

Ministério da Saúde  
Fundação Oswaldo Cruz  
Centro de Pesquisas René Rachou  
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde

***Ação de Esquistossomicidas na Fase Inicial da Esquistossomose Experimental***

por

**Andréa Cássia Simões Vimieiro**

Belo Horizonte

Junho/ 2009

DISSERTAÇÃO MDIP-CPqRR A.C.S. VIMIEIRO 2009

Ministério da Saúde  
Fundação Oswaldo Cruz  
Centro de Pesquisas René Rachou  
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde

**Ação de Esquistossomicidas na Fase Inicial da Esquistossomose Experimental**

por

**Andréa Cássia Simões Vimieiro**

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

**Orientação: Dr. Paulo Marcos Zech Coelho**

Belo Horizonte

Junho/ 2009

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

V764a 2009	Vimieiro, Andréa Cássia Simões  Ação de esquistossomicidas na fase inicial da esquistossomose experimental/ Andréa Cássia Simões Vimieiro. – Belo Horizonte, 2009.  XIX,100: il, 210 x 297 mm. Bibliografia: f. 106 – 119 Dissertação (Mestrado) – Dissertação para obtenção do título de Mestre em Ciências pelo Programa de Pós - Graduação do em Ciências da Saúde. Área de concentração: Doenças Infeciosas e Parasitárias.  1. Esquistossomose mansoni/quimioterapia. 2. <u>Schistosoma mansoni</u> /Efeitos de drogas 3. <u>Schistosoma mansoni</u> /crescimento & desenvolvimento 4. Esquistossomicidas/Usos terapêuticos. I Título II. Coelho, Paulo Marcos Zech (Orientação).  CDD – 22. ed. – 616.963
---------------	-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

Ministério da Saúde  
Fundação Oswaldo Cruz  
Centro de Pesquisas René Rachou  
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde

***Ação de Esquistossomicidas na fase inicial da esquistossomose experimental***

por

**Andréa Cássia Simões Vimieiro**

**Foi avaliada pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:**

**Prof. Dr. Paulo Marcos Zech Coelho (Presidente)**

**Prof. Dra. Andréa Teixeira Carvalho**

**Prof. Dr. Edward Felix da Silva**

**Suplente: Prof. Dr. Stefan Michael Geiger**

Dissertação defendida e aprovada em: 30/06/2009

Dedico este trabalho a meu filho Pedro Augusto  
que me ensinou o amor mais puro e incondicional.

Meu querido esposo Douglas pelo  
companheirismo, amor e compreensão.

Aos meus amados pais Álvaro Vimieiro e Sandra  
e irmãos Juninho, Alysson e Amanda  
pelo carinho e incentivo em todos os momentos.

## **Agradecimentos**

Agradeço a Deus por colocar sempre no meu caminho grandes oportunidades, me ajudar vencer obstáculos que parecem intransponíveis, mas que se tornam apenas mais um degrau na escalada da vida.

Ao meu orientador Dr. Paulo Marcos Zech Coelho pela acolhida carinhosa em seu laboratório. Obrigada pela amizade, confiança, atenção, além de todos os ensinamentos que me enriquecem como profissional e como pessoa.

À Neusa Araújo que mais do que uma grande colaboradora neste trabalho, foi amiga, conselheira, mestra. Muito obrigada pela dedicação, por seu carinho, sua atenção e as boas horas de conversa durante as perfusões...

Ao Dr. Naftale Katz pelas sugestões que enriqueceram este trabalho.

A Cristina Toscano que logo nos primeiros experimentos me ajudou a entender o Prisma.

A Vandinha, o Àureo, Jussara e D. Vera que sempre foram muito atenciosos e prestativos. Obrigada pela amizade de vocês...

Aos meus amigos do Laboratório de esquistossomose, Ana Carolina, Rafaella, Ana Karine agradeço as sugestões, as boas conversas e todo apoio de vocês.

À Tatiane, Gardênia, Suedali e Juliano pela amizade e o bom convívio.

À Flávia pelo carinho e tempo dedicado me ajudando nas perfusões.

À Fernanda companheira de mestrado, pelo carinho e amizade.

E claro sem esquecer Clarice, Liliane, Watson, Lizandra e Ludmila que chegaram a pouco renovando a alegria do Laboratório de esquistossomose...

Obrigada a todos pelas horas agradáveis que passamos juntos!!

Ao Martin pela presteza e a grande ajuda sempre que precisei.

A Raquel e Simone, pessoas que admiro pela grande competência.

Aos funcionários do biotério: Jaci, Douglas, Wanderley, Marcílio, Moisés, Vera, pela colaboração e atenção de todos vocês.

Ao Bibliotecário Segemar pela competência e presteza sempre que foi necessário sua colaboração.

Aos demais funcionários pelo respeito e atenção que sempre me trataram.

Aos colegas do curso de Pós-graduação do CPqRR.

Ao Centro de Pesquisas René Rachou/FIOCRUZ pelo suporte técnico-científico.

À Biblioteca do CPqRR em prover acesso gratuito local e remoto à informação técnico-científica em saúde, custeada com recursos públicos federais, integrante do rol de referências desta dissertação, também pela catalogação e normalização da mesma.

A minha amiga e comadre Erica pelo carinho e incentivo, sempre.

Aos meus tios e primos pelo carinho e apoio.

A minha família sempre presente, apoiando, incentivando e sendo meu alicerce para todos os momentos.

A Sr. Rafael e D. Maria pelo apoio e incentivo.

A Rubiane pelo cuidado e carinho com meu filho.

Obrigada por compartilharem o conhecimento e a amizade. Todos que contribuíram de forma direta ou indireta são co-autores neste projeto que agora se faz real. Sou feliz por vocês existirem em minha vida!!!

