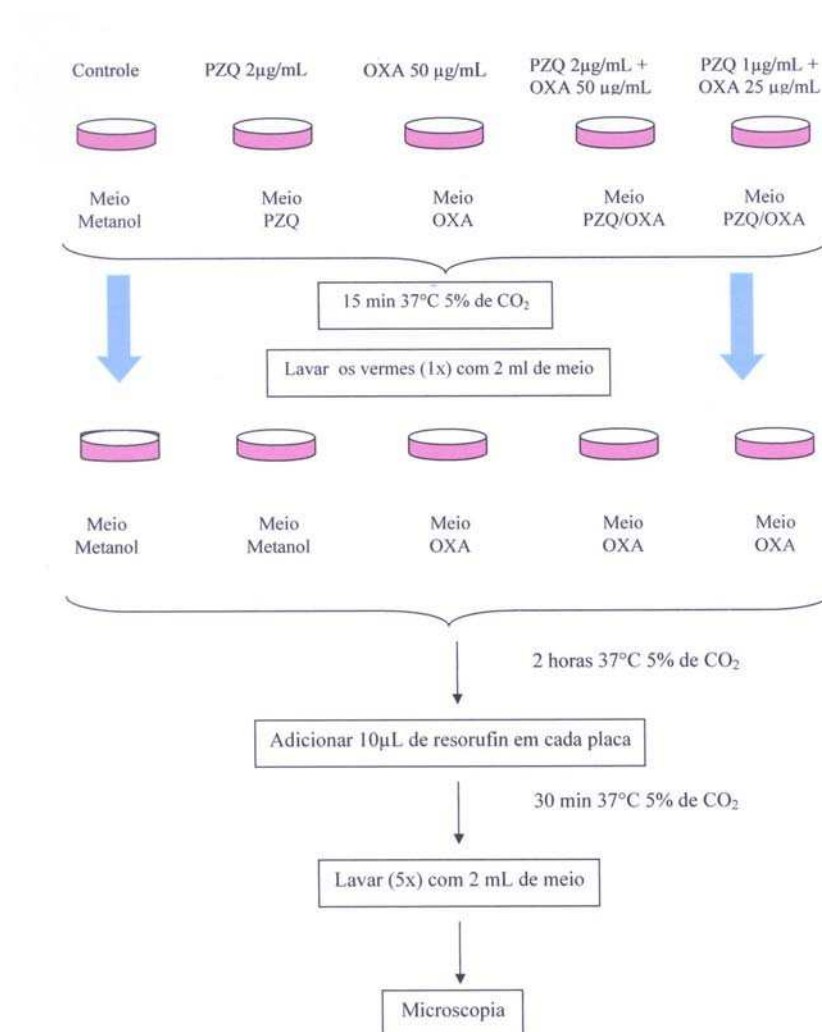


Figura 13 - Esquema do experimento 3

3.4.7. Experimento 4 - Avaliação do dano causado ao tegumento do verme adulto de *S. mansoni* expostos à oxamniquina e ao praziquantel isoladamente ou em associação

Para realização deste experimento, o mesmo procedimento aplicado no experimento 3 (3.4.6) foi utilizado. Porém, no lugar de adicionar 10µL de Resorufin (10mg/mL), foram colocados 10µL de Hoechst 33258 (solução estoque 10mg/mL), 5µl de Alexa Flúor 488 faloidina (solução estoque 1mg/mL), 10µl de lectina de *Glicina max* (soja) SBA (solução estoque 1mg/mL) e 50 µl de AF-18 (solução estoque 1mg/mL); incubando-se as placas por 1 hora. Todas estas sondas foram empregadas com a finalidade de detectar danos causados na membrana tegumentar dos parasitos. Ao final do experimento, os vermes foram lavados 3 vezes com 2ml de meio de cultura RPMI-1640, contendo 0,3% (p/v) de BSA e preparados para leitura no microscópio (Figura 14).

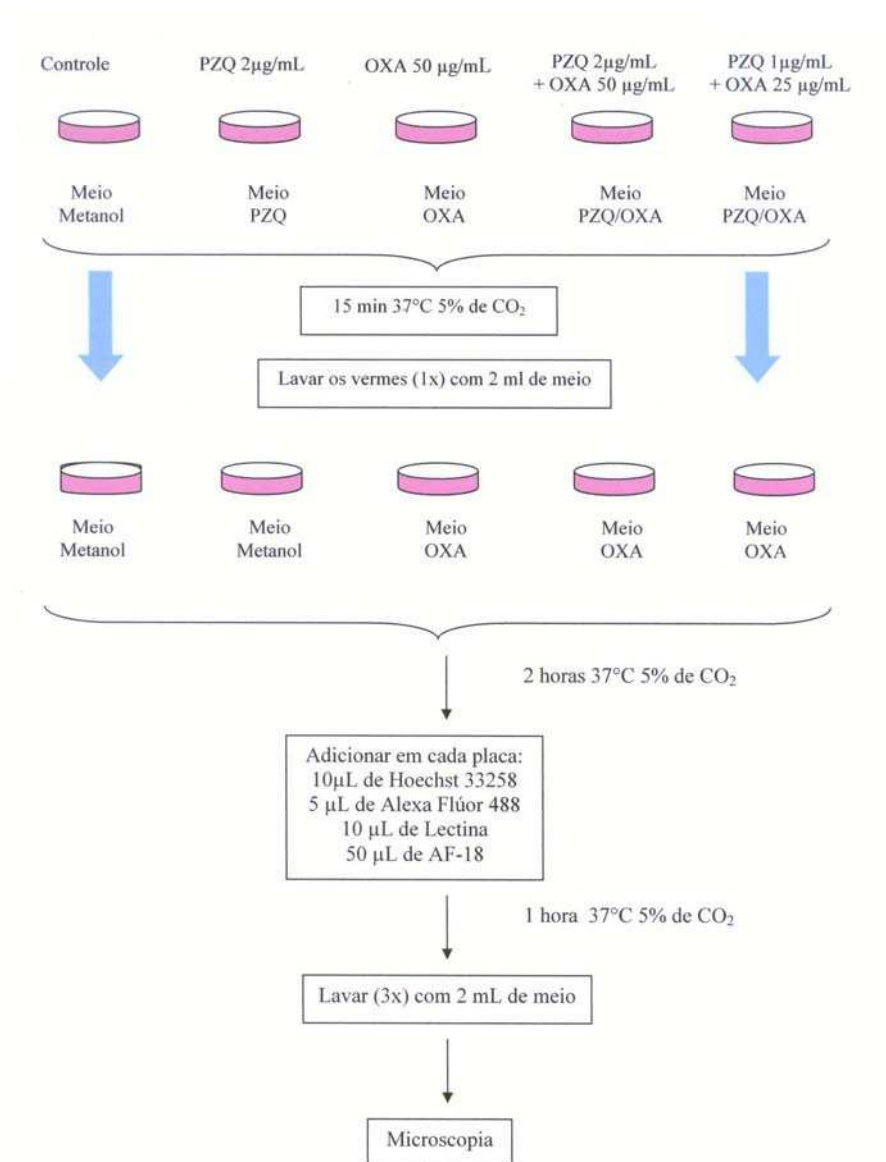


Figura 14 - Esquema do experimento 4

3.4.8. Experimento 5 - Tratamento “*in vivo*” com oxamniquina e praziquantel e marcação dos parasitos com Resorufin, “*in vitro*”

Dez camundongos, com 45 dias de infecção e infectados com 100 ± 10 cercárias, foram divididos igualmente, em cinco grupos, recebendo cada grupo um esquema terapêutico diferente. Assim, os animais foram tratados com 400mg/Kg de PZQ, 200mg/Kg de OXA, 200mg/Kg de PZQ associado a 100mg/Kg de OXA e 400mg/Kg de PZQ associado a 200mg/Kg de OXA. O quinto grupo (controle) não recebeu tratamento. Duas horas após o tratamento, os animais foram perfundidos, para a obtenção dos vermes.

Imediatamente após a perfusão e lavagem dos vermes, estes foram transferidos para 5 placas de cultura contendo 2mL de meio RPMI – 1640 suplementado com 5% (v/v) SFB inativado e 10μL (100μg) de ampicilina (solução estoque 10mg/ml). Em cada placa, foram colocados 4 pares de vermes. Para avaliação da atividade do sistema excretor, foram adicionados à cada placa 10μL de Resorufin (solução estoque 10mg/mL). As placas foram incubadas por 30 minutos a 37°C em 5% CO₂. Ao término deste período, os vermes foram lavados 5 vezes com 2mL de meio de cultura RPMI-1640 com 0,3% (p/v) BSA. Posteriormente, os parasitos foram preparados para leitura no microscópio de fluorescência (Figura 15).

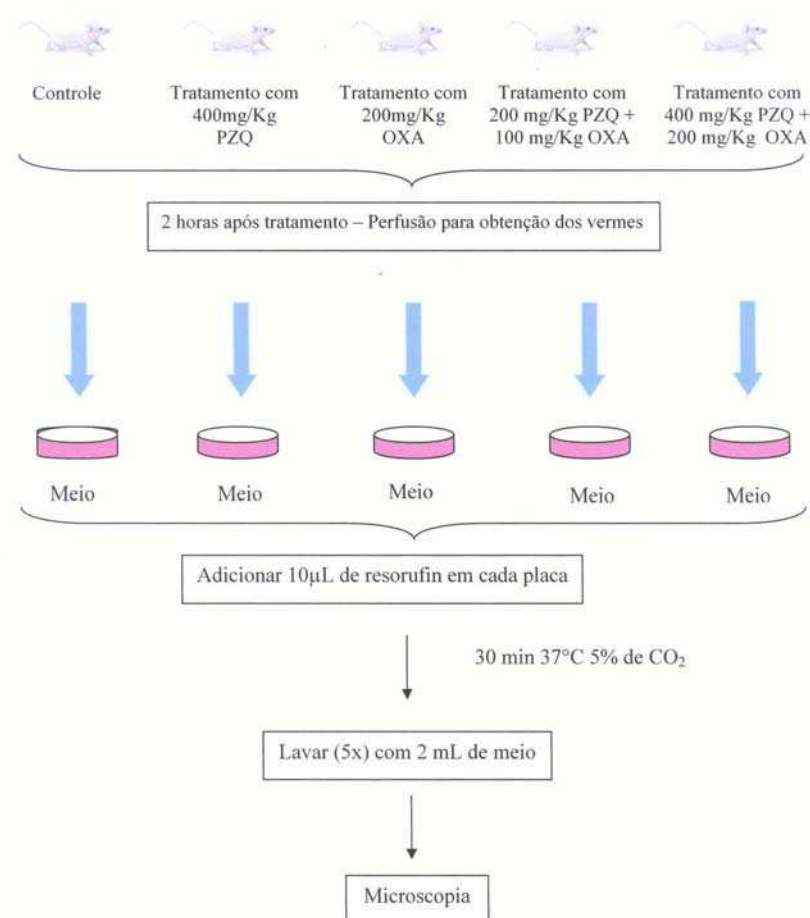


Figura 15 - Esquema do experimento 5

3.4.9. Experimento 6 - Tratamento “*in vivo*” com oxamniquina e praziquantel e marcação dos parasitos com Alexa-Fluor 488, Hoechst 33258, lectin de *Glicina max* soja (SBA) e AF-18 “*in vitro*”

Para realização deste experimento, o mesmo procedimento aplicado no experimento 5 (item 3.4.8) foi utilizado. Porém, no lugar de adicionar 10µL de Resorufin (10mg/mL), foram colocados 10µL de Hoechst 33258 (10mg/mL), 5µl de Alexa Flúor 488 faloidina (solução estoque 1mg/mL), 10µl de lectina de *Glicina max* (soja) (SBA) (solução estoque 1mg/mL) e 50 µl de AF-18 (solução estoque 1 mg/mL); incubando-se as placas por 1 hora a 37°C em 5%CO₂. Ao final do experimento, os vermes foram lavados 3 vezes com 2ml de meio de cultura RPMI-1640, suplementado com 0,3% (p/v) BSA e preparados para leitura no microscópio (Figura 16).

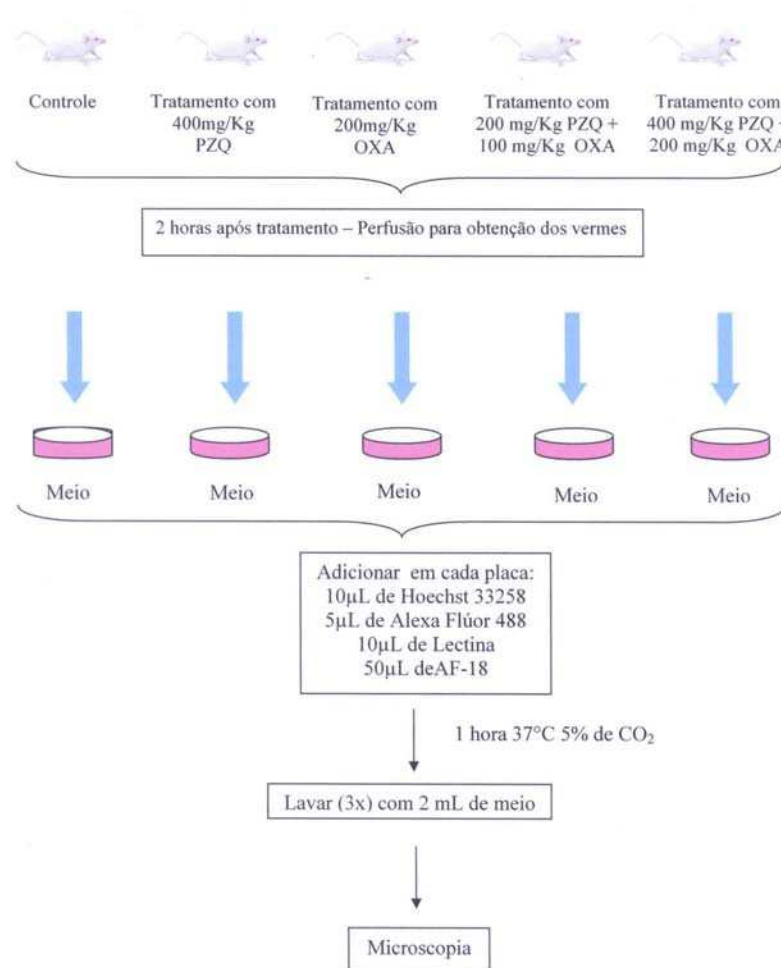


Figura 16 - Esquema do experimento 6

3.5. Microscopia de Fluorescência (preparo das lâminas para leitura)

Ao final de cada experimento, os parasitos foram transferidos para lâminas delimitadas por pequenas quantidades de vaselina, a fim de se evitar o extravasamento dos vermes para fora da lâmina e o achatamento dos mesmos, após a colocação da lamínula. Os parasitos foram colocados nas lâminas com pequena quantidade de meio de cultura suplementado com 1% de pentobarbital sódico a 3% (Hypnol – Fontoveter), para inibir a movimentação dos parasitos. Em seguida, as lâminas foram observadas em microscópio óptico de fluorescência (K - Zeiss) utilizando filtro Rodamina para Resorufin e lectina de *Glicina max* TRITC (excitação/emissão máxima da Resorufin 571/585 nm; excitação/emissão máxima da TRITC 543/571 nm), FITC para Alexa-Fluor 488 e AF-18 (excitação/emissão máxima da Alexa-Fluor 499/520 nm; excitação/emissão máxima da AF-18 497/519nm) e DAP para Hoechst 33258 (excitação/emissão máxima da Hoechst 352/455 nm).

3.6. Imagens fotográficas

As imagens deste estudo foram obtidas com máquina fotográfica digital Cannon Rebel modelo EOS 300D.

3.7. Análises estatísticas

Primeiramente foi verificado se os dados se ajustavam a curva normal de Gauss. Após verificação da não normalidade dos dados, testes não paramétricos foram aplicados.

Para avaliar se houve diferença significativa entre os tratamentos e o controle, o número total de vermes vivos recuperados nos grupos experimentais e no controle foram comparados. Para tanto, foi aplicado o teste de Kruskal Wallis, seguido de comparações múltiplas de Dunn's. Este último foi utilizado com o objetivo de verificar quais os tratamentos foram eficazes na redução da carga parasitária dos animais. Posteriormente, foi realizada a comparação entre apenas, os tratamentos que se mostraram efetivos (apontados pela primeira análise), utilizando-se novamente o teste de Kruskal Wallis seguido de comparações múltiplas de Dunn's. Assim, foi possível identificar se houve diferença entre os tratamentos e qual (quais) o(s) tratamento(s) foram mais efetivos na diminuição da carga parasitária. Para comparar o número total de vermes vivos recuperados entre dois tratamentos efetivos, quando em um deles ocorreu a cura de todos os animais (nº total de vermes vivos recuperados igual a zero), o teste de Wilcoxon foi utilizado. A comparação entre a proporção

de vermes machos e fêmeas obtidos em função do tratamento com OXA ou PZQ, foi avaliada através do teste do qui quadrado (χ^2).

Os testes utilizados (Kruskal-Wallis, comparações múltiplas de Dunn's e Wilcoxon) foram escolhidos por se adequarem à natureza dos dados e ao objetivo dos experimentos (comparar os tratamentos).

A reprodutibilidade entre os experimentos foi verificada comparando-se os grupos igualmente tratados pertencentes a experimentos diferentes. Assim, utilizou-se a ANOVA quando os dados ajustavam-se à distribuição normal e o teste não paramétrico de Mann-Whitney quando não seguiam a distribuição normal.