E Alice perguntou ao gato:  
-Que caminho devo seguir?  
O gato respondeu:  
-Depende de onde você quer chegar...  
(Lewis Carroll)



## SUMÁRIO

<b>Lista de Figuras .....</b>	<b>XI</b>
<b>Lista de Tabelas.....</b>	<b>XII</b>
<b>Lista de Gráficos .....</b>	<b>XIII</b>
<b>Lista de Quadros.....</b>	<b>XV</b>
<b>Lista de Abreviaturas.....</b>	<b>XVI</b>
<b>Resumo .....</b>	<b>XVIII</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>XIX</b>
<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>21</b>
1.1 ESQUISTOSSOMOSE .....	21
1.2 PRAZIQUANTEL .....	27
1.3 OXAMNIQUINA .....	30
1.4 ARTESUNATO E OUTROS DERIVADOS DAS ARTEMISINA.....	32
1.5 RESISTÊNCIA À DROGAS ESQUISTOSSOMICIDAS.....	36
1.6 EFETIVIDADE DE DROGAS ESQUISTOSSOMICIDAS NO PERÍODO PRÉ-PATENTE DA ESQUISTOSSOMOSE ..	38
<b>2 OBJETIVO GERAL .....</b>	<b>45</b>
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	45
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>47</b>
3.1 PARASITOS .....	47
3.2 CAMUNDONGOS .....	47
3.3 INFECÇÃO.....	47
3.4 TRATAMENTO EXPERIMENTAL .....	48
3.5 PERFUSÃO – OBTENÇÃO DE ESQUISTOSSÔMULOS OU VERMES ADULTOS .....	48
3.6 SCHISTOGRAMA .....	49
3.7 OOGRAMA.....	51
3.8 AVALIAÇÃO DA SUSCEPTIBILIDADE DO <i>S. MANSONI</i> À DROGAS DURANTE O PERÍODO PRÉ-PATENTE DA ESQUISTOSSOMOSE EXPERIMENTAL.....	51
3.8.1 <i>Experimentos 1 e 3: Avaliação do Schistograma e contagem de vermes adultos provenientes de camundongos tratados com OXA, ART e PZQ no 15º dia de infecção</i> .....	52
3.8.2 <i>Experimentos 2 e 4: Avaliação do Schistograma e contagem de vermes adultos recuperados de camundongos tratados com OXA, ART e PZQ no 23º dia de infecção</i> .....	53
3.8.3 <i>Experimentos 5 e 6: Avaliação do Schistograma de esquistossômulos recuperados de camundongos tratados com associação ART + PZQ no 14º ou 21º dia de infecção</i> .....	55
3.9 AVALIAÇÃO DE VERMES ADULTOS RECUPERADOS APÓS EXPOSIÇÃO À DROGAS ESQUISTOSSOMICIDAS NO PERÍODO PRÉ-PATENTE.....	56
3.9.1 <i>Experimentos 7 e 8 – Contagem de vermes adultos recuperados aos 100 dias de infecção, de camundongos tratados com diferentes esquemas terapêuticos no período pré-patente</i> .....	56
3.10 EFEITOS DO TRATAMENTO “ <i>IN VIVO</i> ” COM OXA, ART E PZQ SOBRE O TEGUMENTO DE ESQUISTOSSÔMULOS DE <i>S. MANSONI</i> .....	58
3.10.1 <i>Microscopia de Fluorescência</i> .....	58
3.10.2 <i>Marcação dos parasitos com sonda fluorescente</i> .....	58
3.10.3 <i>Perfusão – Obtenção de esquistossômulos para uso nas técnicas de fluorescência</i> .....	59
3.10.4 <i>Experimentos 9 e 10 – Tratamento “in vivo” com OXA, ART e PZQ e marcação com sonda Hoechst para avaliação de dano no tegumento de vermes imaturos aos 14 e 21 dias de infecção</i> .....	60
3.11 IMAGENS FOTOGRÁFICAS .....	61
3.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	61
<b>4 RESULTADOS .....</b>	<b>64</b>
4.1 AVALIAÇÃO DA SUSCEPTIBILIDADE DO <i>S. MANSONI</i> À DROGAS DURANTE O PERÍODO PRÉ-PATENTE DA ESQUISTOSSOMOSE EXPERIMENTAL.....	64
4.1.1 <i>Experimento 1-a</i> .....	64
4.1.2 <i>Experimento 1- b</i> .....	65

4.1.3	Experimento 2- a .....	67
4.1.4	Experimento 2- b .....	68
4.1.5	Experimento 3- a .....	69
4.1.6	Experimento 3- b .....	71
4.1.7	Experimento 4- a .....	73
4.1.8	Experimento 4- b .....	75
4.1.9	Experimento 5 .....	77
4.1.10	Experimento 6 .....	79
4.2	AVALIAÇÃO DE VERMES ADULTOS RECUPERADOS APÓS EXPOSIÇÃO A DROGAS ESQUISTOSSOMICIDAS NO PERÍODO PRÉ-PATENTE .....	81
4.2.1	Experimento 7 .....	81
4.2.2	Experimento 8 .....	82
4.3	EFEITOS DO TRATAMENTO “ <i>IN VIVO</i> ” COM OXA, ART E PZQ SOBRE O TEGUMENTO DE ESQUISTOSSÔMULOS DE <i>S. MANSONI</i> .....	83
4.3.1	Experimento 9 – a .....	83
4.3.2	Experimento 9- b .....	86
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>89</b>
<b>6</b>	<b>CONSIDERAÇÕES .....</b>	<b>100</b>
<b>7</b>	<b>PERSPECTIVAS .....</b>	<b>102</b>
<b>8</b>	<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>104</b>
<b>9</b>	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>106</b>

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - REPRESENTAÇÃO DO CICLO EVOLUTIVO DO <i>S. MANSONI</i> .....	24
FIGURA 2 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DAS ETAPAS DO DESENVOLVIMENTO DOS ESQUISTOSSÔMULOS. ....	25
FIGURA 3 - ESTRUTURA QUÍMICA DO PZQ.....	27
FIGURA 4 - ESTRUTURA QUÍMICA DA OXA.....	30
FIGURA 5 - ESTRUTURA QUÍMICA DA ARTEMISINA .....	32
FIGURA 6 - ESTRUTURA QUÍMICA DO ART .....	33
FIGURA 7 - ESQUISTOSSÔMULO 1º ESTÁDIO.....	49
FIGURA 8 - ESQUISTOSSÔMULO 2º ESTÁDIO.....	50
FIGURA 9 - ESQUISTOSSÔMULO 3º ESTÁDIO.....	50
FIGURA 10 - ESQUISTOSSÔMULO 4º ESTÁDIO.....	50
FIGURA 11- ESQUISTOSSÔMULO 5º ESTÁDIO.....	51
FIGURA 12 - ESQUISTOSSÔMULOS DE 3º, 2º E 4º ESTÁDIO EVOLUTIVO.....	51
FIGURA 13 - ESTRUTURA QUÍMICA SONDA HOECHST 33258 .....	58
FIGURA 14 - VERMES RECUPERADOS DO GRUPO TRATADO COM OXA 400 MG/KG NO 15º DPI. .....	72
FIGURA 15 - VERMES RECUPERADOS DO GRUPO TRATADO COM ART 600 MG/KG NO 15º DPI. .....	73
FIGURA 16 – VERMES RECUPERADOS DO GRUPO TRATADO COM PZQ 800 MG/KG NO 15º DPI E CONTROLE NÃO TRATADO .....	73
FIGURA 17– VERMES RECUPERADOS DE GRUPOS TRATADOS COM OXA 400 MG/KG E ART 600 MG/KG.....	76
FIGURA 18 – VERMES RECUPERADOS APÓS 100 DIAS DE INFECÇÃO.....	83
FIGURA 19 – MARCAÇÃO DOS PARASITOS COM SONDA HOECHST 33258 TRATADOS NO 14º DPI E COLETADOS 2 HORAS APÓS TRATAMENTO.....	85
FIGURA 20 - MARCAÇÃO DOS PARASITOS COM SONDA HOECHST 33258 TRATADOS 21º DPI E COLETADOS 2 H APÓS TRATAMENTO. ....	87

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - DISTRIBUIÇÃO DE ESQUISTOSSÔMULOS NO SCHISTOGRAMA RECUPERADOS DE CAMUNDONGOS TRATADOS COM OXA 200 MG/KG, ART 300 MG/KG OU PZQ 400 MG/KG. ....	64
TABELA 2 - PERCENTUAL DE REDUÇÃO DE VERMES ADULTOS RECUPERADOS DE CAMUNDONGOS TRATADOS COM OXA 200 MG/KG, ART 300 MG/KG OU PZQ 400 MG/KG .....	65
TABELA 3 - DISTRIBUIÇÃO DE ESQUISTOSSÔMULOS RECUPERADOS DE CAMUNDONGOS TRATADOS COM OXA 200 MG/KG, ART 300 MG/KG OU PZQ 400 MG/KG. ....	67
TABELA 4 - PERCENTUAL DE REDUÇÃO DE VERMES ADULTOS RECUPERADOS DE CAMUNDONGOS TRATADOS COM OXA 200 MG/KG, ART 300 MG/KG OU PZQ 400 MG/KG. ....	68
TABELA 5 - DISTRIBUIÇÃO DE ESQUISTOSSÔMULOS RECUPERADOS DE CAMUNDONGOS TRATADOS COM OXA 400 MG/KG, ART 600 MG/KG OU PZQ 800 MG/KG. ....	69
TABELA 6 - PERCENTUAL DE REDUÇÃO DE VERMES ADULTOS RECUPERADOS DE CAMUNDONGOS TRATADOS COM OXA 400 MG/KG, ART 600 MG/KG OU PZQ 800 MG/KG. ....	71
TABELA 7 - DISTRIBUIÇÃO DE ESQUISTOSSÔMULOS RECUPERADOS DE CAMUNDONGOS TRATADOS COM OXA 400 MG/KG, ART 600 MG/KG OU PZQ 800 MG/KG. ....	73
TABELA 8 - PERCENTUAL DE REDUÇÃO DE VERMES ADULTOS RECUPERADOS DE CAMUNDONGOS TRATADOS COM OXA 400 MG/KG, ART 600 MG/KG OU PZQ 800 MG/KG. ....	75
TABELA 9 - DISTRIBUIÇÃO DE ESQUISTOSSÔMULOS NO SCHISTOGRAMA RECUPERADOS DE CAMUNDONGOS TRATADOS COM ART 300 OU 600 MG/KG; PZQ 400 OU 800 MG/KG; ART 300 + PZQ 400 MG/KG; E ART 600 + PZQ 800 MG/KG.....	77
TABELA 10 - DISTRIBUIÇÃO DE ESQUISTOSSÔMULOS RECUPERADOS DE CAMUNDONGOS TRATADOS COM ART 300 OU 600 MG/KG; PZQ 400 OU 800 MG/KG; ART 300 + PZQ 400 MG/KG; E ART 600 + PZQ 800 MG/KG. ....	79
TABELA 11 - NÚMERO DE VERMES VIVOS RECUPERADOS 100 DIAS APÓS A INFECÇÃO, DE CAMUNDONGOS TRATADOS COM OXA 200 MG/KG, ART 300 MG/KG E PZQ 400 MG/KG. ....	81
TABELA 12 - NÚMERO DE VERMES VIVOS RECUPERADOS 100 DIAS APÓS A INFECÇÃO, DE CAMUNDONGOS TRATADOS COM OXA 400 MG/KG, ART 600 MG/KG E PZQ 800 MG/KG. ....	82

## LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 - GRÁFICO REPRESENTATIVO DAS MÉDIAS DE VERMES IMATUROS RECUPERADOS DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS E GRUPO CONTROLE E OS RESPECTIVOS DESVIOS PADRÃO OBTIDOS NO EXPERIMENTO 1- A. ....	65
GRÁFICO 2 - GRÁFICO REPRESENTATIVO DAS MÉDIAS DE VERMES IMATUROS RECUPERADOS DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS E GRUPO CONTROLE E OS RESPECTIVOS DESVIOS PADRÃO OBTIDOS NO EXPERIMENTO 1- B. ....	66
GRÁFICO 3 - GRÁFICO REPRESENTATIVO DAS MÉDIAS DE VERMES IMATUROS RECUPERADOS DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS E GRUPO CONTROLE E OS RESPECTIVOS DESVIOS PADRÃO OBTIDOS NO EXPERIMENTO 2- A. ....	68
GRÁFICO 4 - GRÁFICO REPRESENTATIVO DAS MÉDIAS DE VERMES IMATUROS RECUPERADOS DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS E GRUPO CONTROLE E OS RESPECTIVOS DESVIOS PADRÃO OBTIDOS NO EXPERIMENTO 2- B. ....	69
GRÁFICO 5 - GRÁFICO REPRESENTATIVO DAS MÉDIAS DE VERMES IMATUROS RECUPERADOS DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS E GRUPO CONTROLE E OS RESPECTIVOS DESVIOS PADRÃO OBTIDOS NO EXPERIMENTO 3- A. ....	70
GRÁFICO 6 - GRÁFICO REPRESENTATIVO DAS MÉDIAS DE VERMES IMATUROS RECUPERADOS DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS E GRUPO CONTROLE E OS RESPECTIVOS DESVIOS PADRÃO OBTIDOS NO EXPERIMENTO 3- B. ....	72
GRÁFICO 7 - GRÁFICO REPRESENTATIVO DAS MÉDIAS DE VERMES IMATUROS RECUPERADOS DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS E GRUPO CONTROLE E OS RESPECTIVOS DESVIOS PADRÃO OBTIDOS NO EXPERIMENTO 4- A. ....	74
GRÁFICO 8 - GRÁFICO REPRESENTATIVO DAS MÉDIAS DE VERMES IMATUROS RECUPERADOS DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS E GRUPO CONTROLE E OS RESPECTIVOS DESVIOS PADRÃO OBTIDOS NO EXPERIMENTO 4. ....	76
GRÁFICO 9 - GRÁFICO REPRESENTATIVO DAS MÉDIAS DE VERMES IMATUROS RECUPERADOS DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS E GRUPO CONTROLE E OS RESPECTIVOS DESVIOS PADRÃO OBTIDOS NO EXPERIMENTO 5 PARA AVALIAÇÃO DA ASSOCIAÇÃO ART + PZQ ADMINISTRADA NO 15º DIA APÓS INFECÇÃO. ....	78
GRÁFICO 10 - GRÁFICO REPRESENTATIVO DAS MÉDIAS DE VERMES IMATUROS RECUPERADOS DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS E GRUPO CONTROLE E OS RESPECTIVOS DESVIOS PADRÃO OBTIDOS NO EXPERIMENTO 6 PARA AVALIAÇÃO DA ASSOCIAÇÃO ART + PZQ ADMINISTRADA NO 21º DIA APÓS INFECÇÃO. ....	80