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

4 Resultados

4.1. Efeito tóxico da associação OXA/PZQ

A avaliação da toxicidade foi realizada a partir do número de animais mortos e sobreviventes nos diferentes grupos, sendo os seguintes resultados encontrados:

Tabela 1 - Número de animais vivos e mortos (observados durante 24 hs), após administração das respectivas DL₅₀

Grupo	Número de animais sobreviventes	Número de animais mortos	Número total de animais
DL ₅₀ PZQ (2650mg/Kg)	20	0	20
DL ₅₀ OXA(1300mg/Kg)	09	11	20
DL ₅₀ PZQ + DL ₅₀ OXA	01	19	20
½ DL ₅₀ PZQ	20	0	20
½ DL ₅₀ OXA	16	04	20
½ DL ₅₀ PZQ + ½ DL ₅₀ OXA	16	04	20

4.2. Eficácia da associação OXA/PZQ

Os camundongos com 45 dias de infecção foram submetidos ao tratamento com OXA (50, 100 e 200 mg/Kg), PZQ (200 e 400 mg/Kg) ou a associação OXA/PZQ (50 mg/Kg de OXA com 200mg/Kg de PZQ e 100 mg/Kg de OXA com 200mg/kg PZQ) e após 30 dias de tratamento realizou-se a perfusão com conseqüente recuperação dos vermes. A eficácia terapêutica foi avaliada através do número de vermes vivos recuperados no mesentério e fígado dos animais. Os experimentos foram analisados separadamente e os resultados obtidos estão demonstrados a seguir.

Experimento 1

Tabela 2 - Número de vermes vivos recuperados após perfusão das veias do mesentério e fígado de camundongos infectados com 50 cercárias, e tratados com OXA, PZQ e a associação OXA/PZQ, trinta dias após tratamento.

Tratamento	Número de animais ao final do experimento	Distribuição dos vermes						Número total de vermes recuperados		
		Mesentério			Fígado					
		♂	♀	♂♀	♂	♀	♂♀	♂	♀	♂ + ♀
Controle	12	30	28	30(60)	02	0	01(02)	63	59	112
200mg/Kg PZQ	12	40	09	12(24)	15	01	0	67	22	89
400mg/Kg PZQ *	10	19	02	04(08)	02	0	0	23	06	29
50mg/Kg OXA	12	03	10	31(62)	0	01	01(02)	35	43	78
100mg/Kg OXA*	12	02	13	21(42)	03	03	01(02)	27	38	65
200mg/Kg OXA*	12	01	02	0	0	0	0	01	02	03
50mg/Kg OXA + 200mg/Kg PZQ *	12	01	0	0	01	0	0	02	0	02
100mg/Kg OXA + 200mg/Kg PZQ *	12	0	0	0	0	0	0	0	0	0

♂ - verme macho ♀ - verme fêmea ♂♀ verme acasalado * $p < 0,05$

Para avaliar a eficácia da combinação OXA/PZQ, as comparações foram feitas, utilizando-se o teste de Kruskal-Wallis seguido de comparações múltiplas de Dunn's e o teste de Wilcoxon. As análises estatísticas demonstraram que 200mg/Kg de PZQ, assim como 50mg/Kg de OXA, empregados isoladamente, não tiveram efeito na redução da carga parasitária, não havendo diferenças significativas entre esses grupos e o controle. As associações utilizadas (50mg/Kg de OXA + 200mg/Kg de PZQ e 100 mg/Kg de OXA + 200 mg/Kg de PZQ), bem como os tratamentos com 100 e 200 mg/Kg de OXA e 400 mg/Kg de PZQ foram satisfatórios na redução da carga parasitária. O tratamento com 400mg/Kg de PZQ mostrou-se semelhante ao tratamento com 100 mg/Kg de OXA, quando ambos foram empregados isoladamente, não havendo diferenças significativas entre eles. Os dois esquemas, com as drogas em associação, mostraram-se, significativamente, superiores aos tratamentos com 100 mg/Kg de OXA e 400 mg/Kg de PZQ, utilizados separadamente. Porém, não houve diferença, estatisticamente significativa, entre o tratamento com 200mg/Kg de OXA usada isoladamente, e os tratamentos onde as duas associações foram empregadas. Contudo, 100mg/Kg de OXA associado a 200mg/Kg de PZQ foi o único esquema terapêutico a eliminar todos os parasitos.

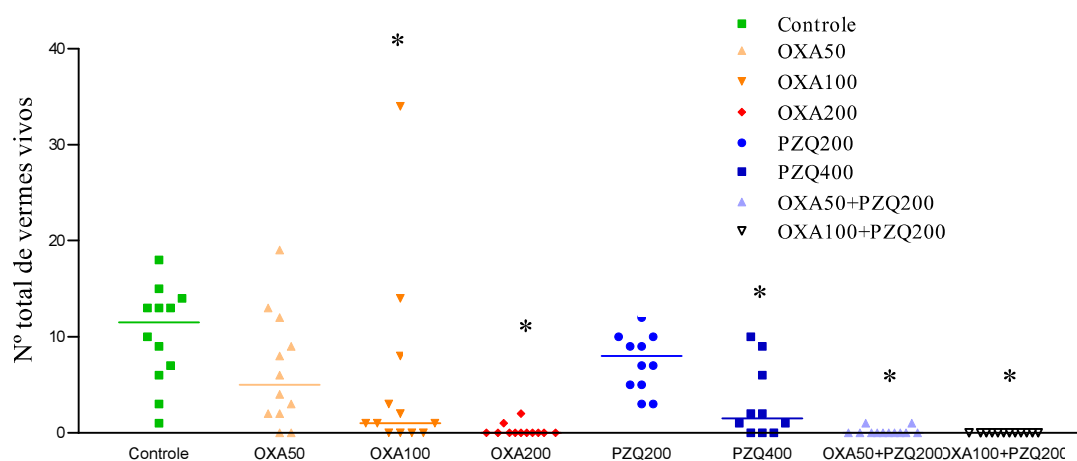


Gráfico 1 - Gráfico de dispersão do número total de vermes vivos recuperados por animal dos grupos controle e experimentais e suas respectivas medianas referentes ao experimento 1. * $p < 0,05$ diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle.

Experimento 2

Tabela 3 - Número de vermes vivos recuperados após perfusão das veias do mesentério e fígado de camundongos infectados com 50 cercárias, e tratados com OXA, PZQ e a associação OXA/PZQ. Trinta dias após tratamento.

Tratamento	Número de animais ao final do experimento	Distribuição dos vermes						Número total de vermes recuperados		
		Mesentério			Fígado					
		♂	♀	♂♀	♂	♀	♂♀	♂	♀	♂ + ♀
Controle	12	65	51	39(78)	16	06	01(02)	121	97	218
200mg/Kg PZQ *	11	20	05	04(08)	03	01	0	27	10	37
100mg/Kg OXA*	12	02	05	03(06)	0	02	0	05	10	15
100mg/KgOXA+ 200mg/Kg PZQ *	11	0	0	0	0	0	0	0	0	0

♂ - verme macho ♀ - verme fêmea ♂♀ - verme acasalado * $p < 0,05$

Como o objetivo foi avaliar a eficácia da combinação de OXA com PZQ, as comparações entre os tratamentos foram realizadas sempre com o grupo controle. A comparação entre o grupo controle e os grupos experimentais, realizada através do teste de Kruskal-Wallis e comparações múltiplas de Dunn's, evidenciaram diferenças significativas entre o grupo controle e todos os tratamentos, demonstrando que todos os tratamentos foram efetivos na redução da carga parasitária. O tratamento com a associação (100mg/Kg de OXA + 200mg/Kg de PZQ) mostrou-se mais eficaz do que o tratamento com 200 mg/Kg de PZQ,

quando utilizado isoladamente. Entretanto, não houve diferença significativa entre o tratamento com a associação e o tratamento com 100 mg/Kg de OXA. Da mesma forma, não foram observadas diferenças entre os tratamentos com 100mg/Kg de OXA e 200 mg/Kg de PZQ, quando esses foram empregados isoladamente. O tratamento com a associação foi o único a eliminar todos os vermes dos animais.

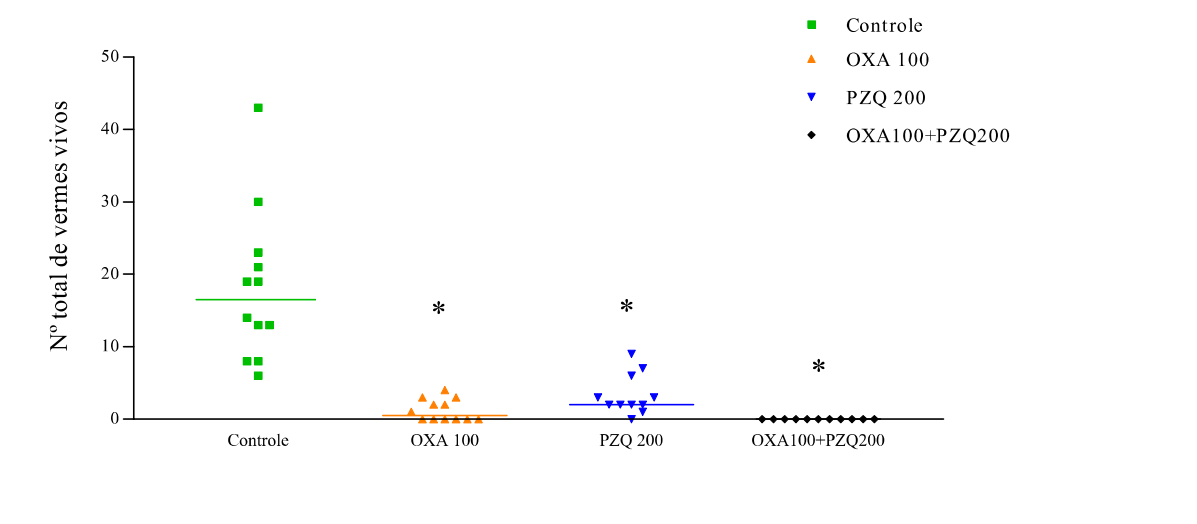


Gráfico 2 - Gráfico de dispersão do número total de vermes vivos recuperados por animal dos grupos controle e experimentais e suas respectivas medianas referentes ao experimento 2. * p < 0,05 diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle.

Experimento 3

Tabela 4 - Número de vermes vivos recuperados após perfusão das veias do mesentério e fígado de camundongos infectados com 50 cercárias, e tratados com OXA, PZQ e a associação OXA/PZQ. Trinta dias após tratamento.

Tratamento	Número de animais ao final do experimento	Distribuição dos vermes						Número total de vermes recuperados		
		Mesentério			Fígado					
		♂	♀	♂♀	♂	♀	♂♀	♂	♀	♂ + ♀
Controle	12	45	47	20(40)	14	16	03(06)	82	86	168
200mg/Kg PZQ *	14	23	08	06(12)	09	04	01(02)	34	20	54
100mg/Kg OXA *	14	02	27	0	0	0	0	02	27	29
100mg/KgOXA+ 200mg/Kg PZQ *	11	0	0	0	0	0	0	0	0	0

♂ - verme macho ♀ - verme fêmea ♂♀ - verme acasalado * p < 0,05

Todos os grupos tratados tiveram uma diminuição da carga de vermes, em relação ao controle, estatisticamente significativa. Porém a associação mostrou-se mais eficaz na redução

do número de vermes, quando comparada as duas drogas usadas isoladamente. Os grupos tratados com 200mg/Kg de praziquantel e 100mg/Kg de oxamniquina tiveram uma resposta semelhante na redução da carga parasitária, não havendo diferença significativa entre eles. Mais uma vez, não houve recuperação de vermes nos animais do grupo onde a associação foi administrada.

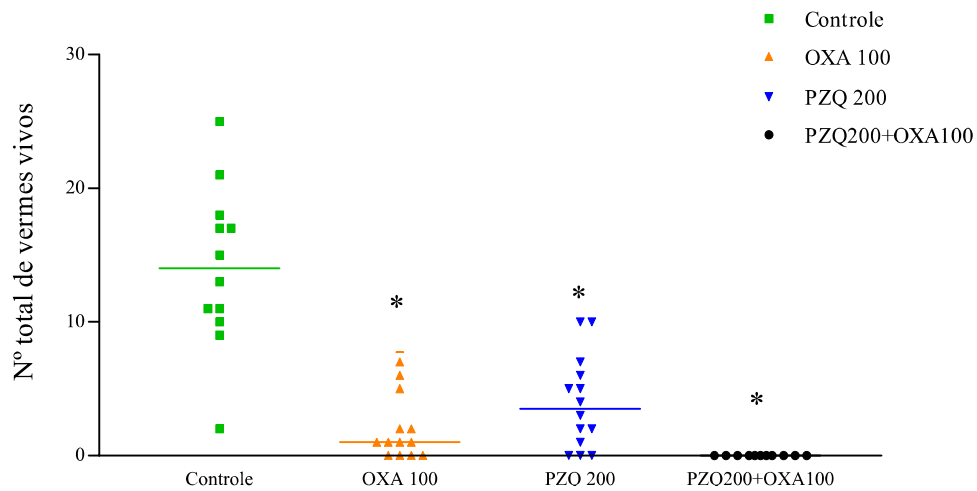


Gráfico 3 - Gráfico de dispersão do número total de vermes vivos recuperados por animal dos grupos controle e experimentais e suas respectivas medianas referentes ao experimento 3. * $p < 0,05$ diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle.

4.2.1. Proporção entre machos e fêmeas relacionada ao uso de OXA ou PZQ

As análises realizadas pelo teste do χ^2 indicaram diferenças significativas na redução de machos ou fêmeas relacionada ao uso de OXA ou de PZQ. Os resultados mostram que em todos os experimentos a OXA foi mais eficaz na redução dos parasitos machos, enquanto o PZQ teve maior ação na eliminação dos parasitos fêmeas.

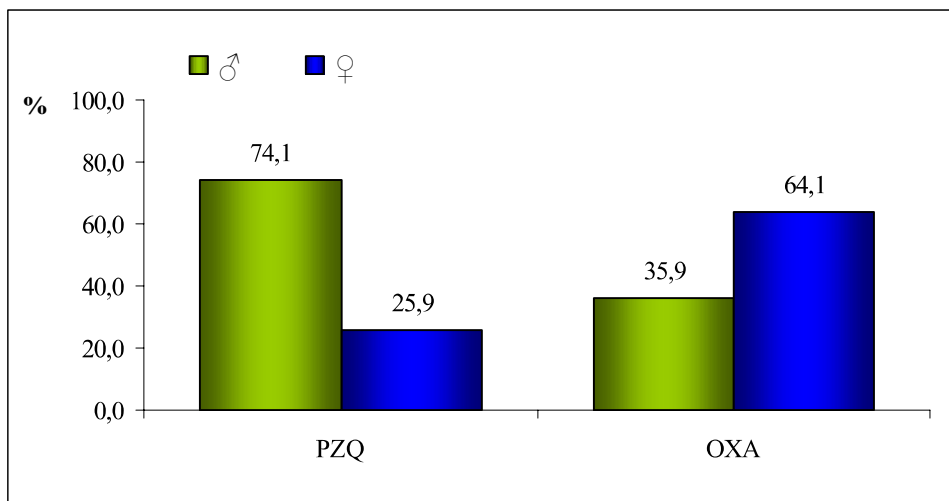
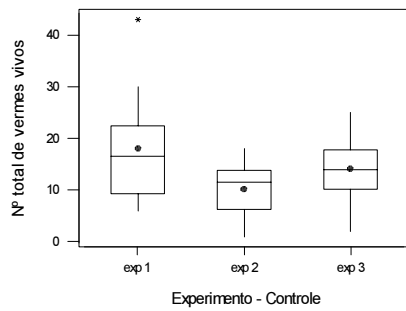


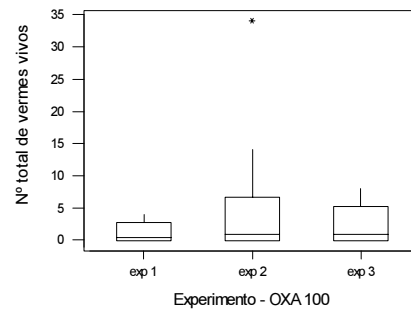
Gráfico 4 - Porcentagens de machos e fêmeas vivos após o tratamento com OXA ou com PZQ.

4.2.2. Reprodutibilidade dos experimentos

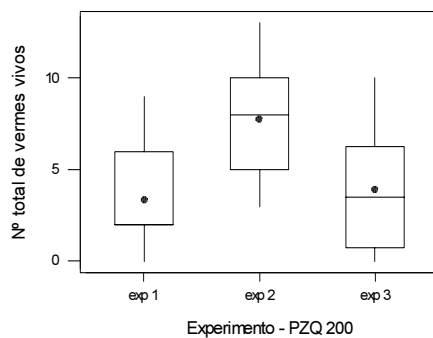
Para avaliar a reprodutibilidade dos testes, os experimentos foram comparados entre - si comparando-se os grupos controles e os grupos tratados com o mesmo esquema terapêutico. A análise de variância revelou que nenhuma diferença foi encontrada entre os grupos controles ($p = 0.096$), demonstrando a homogeneidade tanto da infecção dos animais, quanto da recuperação dos vermes. Entretanto, a análise de variância revelou diferença entre os grupos tratados com 200mg/Kg de praziquantel, onde o experimento 1 apontou resultados estatisticamente diferentes, quando comparados ao experimento 2 e 3. Porém, não foi observada nenhuma diferença significativa entre estes dois últimos. Entre os demais grupos, não foi observada nenhuma diferença, demonstrando uma boa reprodutibilidade dos experimentos (figura 17).