GRÁFICO 11 - GRÁFICO DE BARRAS DA MÉDIA DE ESQUISTOSSÔMULOS VIVOS RECUPERADOS DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS E GRUPO CONTROLE E OS RESPECTIVOS DESVIOS PADRÃO OBTIDOS NO EXPERIMENTO 7. ....	81
GRÁFICO 12 - GRÁFICO DE BARRAS DA MÉDIA DE ESQUISTOSSÔMULOS VIVOS RECUPERADOS DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS E GRUPO CONTROLE E OS RESPECTIVOS DESVIOS PADRÃO OBTIDOS NO EXPERIMENTO 8. ....	82

## LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 - ESTIMATIVA DE PREVALÊNCIA DA ESQUISTOSSOMOSE PARA ALGUNS PAÍSES DA AMÉRICA LATINA.....	21
QUADRO 2 - ESQUEMAS TERAPÊUTICOS DOS EXPERIMENTOS 1 E 3 .....	52
QUADRO 3 - ESQUEMAS TERAPÊUTICOS DOS EXPERIMENTOS 2 E 4 .....	54
QUADRO 4 - ESQUEMAS TERAPÊUTICOS DOS EXPERIMENTOS 5 E 6 .....	55
QUADRO 5 - ESQUEMAS TERAPÊUTICOS DOS EXPERIMENTOS 7 E 8 .....	57
QUADRO 6 - ESQUEMAS TERAPÊUTICOS DOS EXPERIMENTOS 9 E 10 .....	60

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

OXA – Oxamniquina

PZQ – Praziquantel

ART – Artesunato

Dpi – days post infection - Dias após infecção

WHO – World Health Organization - Organização Mundial de Saúde

Cyt D – Cytochalasin D



## Resumo

## RESUMO

O tratamento da esquistossomose na fase postural da doença é bem estabelecido e tem como drogas disponíveis o praziquantel (PZQ) e a oxamniquina (OXA), que geralmente promovem boa resposta terapêutica. Entretanto, o *S. mansoni* apresenta diferente susceptibilidade a drogas na fase pré-postural, podendo causar falhas terapêuticas. O PZQ é pouco ativo para esquistossômulos de 2 a 4 semanas, bem como a OXA na 3ª semana de infecção. O Artesunato (ART) tem demonstrado boa atividade contra esquistossômulos. Para elucidar estas diferenças, foram avaliados quais estádios evolutivos são mais susceptíveis ao tratamento na fase pré-postural da doença através do schistograma. O tratamento com ART promoveu as maiores alterações no schistograma. Doses de 300 mg/kg ou 600 mg/kg administradas no 15º dpi diminuíram significativamente o número de vermes de 3º e 4º estádios. Dose de 300 mg/kg no 23º dpi reduziu o número de vermes do 5º e 6º e ART 600 mg/kg reduziu o número de vermes do 4º, 5º e 6º estádios. Tratamentos com ART 600 mg/kg resultaram em grande número de esquistossômulos com intestino degradado impedindo sua classificação no schistograma. Estas alterações levaram a diferenças estatisticamente significativas no número total de esquistossômulos e no percentual de redução de vermes adultos recuperados aos 42 dpi. Vale ressaltar que parte dos vermes recuperados com 100 dias de infecção, principalmente fêmeas, tratados com ART 600 mg/kg apresentavam aspecto de imaturos. Doses de OXA 200 mg/kg e 400 mg/kg administrados no 15º dpi reduziram o número de esquistossômulos do 4º estágio, enquanto o tratamento no 23º dpi de OXA 200 mg/kg reduziu o número de vermes do 6º estágio e de 5º e 6º estádios quando a dose foi de 400 mg/kg. O tratamento com OXA 400 mg/kg no 23º dpi causou diferenças estatisticamente significativas no percentual de redução de vermes adultos recuperados. Muitos vermes recuperados dos tratamentos com OXA 400 mg/kg tiveram seu desenvolvimento comprometido e estas alterações também foram observadas nos grupos recuperados 100 dpi. O schistograma de camundongos tratados com PZQ 400 mg/kg permaneceu inalterado. A dose de 800 mg/kg utilizada no 15º dpi reduziu o número de esquistossômulos do 4º estágio e no 23º dpi reduziu o número de vermes de 6º estágio. As associações ART 600 + PZQ 800 mg/kg e ART 300 + PZQ 400 mg/kg não diferiram estatisticamente do grupo tratado com ART 600 mg/kg isoladamente. Dados sugerem maior dano no tegumento de vermes tratados com OXA 400 mg/kg, ART 300 e 600 mg/kg e PZQ 800 mg/kg.

## **ABSTRACT**

The treatment of schistosomiasis during the postural phase is well established and the use of praziquantel (PZQ) and oxamniquine (OXA) shows satisfactory therapeutic efficiency. However, *S. mansoni* presents different susceptibility profiles to these drugs during the pre-patent phase, causing treatment failures.

PZQ shows little activity against 2 to 4 weeks old schistosomules, as OXA does during the 3<sup>rd</sup> week of infection. Artesunate (ART) has shown good activity against schistosomules during this period. In order to elucidate these differences, the susceptibility to treatment at various maturation stages during the pre-postural phase of the disease was evaluated, registering schistogram changes of infected mice. Treatment with ART revealed the biggest changes in the schistogram. ART doses of 300 mg/kg or 600 mg/kg administered 15 days after infection reduced significantly the number of schistosomules at 3<sup>rd</sup> and 4<sup>th</sup> stages. A dose of 300 mg/kg on the 23<sup>rd</sup> day reduced the number of worms at 5<sup>th</sup> and 6<sup>th</sup> stage and a dose of 600 mg/kg on the same day showed a reduction in the number of schistosomules at 4<sup>th</sup>, 5<sup>th</sup> and 6<sup>th</sup> stages. Treatment with ART 600 mg/kg caused gut lesions of schistosomules, impeding the staging in the schistogram. These results show statistically significant differences in the total number of schistosomules and in the percentage of the adult worm reduction obtained 42 days after infection among the treated and not treated groups. It is worth mentioning that most of the worms, especially females, examined from the group treated with 600 mg/kg ART 100 days after infection, showed immature aspect. OXA doses of 200 mg/kg or 400 mg/kg administered 15 days after infection reduced the number of schistosomules at the 4<sup>th</sup> stage. A dose of 200 mg/kg on the 23<sup>rd</sup> day reduced the number of worms at the 6<sup>th</sup> stage and a dose of 400 mg/kg on the same day showed a reduction in the number of schistosomules at the 5<sup>th</sup> and 6<sup>th</sup> stage. The treatment with OXA 400 mg/kg on the 23<sup>rd</sup> day after infection revealed a significant reduction of adult worms compared to the untreated control group. Most worms of the group treated with 400 mg/kg OXA showed abnormal development. The schistogram of mice treated with PZQ 400 mg/kg remained unchanged. The dose of 800 mg/kg administered on the 15th day after infection reduced the number of schistosomules at stage 4 and that on day 23 revealed activity at those of stage 6. Associations of ART 600 + PZQ 800 mg/kg and ART 300 + PZQ 400 mg/kg did not differ to treatment with ART 600 mg/kg alone. The data also indicate considerable damage to worm's tegument treated with OXA 400 mg/kg, ART 300 and 600 mg/kg as well as with PZQ 800 mg/kg.

## **Introdução**

# 1 Introdução

## 1.1 Esquistossomose

Cerca de 1 bilhão ou mais de pessoas no mundo são afetadas pelas doenças tropicais negligenciadas. Elas são chamadas negligenciadas por que persistem exclusivamente na pobreza e nas comunidades mais marginalizadas (WHO 2008). A esquistossomose pertence a este grupo, sendo endêmica em 76 países e territórios distribuídos pela África, Ásia e Américas (Engels et al. 2002).

Embora a distribuição da esquistossomose tenha mudado nos últimos 50 anos e tenha havido sucesso nos programas de controle, o número estimado de pessoas infectadas ou com risco de infecção não reduziu. Onde o controle tem obtido sucesso, no caso de países da Ásia e Américas, o número de infectados e o risco de infecção são bem menores, ao contrário do que ocorre na África Subsaariana (Engels et al. 2002). Segundo dados da Organização Mundial de Saúde (2007), mais de 200 milhões de pessoas estão infectadas e 650 milhões estão expostas ao risco de contrair a doença. Estima-se que 85 % do número de pessoas infectadas estão no continente Africano (Chitsulo et al. 2000).

Dados da Organização Mundial de Saúde para o ano de 2007 confirmam o Brasil como o país com a maior prevalência de esquistossomose na América Latina com mais de 6 milhões de pessoas infectadas e mais de 42 milhões de pessoas vivendo em áreas endêmicas sobre o risco de contrair a infecção (quadro 1).

Quadro 1 - estimativa de prevalência da esquistossomose para alguns países da América Latina.

País	Ano	Número estimado de pessoas infectadas	Número de pessoas vivendo em áreas endêmicas	Número reportado de pessoas tratadas
Brasil	2007	6.712.683	42.189.186	21.551
Republica Dominicana	2007	287.785	975.966	-
Suriname	2007	4.133	41.328	-
Venezuela	2007	43.078	7.188.227	-

Fonte: [http://www.who.int/neglected\\_diseases/preventive\\_chemotherapy/sch/db/index](http://www.who.int/neglected_diseases/preventive_chemotherapy/sch/db/index).

O controle da esquistossomose depende medidas de saneamento. É inquestionável a necessidade imediata de aumento de investimentos no

fornecimento de água potável e sistema de esgoto, associados às medidas de educação para a saúde e tratamento clínico em larga escala, visando uma resposta adequada para o controle da transmissão da esquistossomose (Katz, 2005).

Programas de controle baseados em quimioterapia geralmente têm obtido tanto sucesso que todas as outras ferramentas para controle têm sido marginalizadas. Subentende-se que educação em saúde nas áreas rurais onde não há acesso a água segura deveria existir (Bergquist 2008).

Almejando o controle da doença em áreas endêmicas, a OMS recomenda garantia de acesso às drogas essenciais contra a esquistossomose (e geohelmintos) nos serviços de saúde nas zonas endêmicas (WHO, 2006).

As esquistossomoses são causadas por helmintos, pertencentes à classe *Trematoda*, ao gênero *Schistosoma*, com a característica de possuírem dimorfismo sexual na fase adulta.

São cinco as espécies do gênero *Schistosoma* que apresentam interesse médico por serem capazes de infectar o homem, sendo elas: *Schistosoma haematobium* (Bilharz, 1852), *Schistosoma japonicum* (Katsurada, 1904), *Schistosoma mekongi* (Voge, Brickner e Bruce, 1978), *Schistosoma intercalatum* (Fischer, 1934) e *Schistosoma mansoni* (Sambon, 1907).

As espécies do gênero *Schistosoma* que afetam o homem chegaram as Américas durante período de tráfico de escravos e com os imigrantes orientais e asiáticos. Entretanto, apenas o *S. mansoni* conseguiu se fixar devido condições ambientais propícias e a presença de bons hospedeiros intermediários (Melo & Coelho, 2005)