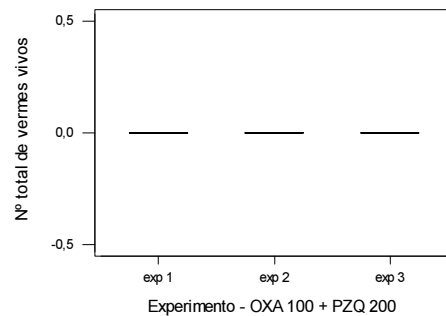
(A)



(B)



(C)



(D)

Figura 17 - Gráficos representativos da reprodutibilidade dos experimentos. Comparação entre grupos controles (A); grupos tratados com 100mg/Kg de OXA (B); 200mg/Kg de PZQ (C); e com a associação de 100mg/Kg de OXA com 200mg/Kg de PZQ (D).

4.3. Resultados dos experimentos “*in vitro*”

Como nos experimentos “*in vivo*”, os resultados dos experimentos “*in vitro*” serão descritos separadamente, de acordo com cada experimento realizado.

4.3.1. Efeito do PZQ sobre a excreção da Resorufin (Experimento 1)

Observou-se que os vermes expostos inicialmente à Resorufin e posteriormente incubados com praziquantel, tiveram completa inibição da atividade excretora, caracterizada pelo acúmulo de sonda em outros tecidos que não o sistema excretor. Os parasitos expostos primeiramente ao PZQ e posteriormente à Resorufin, apresentaram nítida atividade excretora.

Assim, os resultados demonstraram que o PZQ foi capaz de interferir na atividade excretora do verme adulto macho de *S. mansoni*, atuando, provavelmente, na Pgp e que o parasito mostrou-se capaz de recuperar esta atividade quando o PZQ foi retirado do meio.

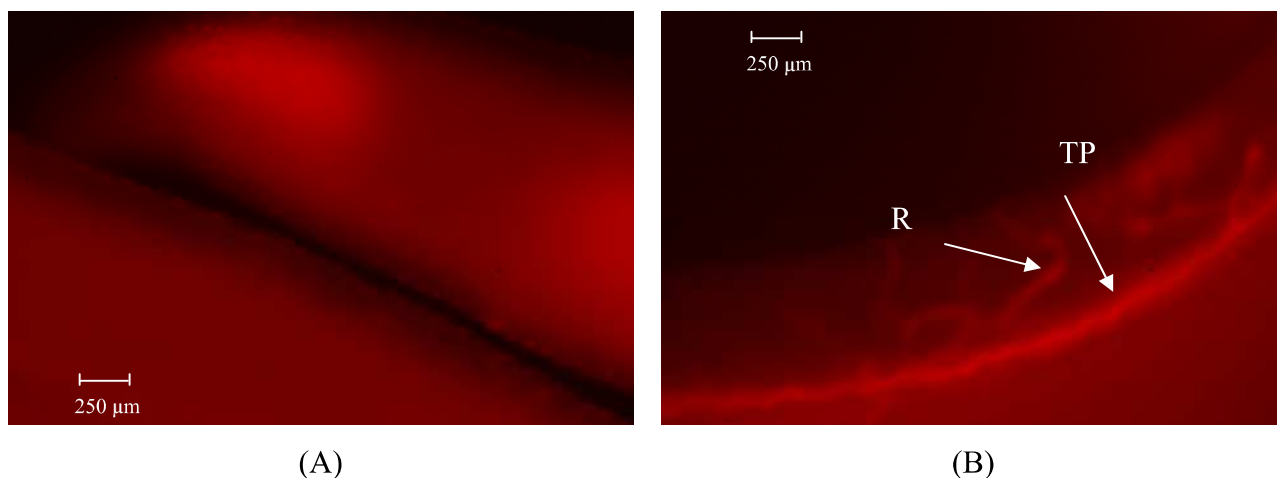


Figura 18 – Marcação dos parasitos com Resorufin. (A) verme adulto macho de *S. mansoni* exposto inicialmente a Resorufin e posteriormente ao PZQ (0,5µg/mL). A sonda está retida em outros tecidos que não o túbulo excretor. (B) verme adulto macho de *S. mansoni* pertencente ao grupo exposto à 0,5µg/mL PZQ. É possível visualizar a sonda dentro do túbulo excretor (TP) e em algumas de suas ramificações (R).

4.3.2. Efeito de diferentes concentrações de PZQ sobre o sistema excretor do verme adulto de *S. mansoni* (Experimento 2)

Os vermes foram separados em grupos, que foram expostos à diferentes concentrações de PZQ (0,5, 1 e 2 µg/mL) e em seguida, incubados com Resorufin.

Em todos os vermes adultos machos foi observada a recuperação da atividade excretora, que pôde ser visualizada pela marcação final do sistema excretor, inclusive da vesícula excretória (nefridioporo). Esta recuperação pareceu ser influenciada pela concentração da droga, uma vez que para a menor concentração (0,5µg/mL), a recuperação se mostrou mais rápida, sendo observada uma marcação mais acentuada do sistema excretor. As fêmeas acasaladas pertencentes ao grupo controle, portanto, sem exposição ao PZQ, não apresentaram atividade excretora, sendo isto observado pela ausência de marcação de seus túbulos excretores com Resorufin. Porém, foi observado que algumas fêmeas acasaladas, expostas à droga, mostraram-se ativas enquanto outras não. As fêmeas isoladas, independente da exposição ao PZQ, apresentaram nítida atividade excretora, sendo esta evidenciada pela intensa marcação do seu sistema excretor.

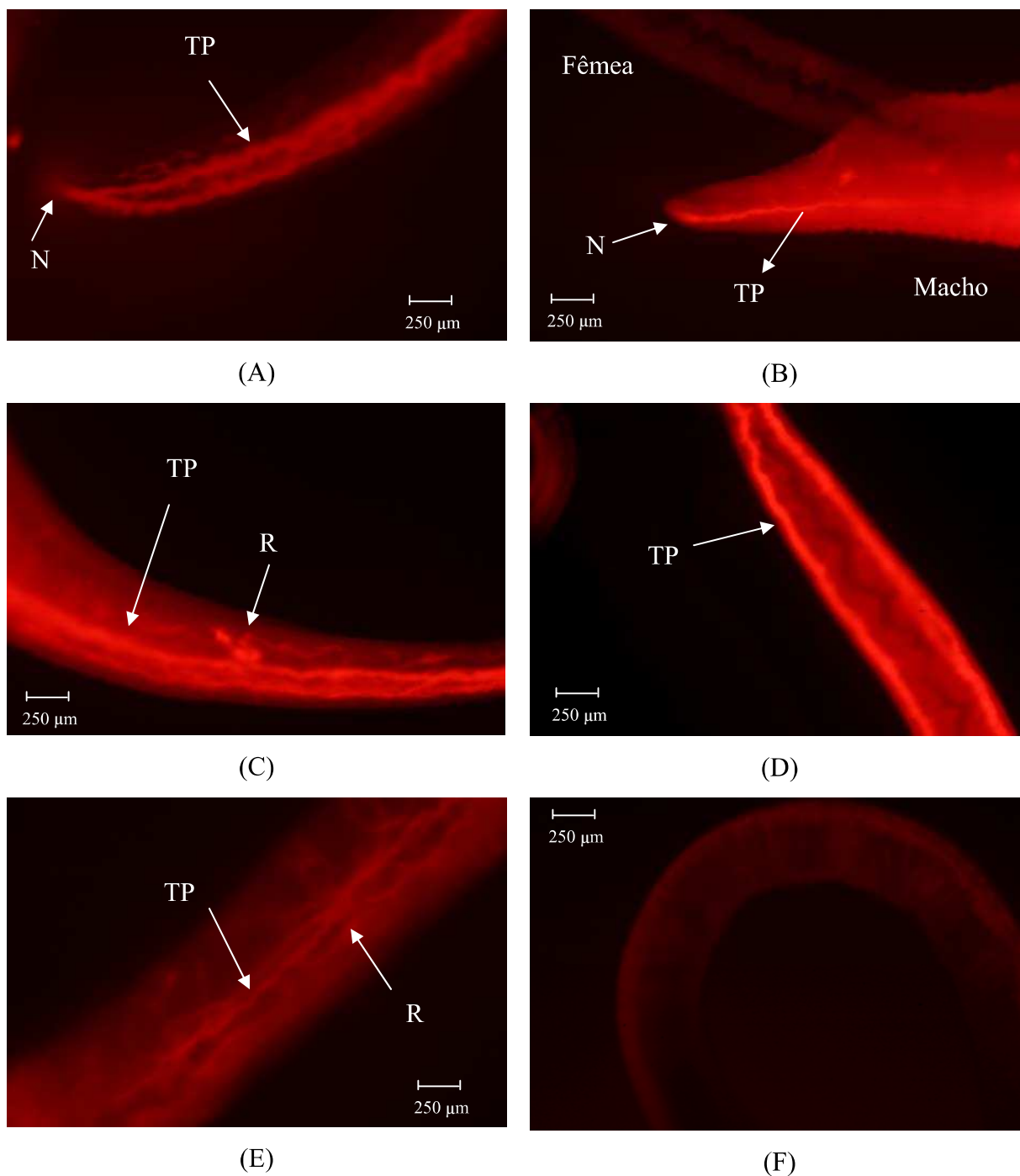


Figura 19 - Marcação dos vermes com Resorufin, após exposição ao PZQ. (A) verme macho do grupo controle. Intensa atividade excretora visualizada pela marcação da porção final do sistema excretor. É possível observar o túbulo principal (TP) e o nefridioporo (N). (B) casal de vermes acasalados do grupo controle. O verme macho (M) apresenta sistema excretor ativo, ao passo que não há sinais de atividade excretora no parasito fêmea (F). (C) macho exposto ao PZQ na concentração de 0,5µg/mL. Marcação do sistema excretor: túbulo principal (TP) e algumas ramificações (R). (D) túbulo principal de uma fêmea isolada exposta a 0,5µg/mL de PZQ. (E) macho tratado com 1µg/mL de PZQ. (F) fêmea acasalada sem atividade excretora tratada com 2µg/mL de PZQ.

4.3.3. Efeito das drogas OXA e PZQ, usadas isoladamente ou em associação, sobre a atividade excretora do verme adulto de *S. mansoni* (Experimento 3)

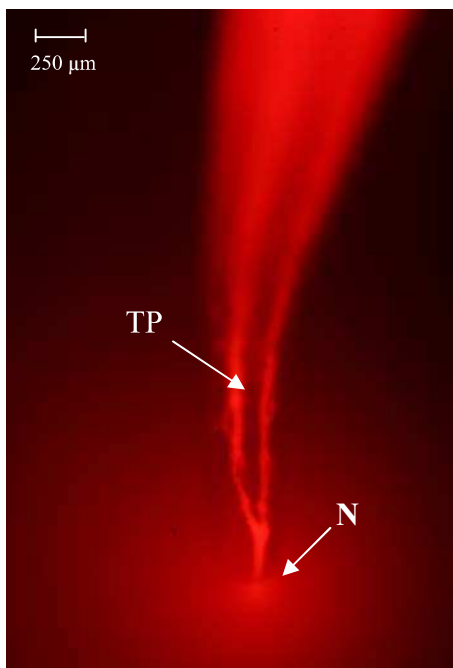
Vermes adultos de *S. mansoni* foram incubados na presença de OXA (50 µg/mL) ou PZQ (2µg/mL) ou de ambas as drogas (25µg/mL + 1µg/mL e 50µg/mL + 2µg/mL, respectivamente OXA + PZQ) e posteriormente incubados com Resorufin. A ação das drogas sobre a excreção da sonda estão descritas abaixo:

Controle: Foi registrada a atividade excretora em todos os parasitos machos pertencentes ao grupo controle. As fêmeas por sua vez, tiveram seu sistema excretor visualizado, portanto em atividade, somente quando isoladas, estando as fêmeas pareadas sem atividade.

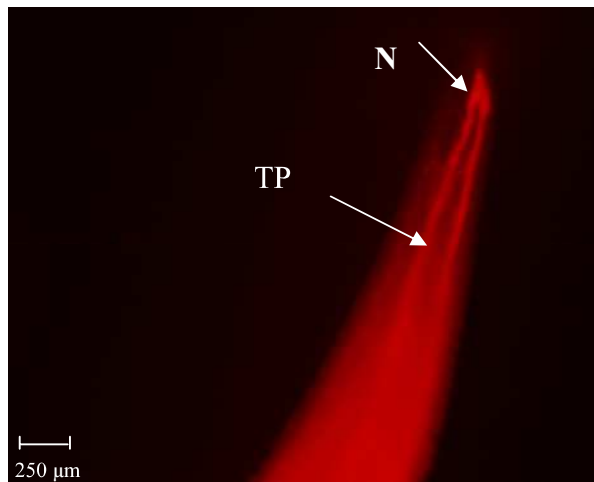
PZQ: Os vermes machos após contato com praziquantel apresentaram recuperação da atividade excretora, sendo possível visualizar seu sistema excretor. Enquanto algumas fêmeas acasaladas mostraram seu sistema excretor bem ativo em outras, esta atividade não foi observada. As fêmeas isoladas, mais uma vez, mostraram estar providas de atividade. Estes resultados confirmam os anteriores, onde os vermes foram expostos as diferentes concentrações de PZQ.

OXA: A atividade excretora tanto dos parasitos machos quanto fêmeas apresentaram-se ativos. A OXA induziu a separação dos vermes acasalados, não sendo observado nenhum casal pareado no momento da leitura ao microscópio. Dessa forma, nenhuma interferência visível sobre o sistema excretor desses parasitos foi notada.

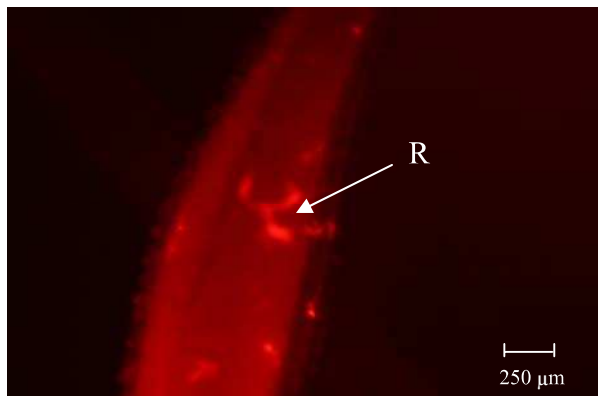
OXA + PZQ: Na presença de ambas as drogas foi possível observar a recuperação do funcionamento do sistema excretor dos vermes. No entanto, em alguns machos houve sinais de atraso nesta recuperação (Figura 20F), a qual foi sugerida devido à ausência de marcação em alguns parasitos. Esta observação foi feita apenas para os parasitos expostos a concentrações maiores de ambas as drogas (50µg/mL OXA + 2µg/mL PZQ). Em adição, os parasitos apresentaram-se levemente contraídos, o que demonstra um retardamento na recuperação da sua forma, a qual é totalmente restabelecida nos parasitos expostos somente ao praziquantel (2µg/ml), sendo isto observado para as duas associações adotadas. Da mesma maneira como observado para o PZQ empregado isoladamente, algumas fêmeas acasaladas, apresentaram o sistema excretor fortemente marcado enquanto outras não. Mais uma vez, as fêmeas isoladas, apresentaram o sistema excretor marcado, indicando atividade excretora.



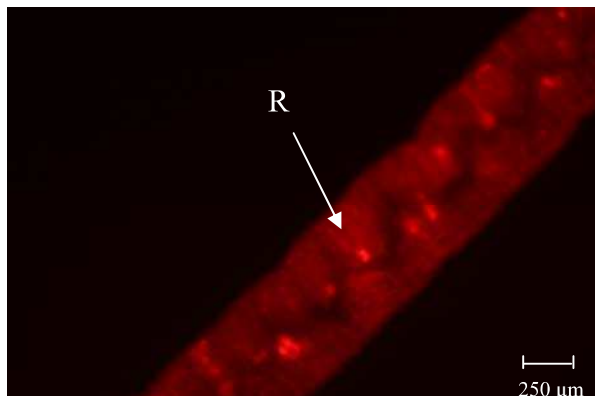
(A)



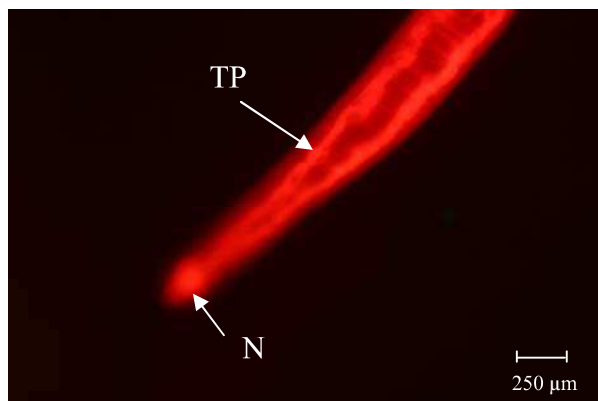
(B)



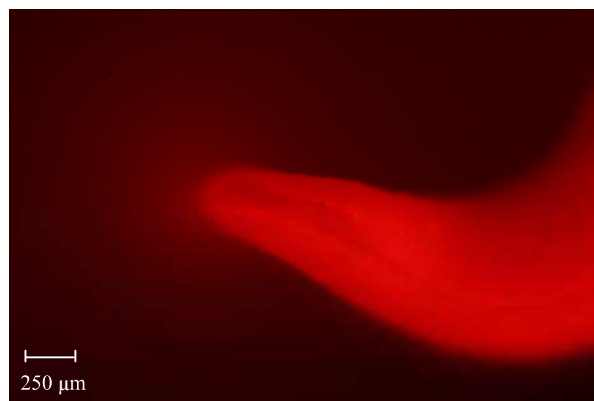
(C)



(D)



(E)



(F)

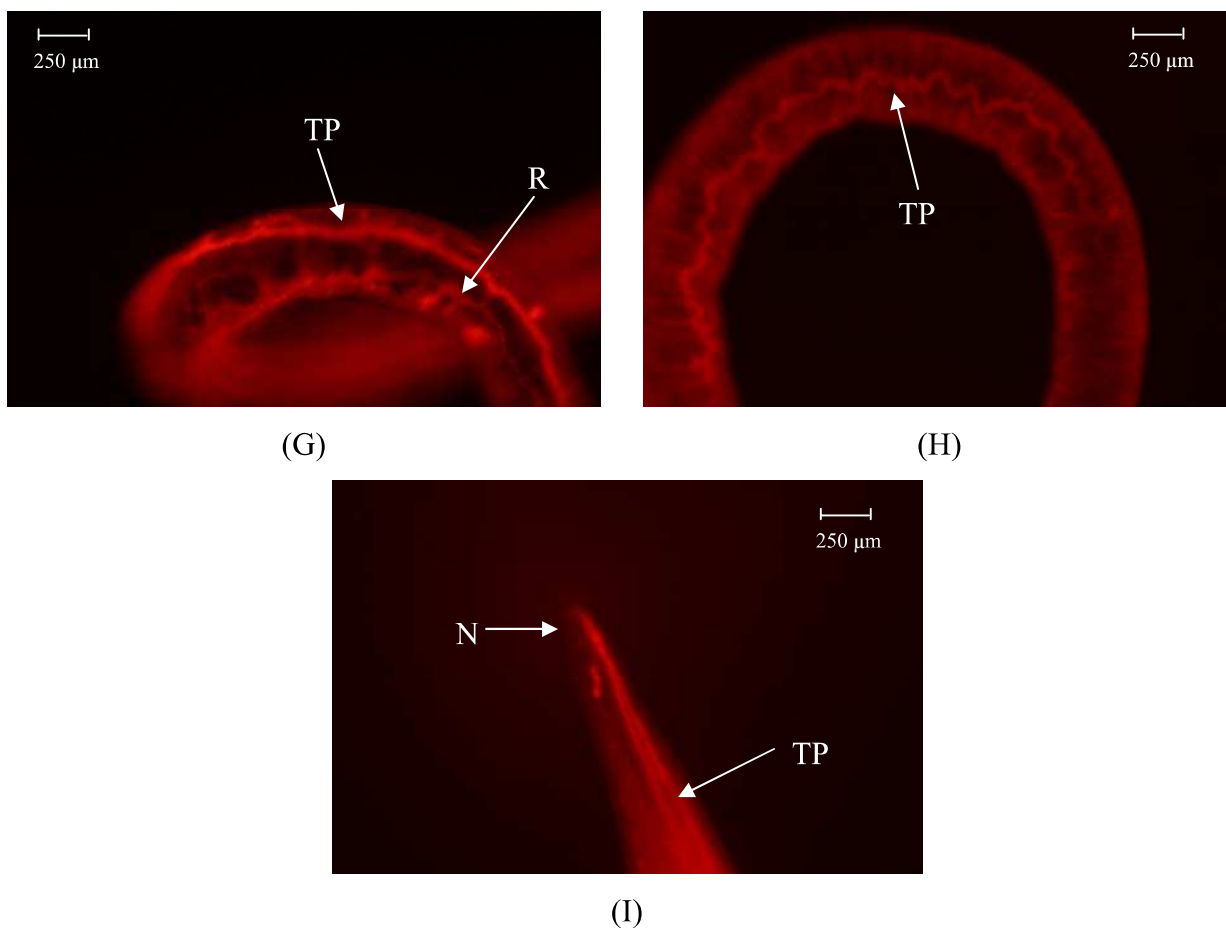


Figura 20 – Marcação dos parasitos com Resorufin. (A) macho não exposto à droga. Túbulo excretor (TP) principal cheio de Resorufin. É possível visualizar a atividade excretora através da saída de sonda pelo nefridioporo (N). (B) macho colocado em presença de PZQ. Porção final do sistema excretor e nefridioporo bem visível. (C) macho tratado com OXA. Visualização de ramificações do sistema excretor. (D) Fêmea isolada também exposta à OXA. (E) fêmea não pareada exposta a de 50µg/mL de OXA associado a 2µg/mL de PZQ. Observação do Túbulo excretor principal e do nefridioporo. (F) macho exposto à associação OXA/PZQ (50µg/mL + 2µg/mL), não há presença de sonda no sistema excretor indicando um retardo na recuperação do funcionamento do sistema excretor. (G) verme fêmea não acasalado tratado com a combinação OXA/ PZQ (50µg/mL + 2µg/mL). Intensa marcação do seu túbulo excretor principal e ramificações (R). (H) verme fêmea acasalado com atividade excretora após exposição com OXA/PZQ (25µg/mL + 1µg/mL). (I) Parasito macho, exposto a associação OXA/PZQ (25µg/mL + 1µg/mL). Marcação da porção final do sistema excretor, nesta concentração não houve sinais de retardo na recuperação da atividade excretora.

4.3.4. Efeito das drogas OXA, PZQ usadas isoladamente ou em combinação sobre o tegumento do verme adulto de *S. mansoni* (Experimento 4)

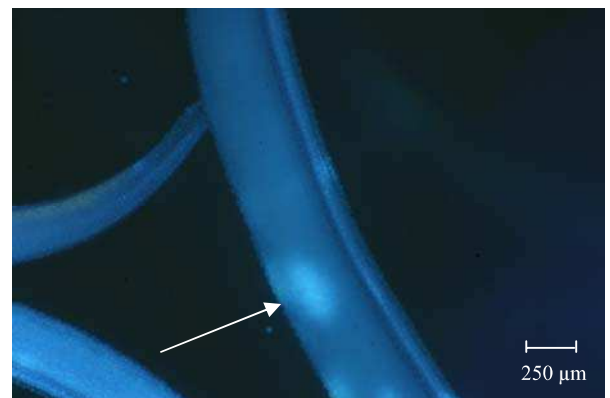
Para avaliar o dano causado no tegumento dos parasitos, os vermes expostos às drogas OXA, PZQ ou ambas, foram incubados simultaneamente com Hoechst 33258, lectina de *Glicine max*, Alexa Flúor 488 faloidina e AF-18. Neste experimento, as observações ficaram

restritas aos parasitos machos tendo em vista que os danos nos parasitos fêmeas não se mostraram claros. Os resultados estão descritos a seguir:

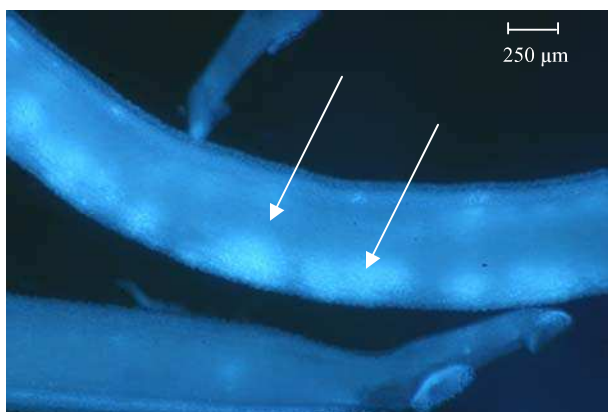
Tanto o PZQ quanto a OXA, usados isoladamente, “*in vitro*” foram capazes de causar pequenas lesões no tegumento dos parasitos. As pequenas regiões de dano puderam ser observadas somente pela marcação com a sonda Hoechst 33258, a qual parece ter sido mais sensível em detectar as lesões (Figura 21 C; Figura 21 D). As associações utilizadas (25µg/mL + 1µg/mL e 50µg/mL + 2µg/mL, respectivamente OXA + PZQ) mostraram-se, nitidamente, mais eficientes em lesar a membrana tegumentar dos parasitos (Figura 21 D; Figura 21 E). Os danos, provocados pelo uso das drogas associadas, foram mais intensos e mais difusos, podendo estes serem observados através da marcação com a sonda Hoechst 33258 e também com a sonda lectina de *Glicine max* (Figura 21 E; Figura 21 F). As sondas AF-18 e Alexa flúor 488 faloidina, não se mostraram eficazes na marcação dos danos causados pelas drogas, nas condições experimentais adotadas.



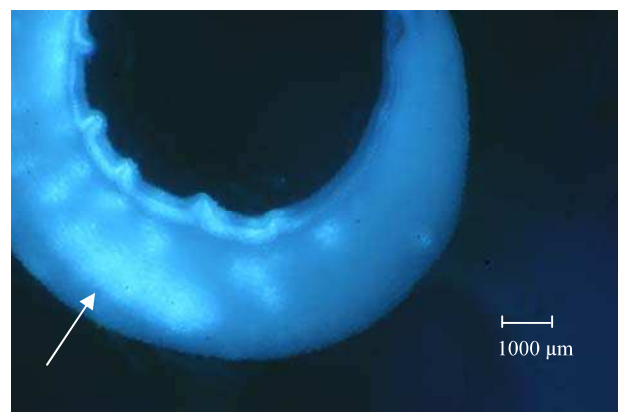
(A)



(B)



(C)



(D)

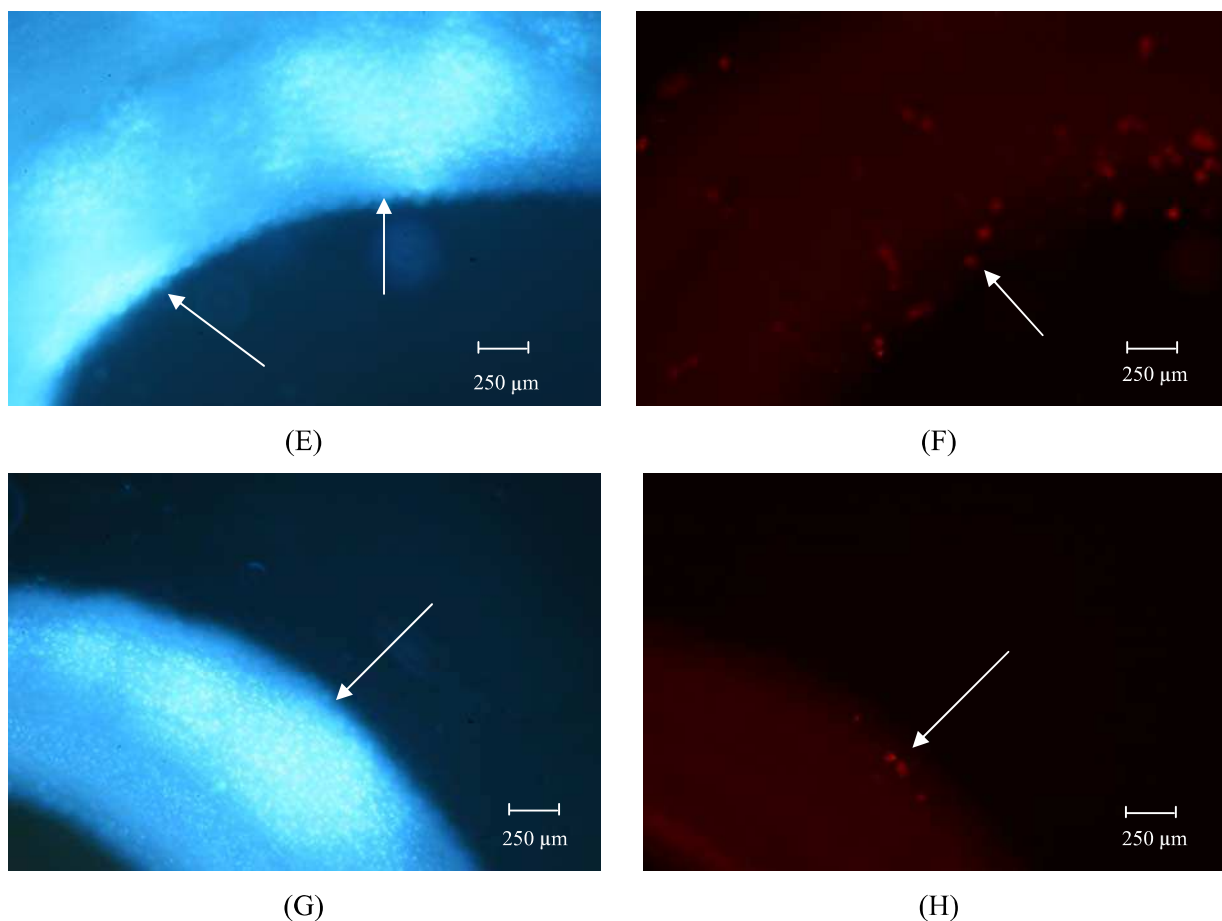


Figura 21 - Marcação dos danos através das sondas Hoechst 33258 (azul) e lectina de *Glicine max* (vermelho). Os danos estão apontados pelas setas. (A) verme macho (controle). (B) verme macho exposto isoladamente ao PZQ (2μg/mL). (C) verme macho exposto a associação 2μg/mL de PZQ + 50μg/mL de OXA. (D) verme macho exposto a associação 1μg/mL de PZQ + 25μg/mL de OXA. As lesões apresentam-se bem evidenciadas quando as drogas são usadas conjuntamente. (E) parasito macho exposto a 2μg/mL de PZQ + 50μg/mL de OXA. O dano pôde ser visualizado também com a sonda lectina de *Glicine max*. (F) parasito anterior marcado na mesma região com lectina de *Glicine max*. (G) parasito macho exposto a 1μg/mL de PZQ + 25μg/mL OXA. Apesar de muito discreta, é possível observar a marcação do parasito anterior com a sonda lectina de *Glicine max* (H).

4.3.5. Efeito do tratamento “*in vivo*”, com as drogas OXA e PZQ, isoladas ou em associação, sobre o sistema excretor do verme adulto de *S. mansoni* (Experimento 5)

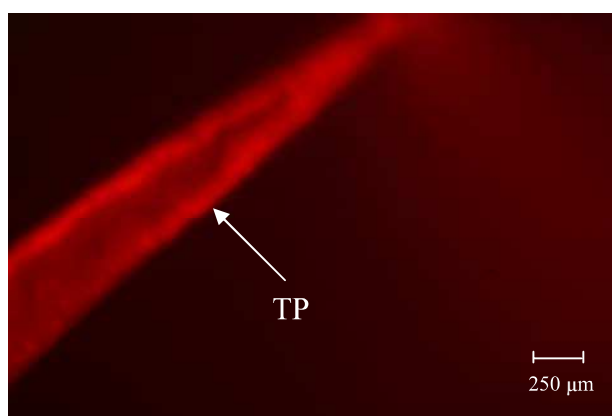
Animais, com 6 a 7 semanas de infecção, foram tratados por via oral, em dose única, com OXA, PZQ ou a associação OXA/PZQ e após duas horas do tratamento, foram perfundidos para recuperação dos vermes, para posterior marcação destes com a sonda. Os resultados obtidos estão descritos a seguir:

Controle: Do mesmo modo que nos experimentos anteriores, foi registrada a atividade excretora em todos os parasitos machos pertencentes a este grupo. As fêmeas por sua vez, tiveram seu sistema excretor marcado, somente quando isoladas, estando as fêmeas pareadas, novamente, sem atividade.

(PZQ) Os vermes, recuperados dos animais tratados com PZQ isoladamente, apresentaram-se levemente contraídos. Diferentemente dos experimentos “*in vitro*” os parasitos machos não apresentaram atividade excretora, enquanto as fêmeas tanto sozinhas quanto acasaladas apresentaram o sistema excretor bem visível.

(OXA) Os parasitos recuperados dos animais tratados com OXA, mais uma vez, mostraram uma tendência a se desacasalarem, sendo encontrado maior número de fêmeas sozinhas, estas por sua vez, apresentando o sistema excretor ativo. Os vermes machos não se mostraram com atividade, não sendo possível a visualização do seu sistema excretor.

(PZQ + OXA) Todas as fêmeas acasaladas provenientes dos animais tratados com a associação apresentaram forte atividade do seu sistema excretor. Ao contrário dos experimentos “*in vitro*” os vermes machos não apresentaram o sistema excretor ativo.