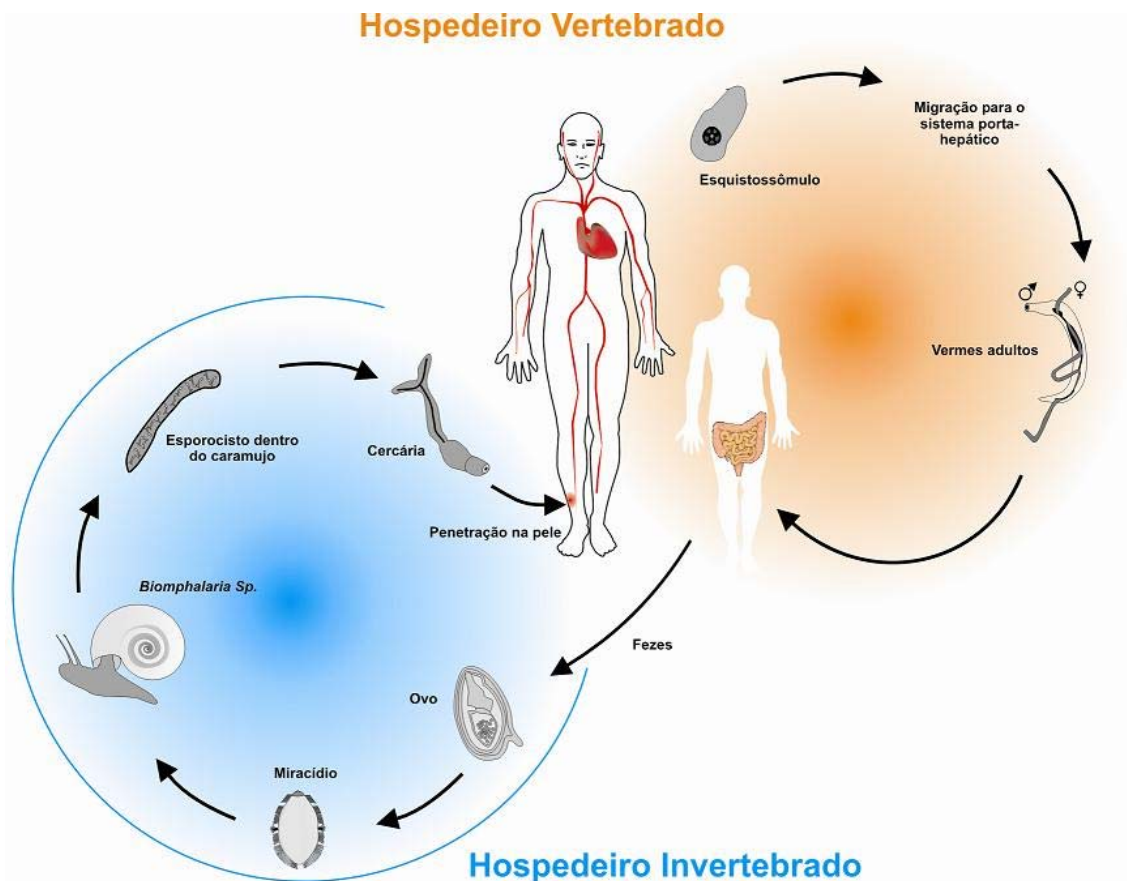
O *S. mansoni* possui morfologia diferenciada em cada fase do seu ciclo biológico que compreende estágio de ovo, miracídio, esporocisto, cercária, esquistossômulo e verme adulto (macho e fêmea). Dessa forma, o parasito que possui complexo ciclo biológico, representa uma notável interação adaptativa com seus hospedeiros intermediários e definitivos e com o ambiente natural onde o ciclo ocorre (Melo & Coelho, 2005).

Para manutenção do ciclo do parasito e seu desenvolvimento são necessários a presença de hospedeiros invertebrados que são os caramujos do gênero *Biomphalaria* e os hospedeiros vertebrados mamíferos, principalmente o homem. No Brasil já foram identificadas dez espécies pertencentes ao gênero *Biomphalaria*, sendo apenas *B. glabrata*, *B. straminea* e *B. tenagophila* encontradas eliminando cercárias na natureza (Bezerra 2005).

A contaminação fecal dos ambientes aquáticos dulcícolas é o principal componente do processo de transmissão da esquistossomose, proporcionando riscos de transmissão da infecção para pessoas que dependem diretamente dessas águas para suas atividades diárias ou mesmo para outras que as utilizam esporadicamente para diferentes atividades (Barbosa et al 2008).

Enk et al (2004) chamam atenção para o grande aumento do turismo rural em áreas endêmicas como fator de risco para infecção, especialmente de indivíduos vindos de áreas não-endêmicas para esquistossomose, que por não terem sido expostos previamente ao parasito poderiam apresentar formas mais graves da doença. Esquistossomose aguda é observada geralmente em pessoas que se infectaram durante visitas a áreas endêmicas, e parece estar relacionada a infecção intensa, podendo em alguns casos ser observada em pacientes com infecção moderada (Hiatt et al 1979).

O ciclo da esquistossomose se inicia quando ovos de *S. mansoni* atingem a água em condições favoráveis, eclodem liberando o miracídio, forma infectante para os caramujos. Nos seus hospedeiros invertebrados o *S. mansoni* desenvolve seu ciclo assexuado, que compreende complexos processos de multiplicação celular e mecanismos adaptativos. Estas divisões celulares e modificações morfológicas levam a formação de cercárias que são liberadas em coleções de água. Tal forma larvar é o agente penetrante na pele ou mucosa dos hospedeiros definitivos. Após penetração, a cercária sofre transformações bioquímicas e morfológicas que as transformam em esquistossômulos que atravessam a epiderme, atingem a derme quando invadem vasos preferencialmente venosos; os parasitos são carregados passivamente para o coração, são bombeados para os pulmões, retornam ao coração e são bombeados para circulação sistêmica. Os esquistossômulos perfazem dois ou três ciclos sistêmicos até ficarem retidos nos sinusóides hepáticos, onde se desenvolvem devido aos estímulos do soro sanguíneo portal, e amadurecem sexualmente, a partir de complexas interações moleculares entre os sexos. No sistema porta-hepático intestinal, as fêmeas maduras passam liberar ovos, que amadurecem nos tecidos do hospedeiro vertebrado e são eliminados nas fezes, dando continuidade ao ciclo biológico (Lenzi et al 2008).



Fonte: <http://bioinfo.cpqrr.fiocruz.br/files/images/ciclohisto>.

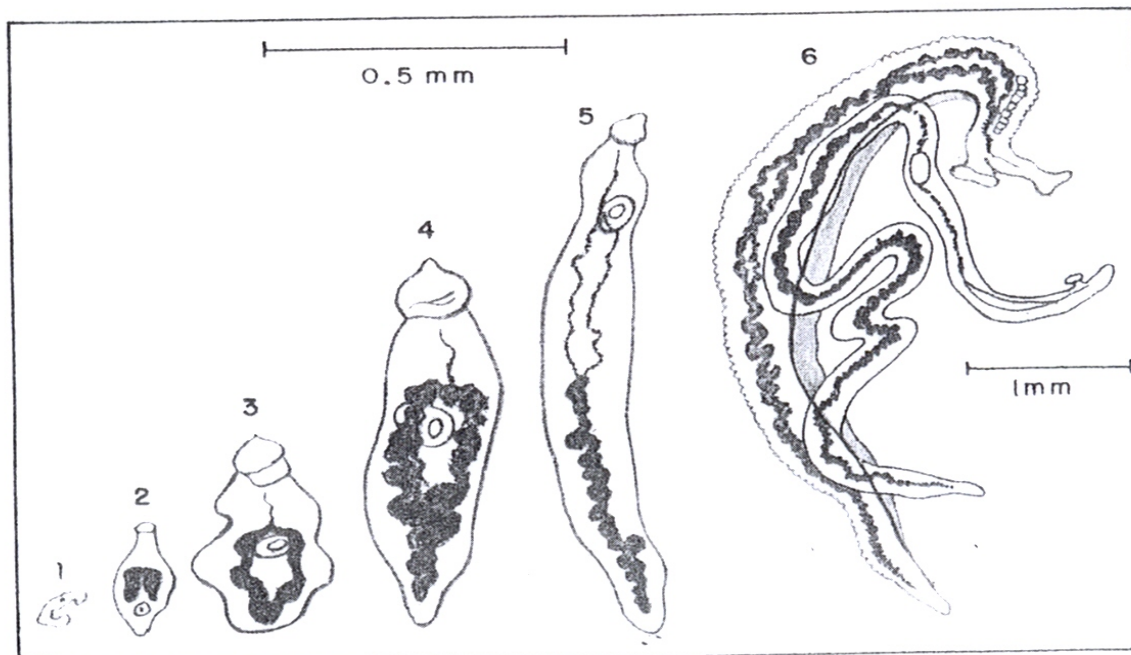
Figura 1 - Representação do ciclo evolutivo do *S. mansoni*

Sabe-se que durante o desenvolvimento de esquistossômulo até verme adulto, o *S. mansoni* passa por seis estádios evolutivos, onde há alterações morfológicas e grande crescimento corporal. Faust *et al* (1934) utilizando infecção experimental em ratos, coelhos e macacos Rhesus observou que este desenvolvimento ocorre de forma assincrônica.

Crítérios morfológicos foram criados para classificar o parasito do 1° ao 6° estágio, a saber: Esquistossômulos de estágio 1 são recém-chegados dos pulmões apresentam somente uma pequena mancha escura que representa o início do ceco. Este estágio tem uma curta duração. No estágio 2 a mancha escura agora bifurca, mas não ultrapassa o acetábulo. No estágio 3 a mancha escura bifurcada ultrapassa o acetábulo e se religa depois dele. No estágio 4 a mancha escura na porção reconectada começa crescer para extremidade do parasito, mas não é maior que sua parte bifurcada. O 5° estágio possui o final ligado do ceco maior que a parte bifurcada, mas é menor que três vezes seu tamanho final. No estágio 6 encontramos



adultos jovens e maduros. Seu ceco está completamente desenvolvido, sendo três vezes maior que no 5º estágio (Barbosa *et al* 1978).



Fonte: Barbosa *et al* 1978

Figura 2 - Representação esquemática das etapas do desenvolvimento dos esquistossômulos.

A esquistossomose mansoni é basicamente uma doença que decorre da resposta inflamatória granulomatosa que ocorre em torno dos ovos vivos do parasito (Bogliolo 1959, Warren 1968).

A doença se apresenta no homem sob uma forma aguda e duas formas crônicas, polares. Destas, uma forma é leve geralmente assintomática, atingindo a maioria absoluta dos indivíduos infectados que vivem em áreas endêmicas, sendo conhecida como forma hepatointestinal. A outra forma crônica é rara e se manifesta com hepatoesplenomegalia e outros sinais de hipertensão porta, sendo usualmente designada como forma avançada ou hepatoesplênica (Andrade & Azevedo 1987).

A fase aguda se caracteriza em alguns pacientes com manifestações clínicas de febre, prostração, diarreia e eosinofilia e uma imunopatologia exacerbada com granulomas maiores do tipo necrótico exudativo. Geralmente, surge com o início do aparecimento de ovos nas fezes e dura até 120 dias após infecção (Diaz-Rivera *et al* 1956, Ferreira *et al* 1966 ).

A forma habitual ou leve atinge a maioria absoluta dos indivíduos infectados que vivem em áreas endêmicas, eliminando ovos viáveis nas fezes, mas

assintomáticos ou com queixas vagas. Segundo Andrade (2008), a classificação de duas formas separadas, hepática e hepatointestinal, não se justificam uma vez que em qualquer infecção esquistossomática o fígado está sempre lesado e o intestino, sede da eliminação dos ovos, é geralmente pouco lesado nos casos de esquistossomose mansoni no Brasil.

Também de acordo com Andrade (2008), forma grave ou avançada da esquistossomose é caracterizada morfológicamente pela fibrose hepática periportal. Em muitos casos há sinal de hipertensão porta: esplenomegalia e circulação colateral daí a designação forma hepatoesplênica.

Os métodos de diagnóstico da esquistossomose podem ser classificados como diretos ou indiretos. Os métodos diretos detectam o parasito ou suas partes, neste grupo incluímos exames parasitológicos de fezes e biópsia retal, pesquisa de antígenos circulantes e PCR. Os métodos indiretos identificam evidências indiretas da presença do parasito que podem ser através de aspectos clínicos, propedêutica clínica, reação intradérmica e métodos sorológicos (Rabello et al 2008). O exame de amostras de fezes para detecção de ovos de acordo com a técnica de Kato-Katz (Katz et al 1972) é o método mais utilizado no mundo para diagnóstico da esquistossomose intestinal (Bergquist 2008).

O tratamento específico da esquistossomose causada pelo *S. mansoni* é prescrito somente quando a infecção é comprovada pela presença de ovos viáveis de parasitas nas fezes e/ou eventualmente nos tecidos (Enk, Katz & Coelho 2008).

A Oxamniquina (Mansil<sup>®</sup> – Pfizer S.A.) e o Praziquantel (Farmanguinhos - Fundação Oswaldo Cruz/ FIOCRUZ) são as duas drogas atualmente disponíveis para tratamento da esquistossomose no Brasil. Além de possuir custo mais acessível, o Praziquantel (PZQ) é a droga recomendada pela organização mundial de saúde para tratamento da doença (WHO, 2006).

Poucos trabalhos estão disponíveis na literatura sobre o tratamento durante a fase inicial da doença. Alguns autores demonstram que esquistossômulos são menos susceptíveis do que vermes adultos a drogas esquistossomicidas (Gonnert & Andrews 1977, Sabath et al 1986, Xiao et al 1985 e 1987, Silva et al 2003, Botros et al 2005). Este fato indica que uma falha terapêutica pode resultar quando o tratamento é feito em hospedeiros infectados ou re-infectados recentemente, em virtude dos mesmos apresentarem formas migrantes e imaturas do parasito, as quais são particularmente resistentes aos esquistossomicidas (Medeiros et al 1983, Sabah et al 1986, Utzinger et al 2000, Silva et al 2003).