(A)

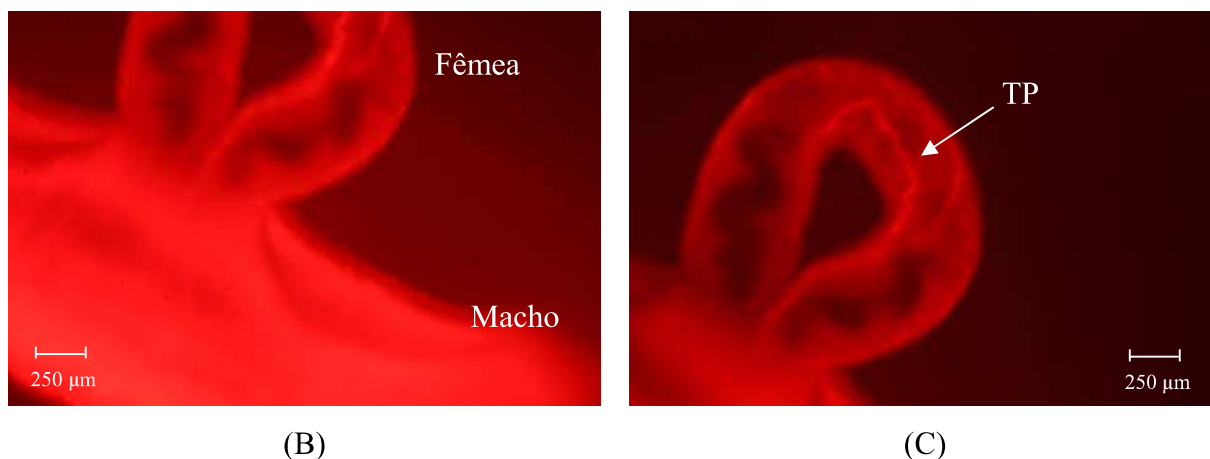


Figura 22 - Atividade excretora após tratamento "*in vivo*". (A) verme fêmea não acasalado proveniente dos animais do grupo controle. (B - C) casal de verme acasalados recuperado dos animais tratados com 200mg/Kg de OXA associado a 400 mg/Kg de PZQ. Não há atividade excretora nos parasitos machos. A fêmea acasalada encontra – se marcada, evidenciando a atividade do sistema excretor.

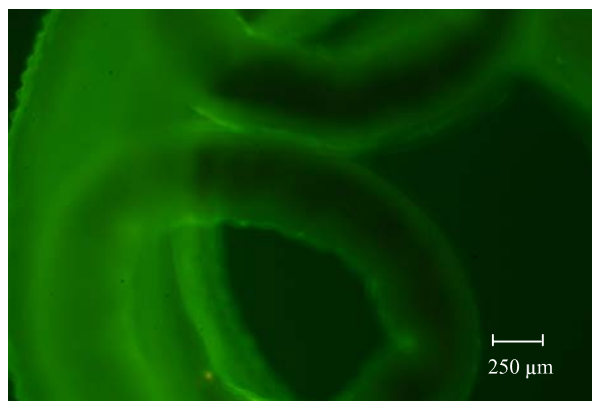
4.3.6. Efeito do tratamento "*in vivo*", com as drogas OXA e PZQ, isoladas ou em associação, sobre o tegumento do verme adulto de *S. mansoni* (Experimento 6)

Do mesmo modo que no experimento anterior, animais, com 6 a 7 semanas de infecção, foram tratados por via oral, em dose única, com OXA, PZQ ou a associação OXA/PZQ e após duas horas do tratamento, foram perfundidos para recuperação dos vermes, para posterior marcação destes com as sondas. Os resultados obtidos estão descritos a seguir:

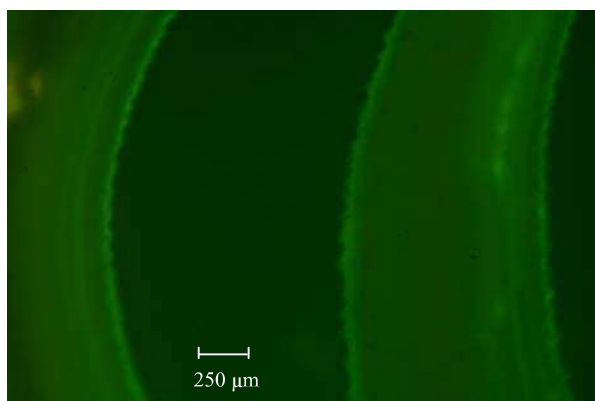
Todos os vermes provenientes dos animais tratados com OXA, PZQ ou a associação OXA/PZQ tiveram lesões em seu tegumento, estes sendo visualizados pela marcação com as sondas: Hoechst 33258; Hoechst 33258, lectina de *Glicine max* e Alexa Flúor 488 faloidina; e com Hoechst 33258, lectina de *Glicine max* e Alexa Flúor 488 faloidina, respectivamente. Os vermes pertencentes aos animais tratados com 400 mg/Kg de PZQ isoladamente, bem como com as associações, apresentaram-se ligeiramente contraídos. Os parasitos recuperados dos animais tratados com a combinação OXA/PZQ, nas duas concentrações utilizadas, apresentaram danos mais pronunciados e mais compactos, quando comparados aos observados nos vermes obtidos dos animais tratados somente com PZQ. Assim como no experimento "*in vitro*" só os machos foram observados.



(A)



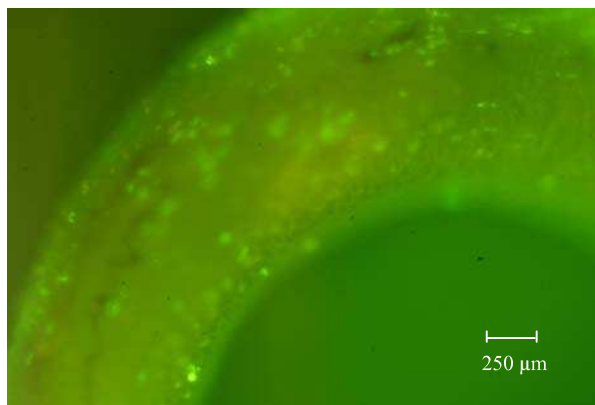
(B)



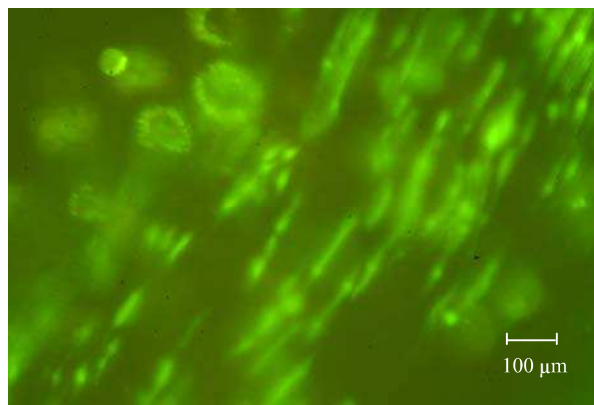
(C)



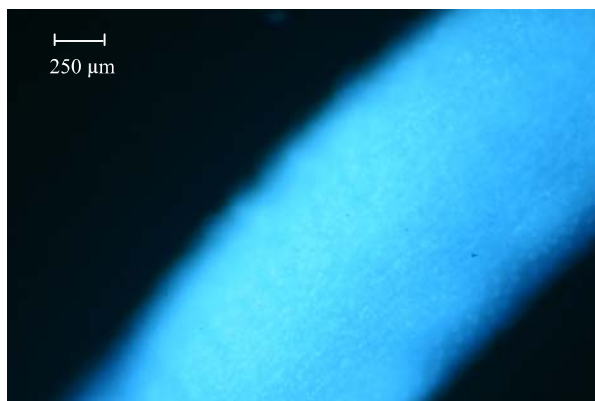
(D)



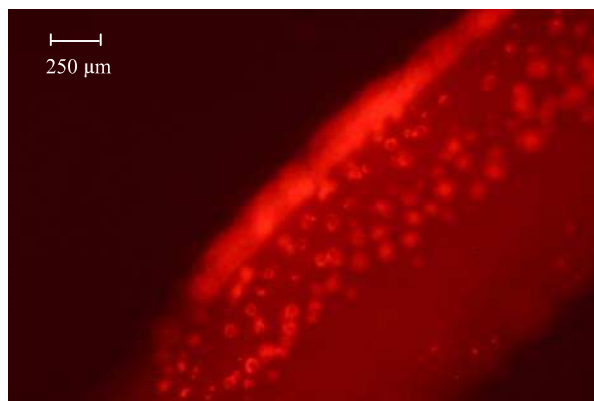
(E)



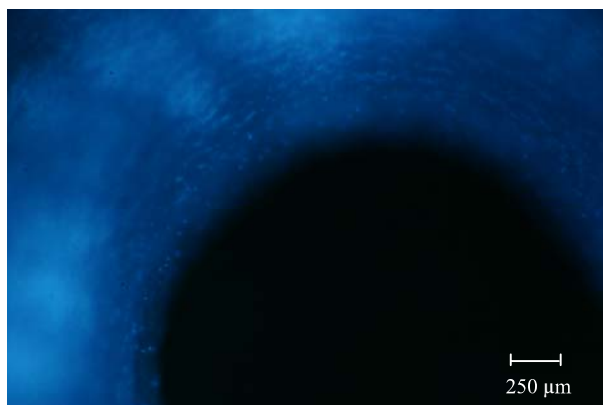
(F)



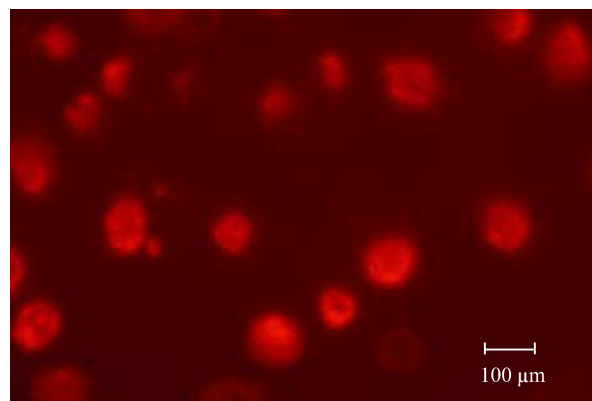
(G)



(H)

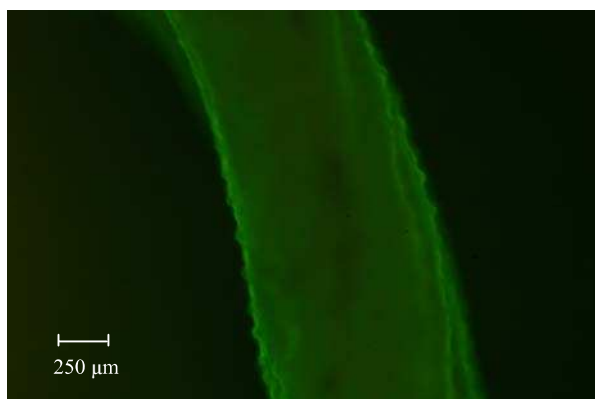


(I)

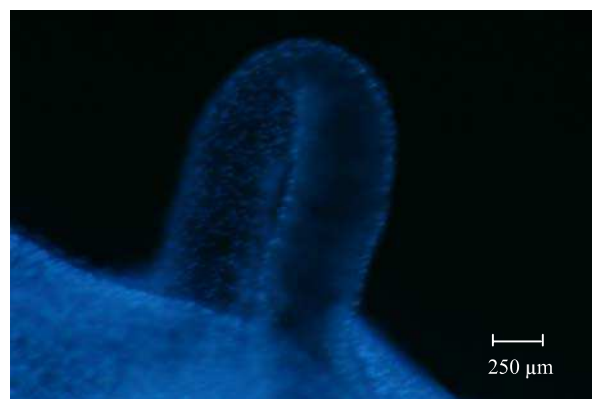


(J)

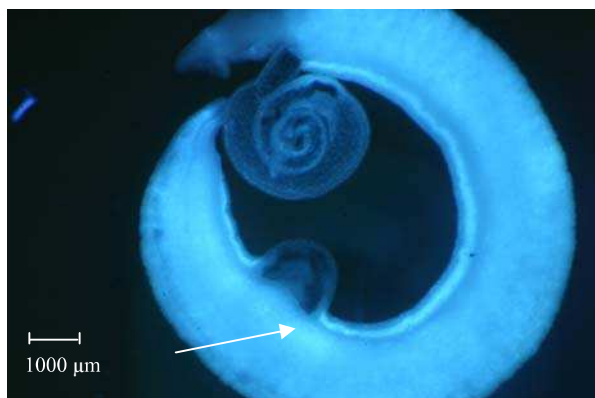
Figura 23 – Marcação dos danos causados no tegumento após administração das drogas “*In vivo*”. Marcação com Hoechst 33258 (azul), lectina de *Glycine max* (vermelho) e Alexa Flúor 488 faloidina (verde). (A, B e C) vermes do grupo controle. Não há presença de danos. (D, E, F, G, H, I e J) vermes provenientes dos animais tratados com 400mg/Kg de PZQ. É possível visualizar as lesões que estão marcadas com Hoechst 33258, lectina de *Glycine max* e Alexa Flúor 488 faloidina (áreas com fluorescência).



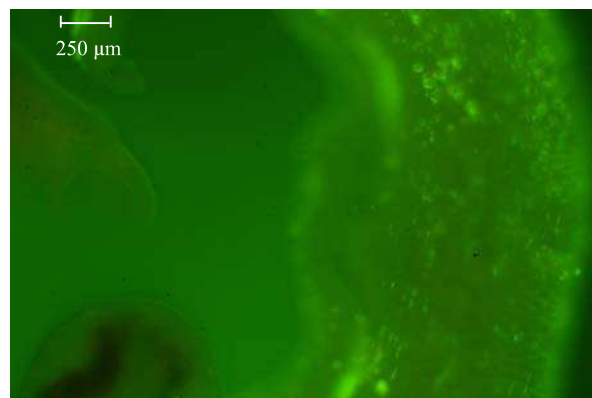
(A)



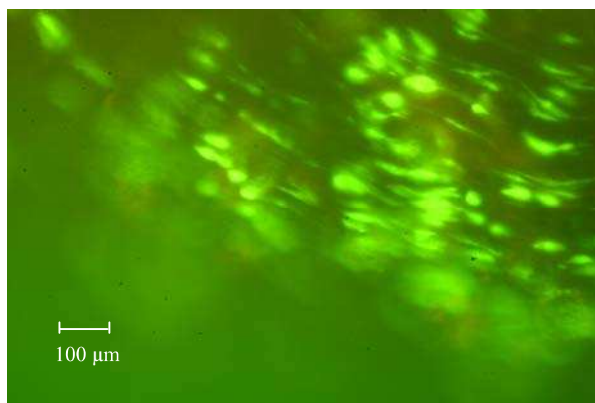
(B)



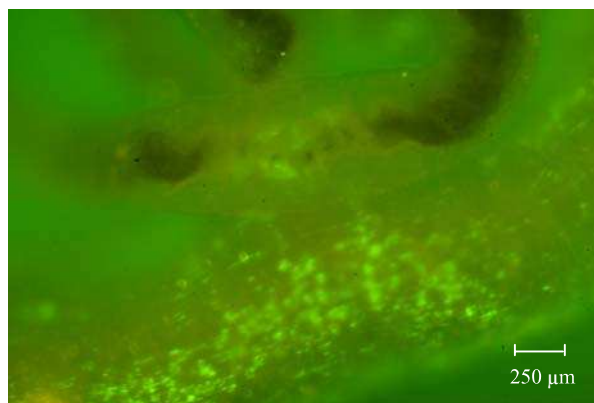
(C)



(D)

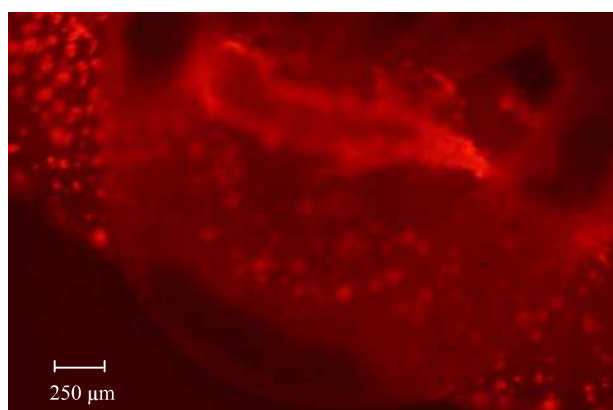


(E)

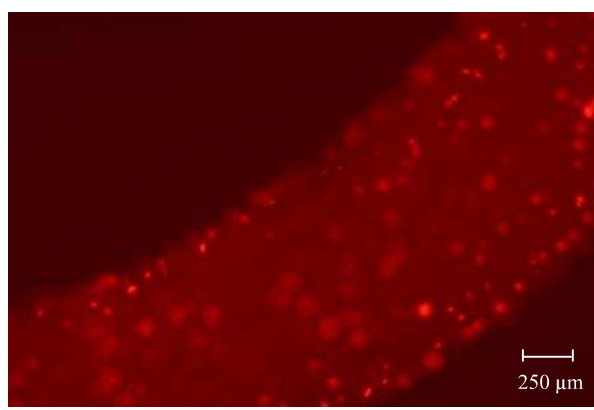


(F)

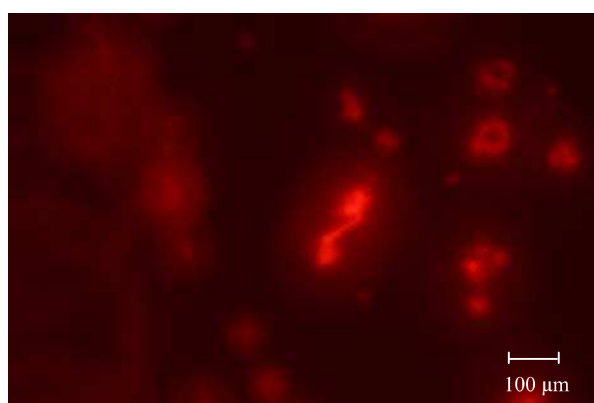
Figura 24 – Marcação dos danos causados no tegumento após administração das drogas. (A e B) parasitos obtidos dos camundongos tratados com 200 mg/Kg de OXA. (C, D, E e F) vermes recuperados dos animais tratados com a associação OXA/PZQ (100mg/Kg + 200mg/Kg, respectivamente), presença de lesões marcadas com Hoechst 33258 (azul) e Alexa Fluor 488 faloidina (verde).



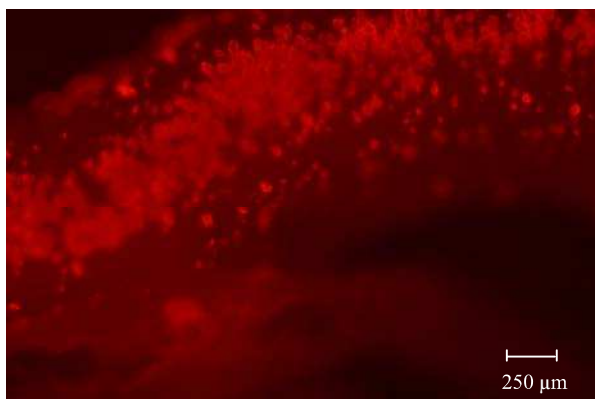
(A)



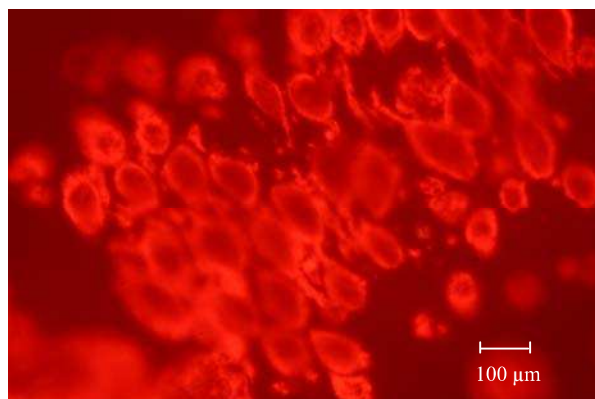
(B)



(C)



(D)



(E)

Figura 25 – Marcação dos danos causados através da lectina de *Glicine max* (vermelho). (A, B e C) vermes recuperados dos animais tratados com a associação OXA/PZQ (100mg/Kg + 200mg/Kg, respectivamente), presença de lesões. (D e E) parasitos provenientes dos animais tratados com ambas as drogas (200mg/Kg de OXA + 400 mg/Kg de PZQ). Os danos se mostram mais intensos. As lesões causadas pela associação são mais compactas do que as provocadas pelo PZQ na dosagem de 400mg/Kg de PZQ, como mostrado pela marcação com lectina de *Glicine max* .

5 Discussão

Atualmente, encontram-se disponíveis no mercado, duas drogas para o tratamento da esquistossomose mansoni: oxamniquina (OXA) e praziquantel (PZQ). No entanto, alguns estudos têm demonstrado a existência de cepas resistentes a esses fármacos, podendo isto representar, no futuro, um grande problema para o controle e tratamento desta parasitose (Katz et al. 1973, Guimarães et al. 1979, Fallon & Doenhoff 1994, Araújo et al. 1996, Ismail et al. 1996, Coelho et al. 1997, Ismail et al. 1999, Bonesso-Sabadini et al. 2002). Dessa forma, alternativas que busquem evitar e/ou retardar o aparecimento de resistência devem ser consideradas, uma vez que o empenho e os recursos disponíveis para o desenvolvimento de novas drogas são limitados. Os grandes laboratórios têm como prioridade o lucro, ficando os fármacos utilizados para terapêutica das parasitoses em segundo plano, salientando-se que são comercializados em regiões pobres.

A associação OXA/PZQ poderia ser de grande valia na terapêutica da esquistossomose, visto que estes dois fármacos possuem mecanismos de ação diferentes, podendo ter, assim, um efeito complementar (Delgado et al. 1992). Entretanto, as restrições feitas ao emprego tanto da OXA quanto do PZQ isoladamente, bem como em associação, dizem respeito, principalmente, aos seus possíveis efeitos tóxicos sinérgicos e/ou aditivos.

Foster et al. (1973) descreveram a DL_{50} da OXA em camundongos como sendo de 1300mg/Kg, enquanto Foherberg (1982) considerou a DL_{50} para o PZQ uma dose de aproximadamente 2650mg/kg. Embora os trabalhos relacionados à toxicidade da associação OXA/PZQ sejam escassos, alguns estudos referentes ao tratamento da esquistossomose humana, empregando a combinação OXA/PZQ, descrevem a existência de poucos efeitos colaterais, os quais se apresentam leves e de curta duração, não sendo observadas reações superiores às esperadas para o uso das drogas isoladamente (Zwingerberger et al. 1987, Campos et al. 1985, Creasey et al. 1986, Gryschek et al. 2004).

Com base em estudos anteriores, o nosso trabalho procurou inicialmente avaliar o efeito letal da associação OXA/PZQ, em camundongos não infectados, utilizando-se conjuntamente as suas DLs_{50} . Os resultados obtidos mostraram que a associação das DLs_{50} de OXA e PZQ (1300mg/Kg e 2650 mg/Kg, respectivamente) gerou uma alta taxa de mortalidade dos animais (95%), quando comparada as DLs_{50} de cada droga empregada isoladamente (55% para OXA e 0% para PZQ, respectivamente). Tal fato poderia ser explicado por um efeito tóxico sinérgico na associação entre OXA e PZQ, quando esses medicamentos são associados em doses próximas as suas DLs_{50} . A OXA possui um baixo índice terapêutico. Dessa forma, supõe-se que o efeito tóxico gerado pela OXA possa ser

acentuado pelo uso do PZQ, uma vez que a DL₅₀ do PZQ, empregada isoladamente, não foi capaz de causar a morte de nenhum animal. Entretanto, a associação da metade das DL₅₀ de OXA e PZQ (650mg/Kg e 1325 mg/Kg, respectivamente) causou somente 20% de mortalidade, porcentagem esta, que foi similar àquela encontrada para a ½ da DL₅₀ de OXA, utilizada separadamente (Tabela 1). Isto sugere que a toxicidade da associação OXA/PZQ esteja ligada às doses utilizadas. Assim, parece não existir um aumento na toxicidade quando as drogas são associadas em doses, significativamente inferiores as suas DL₅₀.

A DL₅₀ da OXA para camundongos (1300mg/Kg), segundo Foster et al. (1973), foi confirmada em nosso estudo, onde obtivemos 45% de mortalidade. Contudo, o mesmo não foi observado para o PZQ, onde a DL₅₀ (2.650 mg/Kg) sugerida por Foherberg (1982), não foi efetiva para provocar a morte de nenhum animal. Todavia, nossos resultados foram semelhantes àqueles obtidos por Tonelli et al. (1995) quando administraram DL₅₀ de PZQ e OXA em camundongos Balb-c. A taxa de mortalidade para o grupo que recebeu a DL₅₀ PZQ foi de 5%, enquanto para o grupo da OXA foi de 56%. Em função dos nossos dados e dos encontrados na literatura, torna-se claro que são necessários mais estudos para avaliar a toxicidade da combinação OXA/PZQ, bem como ajustar a DL₅₀ para o PZQ.

Nas últimas décadas, pesquisas têm sido realizadas para avaliar o efeito da associação OXA/PZQ na terapêutica da esquistossomose (Shaw & Brammer 1983, Zwingerberger et al. 1987, Campos et al. 1989, Delgado et al. 1992, Grysccheck et al. 2004). Bons resultados foram obtidos no tratamento de camundongos, no período patente de infecção, com a combinação de baixas doses de OXA e PZQ (Shaw & Brammer 1983, Delgado et al. 1992, Campos et al. 1989). Campos et al. (1985), entretanto, não obtiveram vantagens na terapêutica experimental, empregando as drogas de forma conjunta, porém, neste estudo, o tratamento foi realizado no período pré-patente de infecção, estágio da doença onde vermes imaturos encontram-se presentes. Segundo alguns autores (Foster et al 1971, Xiao et al. 1985), as formas jovens do parasito são naturalmente menos sensíveis tanto à OXA quanto ao PZQ.

Do mesmo modo, o uso da combinação OXA/PZQ, no tratamento da esquistossomose humana, mostrou-se melhor do que o tratamento realizado com as drogas utilizadas individualmente, como demonstrado por Zwingerberger et al. (1987), Campos et al. (1985), Pugh e Tesdale (1983) e Creasey et al. (1986). Entretanto, outros autores (Farid et al 1990, Prata et al. 1986, Grysccheck et al 2004) não conseguiram os mesmos resultados. Talvez, a discordância entre os resultados seja devido às diferenças nas metodologias utilizadas.

Nossos resultados, referentes ao tratamento da esquistossomose experimental, mostraram que diferentes combinações de OXA/PZQ (50mg/Kg OXA + 200mg/Kg PZQ e 100mg/Kg de OXA + 200mg/Kg PZQ), bem como o tratamento com 200mg/Kg de OXA,

administrada isoladamente, foram semelhantes e eficazes na redução da carga parasitária dos animais, não havendo diferenças significativas entre eles. Contudo, o tratamento com as drogas em associação, mostrou-se melhor na redução da carga parasitária dos animais, quando comparados aos demais tratamentos, onde o PZQ foi empregado separadamente (200mg/Kg PZQ e 400mg/KgPZQ). A dose de 100mg/Kg de OXA usada de forma isolada se mostrou menos eficiente frente ao tratamento com as associações de (50mg/Kg de OXA + 200 mg/Kg de PZQ e 100 mg/Kg de OXA + 200mg/Kg de PZQ), sendo semelhante somente à associação de 100mg/Kg de OXA + 200 mg/Kg de PZQ em um dos experimentos. O tratamento com 50 mg/Kg de OXA de forma isolada, não apresentou nenhum valor terapêutico. Embora o tratamento com 200mg/Kg de OXA tenha sido similar ao obtido empregando-se a associação de 50mg/Kg de OXA + 200 mg/kg PZQ, foi utilizado neste último, $\frac{1}{4}$ e $\frac{1}{2}$ das doses consideradas curativas para OXA e PZQ, respectivamente. Além disso, as combinações mostraram-se melhores do que o tratamento com 400 mg/kg de PZQ, droga considerada, atualmente, como primeira escolha no tratamento da esquistossomose (Doenhoff 2002). É bom ressaltar ainda que apesar do tratamento com 200mg/Kg de OXA ser semelhante estatisticamente ao tratamento com a associação de 100mg/Kg de OXA e 200 mg/Kg de PZQ, este último esquema foi o único capaz de eliminar todos os parasitos (Tabelas 2, 3 e 4). Além disso, no presente estudo, também foram observadas diferenças significativas na mortalidade entre machos e fêmeas relacionadas ao uso de OXA ou do PZQ, onde o PZQ foi mais eficaz na eliminação dos parasitos fêmeas e a OXA na diminuição do número de vermes machos. Este resultado confirma estudos prévios descritos na literatura (Cioli et al. 1995, Pica Mattoccia et al. 2004) e corroboram a idéia de uma possível ação sinérgica ou complementar, considerando-se o sexo dos parasitos, entre as duas drogas, o que explicaria as maiores taxas de cura alcançadas com o uso da associação. Diante da provável ação sinérgica, o possível modo de atuação desta, foi investigado “*in vitro*”.

Sato et al (2002) observaram o efeito modulador de algumas drogas, previamente conhecidas por interagirem com proteínas transportadoras de células animais, sobre o sistema excretor do verme adulto macho de *S. mansoni*. Para tanto, fizeram uso de uma sonda fluorescente denominada Resorufin, a qual por sua vez é um substrato da Pgp.

Os resultados obtidos na nossa pesquisa revelaram que o PZQ foi capaz de paralisar a atividade excretora dos vermes adultos machos de *S. mansoni*. Tal fato pôde ser observado pela marcação dos parasitos com Resorufin anteriormente a exposição com PZQ (item3.4.4). Esta droga impediu a saída da sonda (substrato da P- glicoproteína - Pgp) para o meio externo (Figura 18 A). Assim, sugere-se pela primeira vez, que de alguma forma o PZQ, atue no sistema excretor, interferindo na atividade da Pgp. O mesmo resultado foi observado por Sato

et al. (2002) na presença da amilorida (inibidor da bomba de Na^+ e da Na^+/H^+ ATPase). Assim como o PZQ, a amilorida interferiu, significativamente, na excreção da Resorufin. Entretanto, por se tratar de compostos completamente diferentes, fica difícil inferir alguma relação entre os resultados. Algumas hipóteses, porém, podem ser consideradas para justificar os resultados encontrados no nosso estudo: a) é possível que o PZQ atue na depleção de energia, através do aumento do influxo de cálcio para os tecidos, levando a um consumo excessivo de ATP, o que poderia vir a inibir a Pgp; b) o PZQ pode atuar como um substrato inibidor competidor da Pgp; c) o PZQ pode-se ligar diretamente a Pgp, perturbando a excreção da Resorufin; d) o PZQ pode atuar, indiretamente, na excreção da Resorufin, afetando os fosfolipídios da membrana tubular, fazendo com que a sonda se disperse para outros locais que não o sistema excretor (Harder et al. 1988), ou ainda; e) a simples contração induzida pelo PZQ, provocaria um retardo na excreção da sonda devido a ausência de um fluxo de conteúdo intestinal, proveniente da motilidade do órgão excretor. Assim, a sonda teria maior possibilidade de se difundir para os tecidos circunjacentes (sugestão dada pelo Dr. Guilherme Corrêa). No entanto, esta última hipótese foi testada por nós (trabalhos preliminares, 2005), através de uma outra droga (Rompun - Bayer), também capaz de causar a contração muscular do verme. Apesar das duas drogas dificultarem a saída de Resorufin para o meio externo, o uso de Rompun parece não ter interferido na Pgp, uma vez que foi possível observar a marcação de alguns túbulos excretores e ramificações, o que não foi observado com o uso do PZQ. Assim, sugere-se que a contração, por si só, não é capaz de inibir a excreção da sonda Resorufin.

Um fato interessante foi que, após a exposição dos parasitos, por 15 minutos ao PZQ, seguida da retirada da droga, com posterior marcação dos mesmos com Resorufin, observamos a recuperação da atividade excretora dos vermes machos, sendo possível visualizar o túbulo excretor (Figura 18 B). Observamos também, que esta recuperação pareceu ser influenciada pela concentração da droga. Como descrito no item 4.3.2 dos resultados: quanto menor a concentração da droga, mais rápida a recuperação da atividade excretora (Figura 19 C e Figura 19 E). Este comportamento poderia ser explicado pela maior ou menor saturação da Pgp, pelo seu putativo substrato (PZQ). Assim quanto menor a concentração do PZQ mais rápida parece ser a recuperação da atividade da proteína transportadora. Este fato reforça a hipótese de que o PZQ possa ser um substrato inibidor competidor da Pgp. Por outro lado, é possível que o PZQ não só atue inibindo a atividade da Pgp, mas também, possa ser um estímulo para regular a atividade desta glicoproteína.

A expressão e atividade da Pgp, em células de várias espécies, estão ligadas a uma variedade de estímulos endógenos e ambientais, tais como: presença de agentes citotóxicos,

irradiação, choque térmico (Suhai & Piquete-Miller 2000), que são capazes de desencadear um “*stress*” celular. Em resposta a estes estímulos, a Pgp é ativada no intuito de compensar este “*stress*” e manter a integridade da célula. Além disso, segundo Stavrovskaya (2000), a Pgp é facilmente ativada em diferentes situações e não somente sob a influência de fatores capazes de provocar injúria celular. Baseado nessas informações, o PZQ, por si só ou as alterações provocadas por ele no parasito (Ex: dano no tegumento) poderiam ser interpretadas pelas células, como sinais para transcrição, induzindo um aumento na síntese de novas moléculas de Pgp. Collet et al. (2004) demonstraram que substratos da P-glicoproteína com alta permeabilidade na membrana, como o propanolol e o verapamil, estimularam um aumento de 4 a 6 vezes na expressão do RNAm para o gene *MDR1* (gene que codifica a Pgp para células humanas), em células epiteliais do intestino. A indução da Pgp pelos seus substratos foi rápida com significativo aumento dos níveis desta glicoproteína, ocorrendo dentro de 3 horas. Em adição, observamos, na presente pesquisa, que após exposição dos vermes ao praziquantel e posterior incubação com OXA, alguns parasitos machos demonstraram sinais de atraso na recuperação da atividade excretora (Figura 20 F). O principal mecanismo de ação da OXA está relacionado à sua capacidade de inibir a síntese de ácidos nucleicos (Pica-Mattoccia 1989). De tal modo, uma possível explicação para o atraso na recuperação da atividade excretora seria a inibição ou o retardo na transcrição de moléculas de Pgp, causada pela atuação da OXA. Diferentemente do PZQ, à exposição dos vermes somente a OXA não causou nenhuma interferência na excreção da Resorufin. A presença da OXA, isoladamente, não prejudicou a atividade excretora. Esses dados talvez possam auxiliar a explicar a possível ação sinérgica sugerida para a associação OXA/PZQ.

Os resultados do nosso estudo, referentes ao comportamento dos vermes fêmeas, demonstraram que fêmeas isoladas, independentemente da exposição às drogas, apresentaram seu sistema excretor ativo, sugerindo que nessas fêmeas, a Pgp esteja em constante atividade. Por outro lado, as fêmeas acasaladas, que não foram expostas às drogas, não mostraram sinais de atividade excretora, sugerindo, assim, que em tais condições, as fêmeas não apresentam atividade detectável da Pgp. Entretanto, para as fêmeas acasaladas que foram expostas às drogas (OXA, PZQ ou à associação) foi observada a atividade excretora de alguns parasitos, enquanto, outras não apresentaram sinais de atividade. Assim como Sato et al (2002), nossos resultados demonstraram grande variabilidade, no que diz respeito ao sistema excretor dos vermes fêmeas. Sato et al. (2002) optaram por trabalhar somente com parasitos machos, devido a grande variação nas respostas apresentadas pelas fêmeas frente a diferentes moduladores da Pgp. Dessa forma, torna-se complicado levantar suposições que justifiquem os nossos achados. No entanto, alguns fatos serão considerados.

Existem muitas diferenças entre os vermes machos e fêmeas, não somente no que se refere a sua morfologia e função, mas também diferenças bioquímicas (Coles 1973). Coles (1973), baseado em diferenças encontradas entre isoenzimas esterases provenientes de fêmeas acasaladas e não acasaladas, recuperadas de um mesmo animal, sugere que possa haver uma relação funcional entre os dois sexos. Já está comprovado que a maturidade sexual da fêmea de *S. mansoni* é alcançada somente na presença do macho, sendo que na ausência deste, ela não se desenvolve completamente (Pica-Mattoccia et al. 2004, Hernandez et al. 2004). Isto, de algum modo, caracteriza certa dependência da fêmea em relação ao macho. Além desses estudos, Cheng et al. (2005) demonstraram, através de análise proteômica, diferenças na expressão de proteínas entre vermes machos e fêmeas de *S. japonicum* após o acasalamento. Segundo os autores, as principais funções destas proteínas estão ligadas a transdução de sinais, ao metabolismo e a regulação transcricional.

Essas observações poderiam explicar, em parte, os resultados obtidos. É provável que as fêmeas isoladas tenham uma função metabólica relacionada ao sistema excretor dependente do macho. De tal modo, os vermes fêmeas acasalados teriam uma dependência do metabolismo do macho e este, por sua vez, participaria, de alguma forma, do mecanismo funcional de excreção da fêmea, e assim sendo, poderia ser capaz de inibir o sistema excretor da mesma. Por outro lado, no intuito de garantir sua sobrevivência e integridade, os vermes fêmeas isolados expressariam genes e proteínas necessárias à sua sobrevivência individual, o que explicaria a presença de atividade excretora em todos os parasitos fêmeas não acasalados, independente da exposição às drogas. Entretanto, a presença de agentes agressores (Ex: OXA, PZQ, sistema imune) que ameacem a sobrevivência dos parasitos tanto machos quanto fêmeas, poderiam estimular ou regular a atividade excretora dos vermes com a finalidade de garantir a integridade de ambos os sexos. É possível que na presença de agentes agressores, o funcionamento do sistema excretor, somente do macho, não seja suficiente para garantir a integridade de ambos, considerando-se que haja uma dependência da função excretora da fêmea em relação ao macho. Isto explicaria a marcação do sistema excretor em algumas fêmeas acasaladas expostas às drogas e em outras não. Além disso, as diferentes marcações observadas pela exposição à OXA e ao PZQ poderiam ser decorrentes dos diferentes modos de ação destas drogas, levando-se em consideração que esses dois medicamentos agem de maneira diferente no que diz respeito ao sexo dos parasitos. Por outro lado, observamos que quando os parasitos foram recuperados de animais tratados “*in vivo*”, os resultados foram, surpreendentemente, diferentes daqueles onde os vermes foram expostos diretamente às drogas (experimento “*in vitro*”). Os vermes machos obtidos de animais, que receberam PZQ, OXA ou a associação OXA/PZQ, não apresentaram atividade excretora, ao passo que as

fêmeas tanto acasaladas quanto isoladas, apresentaram nítida atividade excretora. É provável que dependendo das circunstâncias, do meio onde se encontram, assim como da atividade a ser desempenhada, as fêmeas necessitem de uma eficiente atividade excretora. Bosch et al. (1994) descreveram a proteína SMDR2 (“*Schistosoma Multi Drug Resistance*”), como sendo um homólogo da Pgp, e em adição, observaram que a expressão desta proteína é mais acentuada em vermes adultos fêmeas do que nos machos. Por outro lado, cabe destacar que no presente estudo, os parasitos além de entrarem em contato com as drogas, foram expostos ao sistema imune dos animais. Sabe-se que o sistema imune atua concomitantemente com as drogas PZQ e OXA na eliminação dos parasitos (Brindley et al. 1987, Fallon et al. 1996, Ribeiro et al. 2004). Em adição, a membrana de machos e fêmeas apresenta diferentes propriedades e comportamento quando estes encontram-se em cultura (Lima et al. 1994b). Assim, a presença do sistema imune do parasito, bem como a exposição às drogas podem ter interferido tanto na difusão da sonda (Resorufin) para dentro dos vermes, quanto na interpretação dos sinais para transcrição de novas moléculas de Pgp. Isto explicaria, em parte, a maior atividade das fêmeas em relação ao macho quando expostos às drogas “*in vivo*”, levando a resultados diferentes dos encontrados “*in vitro*”.

O estudo da glicoproteína do *S. mansoni* deve ser aprimorado, no intuito de pesquisar a importância deste transportador no mecanismo de resistência do verme ao praziquantel. É bom ressaltar que este trabalho é o primeiro a descrever a influência do PZQ na atividade excretora. Como já proposto por Sato et al. 2002, a resistência ao PZQ e a outros esquistossomicidas, pode aparecer não somente em parasitos geneticamente selecionados, mas pode ser induzido nesses trematódeos por uma variedade de interações ligadas a Pgp homóloga desses vermes. Por outro lado, Bosch et al. (1994) não encontraram nenhuma relação entre a resistência à tricantona e à OXA e a expressão de SMDR2, suposta pelos mesmos autores como sendo um homólogo da Pgp. Mais estudos, contudo, devem ser realizados para confirmar este fato. Além disso, futuros trabalhos devem ser desenvolvidos para estabelecer as reais diferenças, bem como a influência do meio externo na atividade excretora relacionada ao sexo desses trematódeos.

Apesar de possuírem diferentes mecanismos de ação, alguns estudos têm demonstrado que os fármacos disponíveis para o tratamento da esquistossomose, OXA e PZQ, são capazes de causar dano na membrana tegumentar dos vermes adultos (Melhorn et al. 1981). Neste trabalho, também avaliamos a capacidade da OXA e do PZQ e da associação OXA/PZQ, causar dano no tegumento. Para isto, foram utilizados alguns marcadores fluorescentes: Hoechst 33258, lectina de *Glicine max*, Alexa Fluor 488 faloidina e AF-18, específicos para o DNA das células, carboidrato de membrana (N-acetilglicosamina), actina e lipídeos,

respectivamente. Os resultados desses experimentos demonstraram que as drogas utilizadas “*in vitro*” tanto separadamente, quanto em associação foram capazes de lesar o tegumento dos parasitos (Figura 21). Uma observação interessante foi que as lesões presentes nos vermes expostos à ambas as drogas puderam ser visualizadas com as sondas Hoechst 33258 e lectina de *Glicine max*, ao passo que os danos existentes nos parasitos expostos à apenas a uma das drogas foram observados somente através da marcação com Hoechst 33258. A sonda Hoechst 33258 parece ser muito sensível na marcação das regiões onde há presença de dano, sendo que qualquer estrago ou lesão no tegumento do verme, por menor que seja, é marcado precisamente, por esta sonda. Ao contrário, o mesmo não foi verificado pela lectina de *Glicine max*. É provável que para serem marcadas com lectina de *Glicine max* as lesões tenham que ser mais intensas ou em maior número, já que esta sonda possui uma menor sensibilidade para marcar as lesões. Dessa forma, quanto maior e/ou mais intensos forem os danos maior a possibilidade de serem marcados pela lectina de *Glicine max*. Assim, é possível que a associação tenha causado um dano mais intenso do que as drogas empregadas isoladamente, sugerindo um efeito sinérgico da combinação. Isto explicaria porque somente foi possível observar os danos causados nos parasitos expostos às drogas isoladamente, com a sonda Hoechst 33258, enquanto que os vermes expostos à associação puderam ser marcados com as duas sondas. Este efeito sinérgico poderia ser baseado em duas hipóteses: a) é possível que a OXA acentue as lesões provocadas pelo PZQ, já que por si só, ela é capaz de causar dano no tegumento; b) por outro lado, a OXA poderia atuar inibindo ou retardando a síntese de novas proteínas pelo parasito, dificultando, ou até mesmo impedindo o reparo da membrana tegumentar do *S. mansoni*.

As sondas AF-18 e Alexa Flúor 488 faloidina usadas nos experimentos onde os vermes foram expostos às drogas “*in vitro*”, não se mostraram sensíveis para marcar os danos causados pelos fármacos, tanto separadamente quanto associadas. Parece haver uma relação entre a intensidade do dano e a marcação dos parasitos pelas sondas. Nossos resultados sugerem que à medida que os danos se tornam mais intensos e/ou maiores as sondas Hoechst 33258, lectina de *Glicine max*, Alexa Flúor 488 faloidina e AF-18, nesta ordem, vão se tornando mais eficazes na demonstração das lesões. Este fato, provavelmente deve-se a diferenças na difusão das sondas no tegumento do verme, a qual provavelmente pode aumentar, quando as lesões se tornam mais graves. Talvez, os danos causados pelo uso das drogas “*in vitro*” não tenham sido suficientes, para que pudessem ser marcados pela Alexa Flúor 488 faloidina e pela AF-18. De qualquer modo, podemos afirmar que o dano foi mais intenso quando a associação OXA/PZQ foi empregada, em virtude da marcação simultânea com Hoechst 33258 e com lectina de *Glicine max* (Figura 21 E, F, G e H).

No que concerne ao dano causado no tegumento, os resultados dos experimentos nos quais os vermes foram recuperados dos animais tratados “*in vivo*”, utilizando-se as drogas isoladas ou em associação, reproduziram nossos resultados onde os vermes foram expostos diretamente às drogas “*in vitro*”. Contudo, as lesões dos parasitos recuperados dos animais tratados com PZQ isoladamente, puderam ser visualizadas pelos marcadores Hoechst 33258, lectina de *Glicine max* e Alexa Flúor 488 faloidina, enquanto que os danos provocados pela OXA, somente foram marcados com Hoechst. Dessa forma, sugere-se que os parasitos obtidos dos animais tratados com PZQ tenham sofrido danos no tegumento mais graves do que os sofridos pelos parasitos expostos ao PZQ “*in vitro*” e pelos parasitos recuperados dos animais tratados com OXA. A explicação para tal observação, seria a presença do sistema imune do hospedeiro, o que causaria danos maiores e/ou mais intensos. Já foi demonstrado que o PZQ atua em sinergia com o sistema imune do hospedeiro (Brindley et al. 1987, Fallon et al. 1992, Ribeiro et al. 2004). Assim, a presença de anticorpos (Acs), na superfície do parasito, facilita a sua ligação com as células de defesa do hospedeiro, podendo potencializar o dano causado no tegumento. Os vermes coletados dos animais tratados com a combinação OXA/PZQ também apresentaram lesões, que, foram igualmente marcadas com Hoechst 33258, lectina de *Glicine max* e Alexa Flúor 488 faloidina. Embora as lesões tenham sido mais intensas nos parasitos provenientes dos animais tratados com a associação de 400mg/Kg de PZQ com 100mg/Kg de OXA, a combinação de 200mg/Kg de PZQ + 100mg/Kg de OXA foi suficiente para provocar lesões que puderam ser visualizadas por essas três sondas (Figura 24 C, D e E Figura 25 A e B). A marcação com lectina de *Glicine max* evidenciou que os parasitos, recuperados dos animais tratados com 400mg/Kg de PZQ associado à 200mg/Kg de OXA, tiveram danos mais extensos e compactos (Figura 25 D e E) do que aqueles tratados somente, com 400 mg/Kg de PZQ (Figura 23 H e J). Assim, sugerimos que a associação OXA/PZQ tenha sido mais potente em lesar o tegumento, do que as drogas empregadas isoladamente. Isto pode ser explicado mais uma vez, por uma ação sinérgica e /ou aditiva dos medicamentos, já discutida anteriormente, aliada à ação do sistema imune, o que aumentaria ainda mais, a eficácia terapêutica. Esses dados, podem ajudar a explicar a eliminação de todos os parasitos, nos três diferentes experimentos realizados, usando-se a associação de 100mg/Kg de OXA com 200 mg/Kg de PZQ. É importante salientar que a eliminação de todos os parasitos é de grande vantagem, uma vez que é um meio de prevenir a seleção de linhagens resistentes por pressão quimioterápica. Dessa forma, esperamos com este estudo acrescentar novos elementos para determinar a pertinência e viabilidade da associação de drogas esquistossomicidas, já conhecidas OXA e PZQ, como uma alternativa terapêutica, para o tratamento da esquistossomose.

6 Conclusões

A partir do presente estudo, concluímos que:

- Os tratamentos realizados com as associações (50mg/Kg de OXA + 200 mg/Kg de PZQ) e (100mg/Kg de OXA + 200 mg/Kg de PZQ) se mostraram mais eficientes, em reduzir a carga parasitária dos animais quando comparadas aos tratamentos com 200 e 400 mg/Kg de PZQ, empregados isoladamente. A associação de 100mg/Kg de OXA + 200 mg/Kg de PZQ foi o único esquema terapêutico a eliminar todos os parasitos, em todos os 3 experimentos, zerando a carga parasitária dos animais.
- O tratamento com OXA foi mais eficaz na eliminação dos parasitos machos, ao contrário do PZQ que teve maior eficácia na diminuição do número de vermes fêmeas, confirmando, assim, estudos anteriores.
- O PZQ interferiu na atividade excretora, inibindo a excreção da Resorufin.
- A atividade excretora dos vermes machos estudados “*in vitro*” foi recuperada após remoção do PZQ do meio de cultura.
- Os parasitos fêmeas de *S. mansoni* não acasalados (isolados), independente da exposição às drogas, apresentaram nítida atividade excretora .
- Os parasitos fêmeas acasalados, tanto “*in vivo*” quanto “*in vitro*” somente apresentaram atividade excretora quando em presença de agentes agressores externos (drogas e sistema imune).
- O tratamento “*in vivo*” com PZQ causou danos mais extensos ao tegumento dos parasitos em comparação com o tratamento realizado com OXA.
- A associação OXA/PZQ foi capaz de causar danos mais intensos, na membrana tegumentar do verme adulto de *S. mansoni*, do que àqueles provocados pelo uso das drogas separadamente, tanto “*in vivo*” quanto “*in vitro*”.

7 Referências bibliográficas

Andrade ZA, Peixoto E, Guerret S, Grimaud JA. Hepatic connective tissue changes in hepatoesplenic schistosomiasis. **Hum. Pathol.** 1992; 23: 566- 573.

Andrade ZA, Santana Filho D, Rebouças G. Patologia da esquistossomose avançada. **Rev.Inst. Med. Trop. São Paulo.** 1962; 4: 170 –179.

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

Andrews P. A summary of the efficacy of praziquantel against schistosomes in animal experiments and notes on its mode of action. **Drug. Res** 1981; 31: 538 – 541.

Araújo N, Katz N, Dias EP, Souza CP. Susceptibility to chemoterapeutic agents of strains of *Schistosoma mansoni* isolated from treated and untreated patients. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 1980; 29 (5): 890 – 894.

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.

Bassily S, Farid Z, Dunn M, El-Masry NA, Stek MJR. Praziquantel for treatment of schistosomiasis in patients with advanced splenomegaly. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 1985; 79: 629– 634.

Batzinger RP & Bueding P. Mutagenic activities *in vitro* and *in vivo* of five antischistosomal compounds. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** 1977; 200: 1 – 9.

Bina JC & Spinola A. Convulsão associada ao uso de oxamniquine. Relato de um caso. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** 1976; 10: 221– 223.

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

Bosch IB, Wang ZX, Tao LF, Shoemaker CB. Two *Schistosoma mansoni* cDNAs encoding ATP-binding cassette (ABC) family proteins. **Mol. Biochem. Parasitol.** 1994; 65: 351 – 356.

Botros S, Soliman A, El-Gawhary M, Guirguis N. Effect 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.

Camargo S. Impacto do desenvolvimento na expansão da esquistossomose. **Rev. Inst Med Trop São Paulo.** 1980; 22: 117-119.

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.

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 esquistomose mansônica. EM: CONGRESSO DA SOC. BRAS. MED. TROPICAL, 21, 03 a 08 fev 1985, p. 51.

Campos R, Pinto PLS, Sant'Ana EJ, Neto VA, Moreira AAB. Tratamento da esquistossomose mansônica por meio da associação de oxamniquine com praziquantel. I - observações experimentais relativas à fase pré-patente. **Rev. Hosp. Clin. Fac. Med. São Paulo.** 1987; 42 (5): 201 – 203.

Carvalho SA, Shikanai-Yasuda MA, Amato Neto V, Shiroma m, Lucas FJC. Neurotoxicidade do oxamniquine no tratamento da infecção humana pelo *Schistosoma mansoni*. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo.** 1985; 27: 132 – 142.

Castro N, Gonzalez-Esquivel DF, Lopes M, Jung H. Comparative analysis of the influence of food and cimetidine in plasma levels of praziquantel. **Rev. Invest. Clin.** 2003; 55 (6): 655 – 661.

Catterall WA. Structure and regulation of voltage-gated Ca^{2+} channels. **Annu.Rev. Cell Dev. Biol.** 2000; 16: 521 – 555.

Cheng GF, Lin JJ, Feng XG, Fu ZQ, Jin YM, Yuan CX, Zhou YC, Cai YM. Proteomic analysis of differentially expressed proteins between the male and female worm of *Schistosoma japonicum* after pairing. **Proteomics.** 2005; 5 (02): 511 – 521.

Chvédoﬀ M, Faccini JM, Gregory MH, Hull RM, Monro AM, Perraud J, Quinton RM, Reinert HH. The toxicology of the schistosomicidal agent oxamniquine. **Drug Dev. Res.** 1984; 4: 229 – 235.

Cioli D, Botros SS, Francklow KW, Mbaye A, Southgate V, Tchente TLA, Pica-Mattoccia L, Troiani AR, Seif el Din SH, Sabra AA, Albin J, Engels D, Doenhoff MJ. Determination of ED_{50} values for praziquantel in praziquantel-resistant and susceptible *Schistosoma mansoni* isolates. **Int. J. Parasitol.** 2004; 34: 979 – 987.

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

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, Moroni R. *Schistosoma mansoni*: hycanthone/oxamniquine resistance is controlled by a single autosomal recessive gene. **Exp. Parasitol.** 1992; 75: 425 – 432.

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, Mutih WT, Kinoti GK, Bruce JI, Katz N. Tolerance of Kenyan *S. mansoni* to oxamniquine. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** 1987; 81: 782 – 785.

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

Collett A, Hughes JT, Warhurst G. Rapid induction of P- glycoprotein expression by high permeability compounds in colonic cells in vitro: a possible source of transporter mediated drug interactions? **Biochem. Pharmacol.** 2004; 68: 783 – 790.

Conceição MJ, Argento CA, Corrêa A. Study of *Schistosoma mansoni* isolates from patients with failure of treatment with oxamniquine. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** 2000; 95 (3): 375 – 378.

Coutinho A & Dominguez ALC. Evaluation of the treatment of severe forms of schistosomiasis mansoni with oxamniquine. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo.** 1980; 22 (suppl 4): 41 – 51.

Cox DL & Radolf JD. Insertion of fluorescent fatty acid probes into the outer membranes of pathogenic spirochaetes *Treponema pallidum* and *Borrelia burgdorferi*. **Microbiol.** 2001, 147: 1161 – 1169.

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.

Daneshmend TK & Homeida MA. Oxamniquine pharmacokinetics in hepatosplenic schistosomiasis in the Sudan. **J. Antimicrob. Chemother.** 1987; 19: 87-93.

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

Dayan AD. Albendazole, mebendazole and praziquantel. Review of non-clinical toxicity and pharmacokinetics. **Acta Trop.** 2003; 86: 141-159.

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.

Dias LCS, Bruce JI, Coles GC. Variation in response of *Schistosoma mansoni* strains to schistosomicides. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo.** 1988; 3 (2): 81 – 85.

Dias LCS, Pedro RJ, Deberaldini ER. Use of praziquantel in patients with schistosomiasis mansoni previously treated with oxamniquine and/or hycanthone: resistance of *S. mansoni* to schistosomal agents. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** 1982; 76: 652 – 659.

Dias LCS, Pedro RJ, Rigo E, Mafra GL. Linhagem humana de *Schistosoma mansoni* resistente a esquistossomicidas. **Rev. Saúde Pública São Paulo.** 1978; 12: 110.

Dieckmann HW, Schneidereit M, Overbosch D. Inhibitory effects of cimetidine ketoconazole and miconazole on the metabolims of praziquantel. **Acta. Leiden.** 1989; 57 (2): 217 – 228.

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.

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

Doenhoff MJ, Modha J, Lambertucci JR. Anti- schistosome chemotherapy enhance by antibodies specific for a parasite esterase. **Immunology.** 1988; 65: 507 – 510.

Doenhoff MJ, Sabah AAA, Fletcher C, Webbe G, Bain J. Evidence for an immune-dependent action of praziquantel on *Schistosoma mansoni* to praziquantel in mice. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** 1987; 81: 947 – 951.

Drescher KM, Rogers EJ, Bruce JI, Katz N, Dias LCS, Coles GC. Response of drug resistant isolates of *Schistosoma mansoni* to antischistosomal agents. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** 1993; 88 (1): 89 – 95.

El Guiniady MA, El Touny MA, Abdel-Bary MA, Abdel-Fatah SA, Metwally A. Clinical and pharmacokinetic study of praziquantel in Egyptian schistosomiasis patients with and without liver cell failure. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 1994; 51: 809 – 818.

EMA – European Medicines Evaluation Agency 1996. Praziquantel summary report by CVMP. EMA/MRL/141/96 September 1996. EMA London.

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

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.

Farid Z, El Masry NA, Bassily S, Kamal M, Kilpatrick ME. Combined praziquantel – oxamniquine treatment of schistosomiasis. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** 1990; 84: 807.

Farinazzo RJM, Siqueira -Batista R, Lopes F, Ramos Junior AM, Quintas LEM, Corrêa AD. Bases patológicas da esquistossomose mansoni. **Arq. Bras. Med.** 1997; 71:107 – 110.

Foster R, Cheetman BL King DF. Studies with the schistosomicide oxamniquine (UK – 4271).I activity in rodents and *in vitro*. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** 1973; 67: 674 - 684.

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.

Frézard F, Maia EP, Quidu P, Priebe W, Suillerot AG. P-glycoprotein preferentially effluxes anthracyclines containing free basic versus charged amine. **Eur. J. Biochem.** 2001; 268: 1561 – 1567.

Frohberg H. Propriedades farmacocinéticas, farmacológicas y toxicológicas. **Salud. Publica Mex.** 1982; 24: 605 – 623.

Frohberg H. Results of toxicological studies on praziquantel. **Arzneimittelforschung.** 1984; 34: 1137 – 1144.

Frohberg H. The toxicological profile of praziquantel in comparison to other anthelmintics drugs. **Acta. Leiden.** 1989; 57: 201 – 215.

FUNASA – Fundação Nacional de Saúde. Guia Brasileiro de Vigilância Epidemiológica 1998. Disponível em <<http://www.dtr2001.saude.gov.br/svs/pub/GVE/PDF/GVE0510.pdf>>. Acesso 10/03/05.

Giorgio M, Salvatori AP, Soldani G, Giusiani M, Longo V, Gervasi PG, Mengozzi G. Pharmacokinetics and microsomal oxidation of praziquantel and its effects on the P450 system in three-month-old lambs infested by *Fasciola hepatica*. **J. Vet. Pharmacol. Ther.** 2001; 24: 251 – 259.

Gomes E, Dias LCS, Takaku L, Stangenhuis G. Biological and morphological characteristics of *Schistosoma mansoni* from the Paranapanema valley - Ourinhos. INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON SCHISTOSOMIASIS, 4, 1993, p. 51.

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

Grysczek 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.

Gueiros-Filho FJ, Viola JPB, Gomes FCA, Farina M, Lins U, Bertho AL, Wirth DF, Lopes UG. *Leishmania amazonensis*: multidrug resistance in vinblastine-resistant promastigotes is associated with rhodamine 123 efflux, DNA amplification, and RNA over expression of a *Leishmania* *mdr1* gene. **Exp. Parasitol.** 1995; 81: 480 – 490.

Guimarães RX, Tchakerian A, Dias LCS, De Almeida FMR, Vilela MP, Cabeça M, Takeda AK. Resistência ao hicanthone e oxamniquina em doentes com esquistossomose forma clínica hepatointestinal. **Rev. Assoc. Med. Bras.** 1979; 25: 48 – 50.

Harder A, Goosens J, Andrews P. Influence of praziquantel and Ca^{+2} on the bilayer- isotropic-hexagonal transition of models membranes. **Mol.Biochem. Parasitol.** 1988; 29: 55 – 60.

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.

Hernandez DC, Lim KC, McKelvey JH, Davies SJ. *Schistosoma mansoni*: sex-specific modulation of parasite growth by host immune signals. **Exp. Parasitol.** 2004; 106: 59 – 61.

Homeida M, Leahy W, Copeland S, Ali MM, Harron DW. Pharmacokinetic interaction between praziquantel and albendazole in Sudanese men. **Ann. Trop. Med. Parasitol.** 1994; 88: 551 – 559.

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.

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.

Katz N, Dias EP, Araújo N, Souza CP. Estudo de uma cepa humana de *Schistosoma mansoni* resistente a agentes esquistossomicidas. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** 1973; 7 (6): 381 – 387.

Katz N, Rocha RS, Souza CP, Coura filho P, Bruce JI, Coles GC, Kinoti GK. Efficacy of alternating therapy with oxamniquine and praziquantel to treat *Schistosoma mansoni* in children following failure of first treatment. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 1991; 44 (5): 509-512.

Katz N. Experiência com quimioterapia em grande escala no controle da esquistossomose no Brasil. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo.** 1980; 22: 40 – 51.

Kaye B. Clinical experiences with, and pharmacokinetics of, oxamniquine. **Adv. Pharmacol. Ther.** 1978; 10: 41 – 47.

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.

Kokwaro GO & Taylor G. Oxamniquine pharmacokinetics in healthy Kenyan Africa volunteers. **East Afr. Med. J.** 1991; 68(5): 359-364.

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.

Krajden S, Keystone JS, Glenn C. Safety and toxicity of oxamniquine in the treatment of *Schistosoma mansoni* infections, with particular reference to electroencephalographic abnormalities. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 1983; 32: 1344 – 1346.

Kramers PGN, Gentile JM, Gryseels BJMA, Jordan P, Katz N, Mott KE, Mulvihill JJ, Seed JL, Froberg H. Review of the genotoxicity and carcinogenicity of antischistosomal drugs: Is there a case for a study of mutation epidemiology ? **Mutat. Res.** 1991; 257: 49 –89.

Lambertucci JR, Rayes AAM, Serufo JC, Gerspacher-Lara R, Brasileiro Filho G, Teixeira R, Antunes CMF, Góes AM, Coelho PMZ. Schistosomiasis and associated infections. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** 1998; 93 (supl 1): 135 – 139.

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

Lima SF, Souza CTM, Vieira LQ, Coelho PMZ. Protein deficiency impairs the schistosomicidal action of praziquantel. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** 1998; 93 (suppl 1): 271 – 272.

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

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 optitc isomers in experimental therapy of schistosomiasis japonica in rabbits. **Clin. Med. J.** 1986; 99: 935 – 940.

Mandour ME, El Turabi H, Homeida MM, el Sadig T, Ali HM, Bennett JL, Leahey WJ, Harron DW. Pharmacokinetics of praziquantel in healthy volunteers and patients with schistosomiasis. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** 1990; 84: 389 – 393.

Martin SK, Oduola AMJ, Milhous WK. Reversal of chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum* by verapamil. **Science.** 1987; 235: 899 – 901.

Masimirembwa CM & Hasler JA. Characterization of praziquantel metabolism by rat liver microsomes using cytochrome P450 inhibitors. **Biochem. Pharmacol.** 1994; 48: 1779 – 1783.

Meister A & Anderson ME. Glutathione. **Annu. Rev. Biochem.** 1983; 52: 711 – 760.

Melhorn 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.

Melo OG & Coelho PMZ. *Schistosoma mansoni* e a doença. Em Neves DP. **Parasitologia Humana.** 2004, 11º ed. Atheneu, São Paulo. p. 193 – 212.

Metwally A, Bennet JL, Botros S, Ebeid F. Effect of cimetidine, bicarbonate and glucose on the bioavailability of different formulations of praziquantel. **Arzneimittelforschung.** 1995a; 45(4): 516 – 518.

Metwally A, Bennetti J, Botros S, Ebeid F, Elattar GEDM. Impact of drug dosage and brand on bioavailability and efficacy of praziquantel. **Pharmacol. Res.** 1995b; 31(1): 53-59.

Monson M. Praziquantel in acute schistosomiasis. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** 1987; 81: 777.

Montero R & Ostrosky P. Genotoxic activity of praziquantel. **Mutat. Res.** 1997; 387: 123 – 139.

Na- Bangchang K, vanijanonta S, Karbwang J. Plasma concentrations of praziquantel during therapy of neurocysticercosis with praziquantel, in the presence of antiepiletics and dexamethasone. **Southeast Asian J. Trop. Med. Public. Health.** 1995; 26: 120 – 123.

Nobre V, Silva LCS, Ribas JG, Rayes A, Serufo JC, Lana-Peixoto MA, Marinho FZ, Lambertucci JR. Schistosomal myeloradiculopathy due to *Schistosoma mansoni*: report on 23 cases. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** 2001; 96,(suppl): 137-141.

Olds GR. Administration of praziquantel to pregnant and lactating women. **Acta Trop.** 2003; 86: 185 – 195.

Ouellette M, Légaré D, Papadopoulou B. Multidrug resistance and ABC transporters in parasitic protozoa. **J. Mol. Microbiol. Biothechnol.** 2001; 3: 201 – 206.

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.

Pedro RJ, Dias LCS, Amato Neto V, Carvalho SA. Observations on the treatment of mansoni schistosomiasis with oxamniquine: efficacy in children and in persistent salmonellosis; resistance of a strain of *Schistosoma mansoni*; hepatic toxicity and neurological side effects. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo.** 1980; 22 (suppl 4): 32 – 36.

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

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

Pereira C, Fallon PG, Cornette J, Capron A, Doenhoff MJ, Pierce RJ. Alterations in cytochrome-c oxidase expression between praziquantel-resistant and susceptible strains of *Schistosoma mansoni*. **Parasitol.** 1988; 117: 63 – 73.

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.

Prata A, Lauria L, Figueiredo JFM, Senna PG. Tratamento da esquistossomose pela oxamniquine em dose única. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** 1975; 10: 127 – 136.

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

Ray WA, Holden HE, Ellis JH, Hyneck ML. A comparative study of the genetic effects of hycanthone and oxamniquine. **J. Toxicol. Environ. Health.** 1975; 1: 211 – 227.

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.

Sabah AA, Fletcher C, Webbe G, Doenhoff MJ. *Schistosoma mansoni*: reduced efficacy of chemotherapy in infected T-cell-deprived mice. **Exp. Parasitol.** 1985; 60: 348 – 354.

Sabah AA, Fletcher C, Webbe G, Doenhoff MJ. *Schistosoma mansoni*: chemotherapy of infections of different ages. **Exp. Parasitol.** 1986; 61: 294 – 303.

Sato H, Kusel JR, Thornhill J. Functional visualization of the excretory system of adult *Schistosoma mansoni* by the fluorescent marker resorufin. **Parasitol.** 2002; 125: 527-535.

Schinkel AH, Jonker JW. Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family: an overview. **Adv Drug Deliv Rev.** 2003; 55(1): 3-29.

Scringeour R & Gadjusek DC. Involvement of the central nervous system in *Schistosoma mansoni* and *Schistosoma haematobium* infection: a review. **Brain.** 1985; 108: 1023-1038.

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.

Silveira AC. Controle da esquistossomose no Brasil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** 1989; 84 (suppl 1): 91-95.

Siqueira – Batista R, Ramos junior AN, Faria EC, Farinazzo RJM, Hugins DW. Esquistossomose em sua forma crônica. Aspectos clínicos **Rev. Bras. Med.** 1997; 54: 835 – 839.

Smithers SR & Terry RJ. The infection of laboratory hosts with cercariae of *Schistosoma mansoni* and the recovery of adults worms. **Parasitol.** 1965; 55: 695 – 700.

Stavrovskaya AA. Cellular Mechanisms of multidrug resistance of tumor cells. **Biochemistry.** 2000; 65(1): 95-106.

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.

Sukhai M, Piquette Miller M. Regulation of the multidrug resistance genes by stress signals. **J. Pharmaceutic. Sci.** 2000; 3 (2): 268 – 280.

Tonelli SMAF, Goulart EMA, Tonelli E, Coelho PMZ. Lethal effect of oxamniquine and praziquantel on mice experimentally infected with *Schistosoma mansoni*. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**. 1995; 37 (4): 361 – 363.

Ullman B. Multidrug resistance and P- glycoproteins in parasitic protozoa. **J. Bioenerg. Biomembr**. 1995; 27: 77 – 84.

Warren KS. The immunopathogenesis of schistosomiasis: a multidisciplinary approach. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg**. 1972; 64: 432.

Waterman –Storer C, Duey DY, Weber KL, Keech J, Cheney RE, Salmon ED, Bement WM. Microtubules remodel actomyosin networks in *Xenopus* egg extracts via two mechanisms of actin transport. **J. Cell Biol**. 2000; 150 (224): 361 – 376.

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

William S & Botros S. Validation of sensitivity to praziquantel using *Schistosoma mansoni* worm muscle tension and CA^{2+} uptake as possible in vitro correlates to in vivo ED₅₀ determination. **Int. J. Parasitol**. 2004; 34: 971 – 977.

William S, Botro SS, Ismail M, Farghally A, Day TA, Bennett JL. Praziquantel – induced tegumental damage in vitro is diminished in schistosomes derived from praziquantel – resistant infections. **Parasitol**. 2001; 122: 63 – 66.

Wilson RA & Webster LA. Protonefridia. **Biol. Rev**. 1974; 49: 127 – 160.

Wu MH, Wei CC, Xu ZY, Yuan HC, Lian WN, Yang QJ, Chen M, Jiang QW, Wang CZ, Zhang SJ. Comparison of the therapeutic efficacy and side effects of a single dose of levo-praziquantel with mixed isomer praziquantel in 278 cases of schistosomiasis japonica. **Am. J. Trop. Med. Hyg**. 1991; 45: 345– 349.

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 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.

Zwingenberger K, Queiroz JAN, Poggensee U, Alencar JE, Valdegunas J, Esmeralda F, Feldmeire 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.