Tendo em vista a necessidade de compreender melhor como os diferentes estádios de maturação do *S. mansoni* diferem na susceptibilidade a drogas, este trabalho se propõe a elucidar quais estádios são mais susceptíveis (ou resistentes) à ação dos esquistossomicidas PZQ e Oxaminiquina (OXA), utilizados há muitos anos como agentes esquistossomicidas, e ao Artesunato (ART) um derivado do grupo das Artemisininas, um grupo de drogas promissoras no tratamento da esquistossomose.

## 1.2 Praziquantel

Atualmente o PZQ é a droga de escolha para o tratamento de todas as formas clínicas da esquistossomose (Pica-Mattocia & Cioli, 2004).

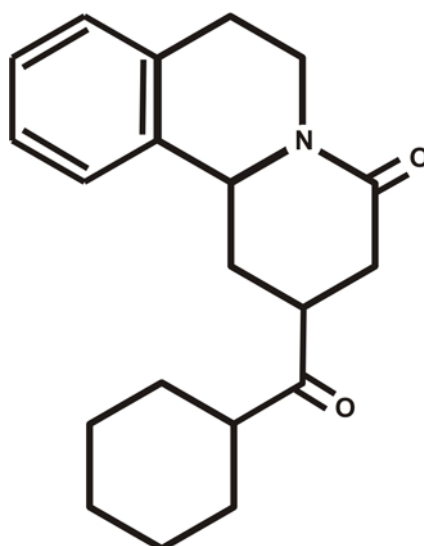


Figura 3 - Estrutura química do PZQ

È comercializado no Brasil com o nome comercial de Cestox® ou Cisticide®, sendo também produzido pela Farmanguinhos/FIOCRUZ.

A dose recomendada é de 40 mg/kg de peso para tratamento da esquistossomose mansoni (WHO 2006).

O PZQ (2-ciclo hexylcarbonyl)-1, 2, 3, 6, 7,11b-hexahidro-2H-pirazino[2,1-a]isoquinolino-4-one), é um derivado sintético da pirazina isoquinolina. È um pó branco quase cristalino, de sabor amargo, funde-se 136- 140°C. Estável em condições normais e praticamente insolúvel em água, parcialmente solúvel em etanol e solúvel em solventes orgânicos.

È rapidamente absorvido quando administrado por via oral, alcançando pico de concentração plasmática de 1-2 horas (Leopold et al 1978). Possui um extenso

metabolismo de primeira passagem no fígado, com rápido desaparecimento da circulação, e tempo de  $\frac{1}{2}$  vida geralmente de 1 a 3 horas (Pica-Mattoccia & Cioli 2004). Apresenta maior concentração plasmática quando ingerido na presença de alimentos (Mandour et al 1990). Sua eliminação é feita através da urina e fezes, sendo 80% eliminada após 24 horas (Steiner et al 1976).

Sua preparação comercial é uma mistura racêmica em partes iguais de “Levo” (-) e “Dextro” (+). Apenas o enantiômero Levo possui atividade esquistossomicida (Tanaka et al 1989, Wu et al 1991). Em estudo conduzido por Wu et al (1991) pacientes foram tratados com 20 mg/kg de levo-PZQ ou 40 mg/kg de PZQ. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os percentuais de cura, entretanto o levo-PZQ produziu menos efeitos colaterais.

A droga é igualmente eficaz contra *S. mansoni*, *S. haematobium*, *S. japonicum*, *S. intercalatum*, e *S. mattheei* sendo pouco ativo contra vermes de 2 a 4 semanas, mas é efetivo contra esquistossômulos de 5 semanas ou mais (Gönnert & Andrews, 1977), além disso, as fêmeas são mais susceptíveis a droga. Há importante correlação entre taxa de cura e intensidade de infecção antes do tratamento sendo que maiores taxas de cura são encontradas em infecção mais brandas (Utzinger et al 2000). O tratamento de camundongos na dosagem de 250 mg/kg por 5, 3, 2 dias consecutivos ou 1 dia reduz o número de parasitas em 96, 89, 75 e 75% respectivamente (Gönnert & Andrews 1977).

O mecanismo molecular detalhado da ação do PZQ ainda não é bem elucidado (Cioli 2000), embora seja usado no tratamento da esquistossomose a mais de 20 anos (Aragon et al 2009). A primeira alteração visível provocada no verme adulto exposto à droga consiste na paralisia da musculatura do verme, acompanhada e, provavelmente causada, pelo rápido influxo de cálcio no parasito (Pax et al 1978). O influxo de cálcio não é pelo transporte direto pelo PZQ, já que a droga não atua como ionóforo (Pax et al 1978). Blair et al (1992) investigaram a contração celular e paralisia flácida (perda de resposta a estímulo) de *S. mansoni* em meio contendo elevada proporção de  $Mg^{2+}$ :  $Ca^{2+}$  e concluíram que a ação do PZQ, possivelmente estava relacionada à interação com sítios específicos  $Ca^{2+}$  permeáveis. Estes sítios são os canais de Cálcio, complexas proteínas transmembrana que contribuem para propagação de impulso e regulam a entrada do íon na célula, desempenhando importante papel na homeostase. Os canais de  $Ca^{2+}$  consistem em um poro formado de subunidades  $\alpha 1$  associadas a outras subunidades que modulam sua atividade. As subunidades associadas com  $\alpha$  são

$\alpha 2/\delta$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ . As subunidades  $\beta$  dos canais de cálcio modulam a subunidade  $\alpha 1$  a fim de manter as concentrações de  $\text{Ca}^{2+}$  em equilíbrio. Segundo Kohn et al 2001, o PZQ poderia romper a interação  $\alpha 1/\beta$  culminando com a perda do efeito modulatório da subunidade  $\alpha 1$ , pela  $\beta$ . Entretanto, recentemente, Pica-Mattocchia et al (2008) realizaram estudos “in vitro”, usando cytochalasin D (cyt D) capaz de bloquear os canais de cálcio voltagem dependente e suprimir os efeitos do PZQ, e encontraram falta de correlação entre a indução do influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  promovida pelo PZQ e a morte do parasito. Nestes estudos, os vermes expostos a PZQ em meio contendo  $\text{Ca}^{2+}$  radioativo apresentaram influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  duas vezes maior que o controle, e morreram até 7º dia de incubação. Quando PZQ foi adicionado após 1 hora de incubação com cyt D, ao contrário do que se esperava, ocorreu influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  maior do que nos vermes expostos apenas ao PZQ, uma vez que a cyt D não foi capaz de impedir influxo de  $\text{Ca}^{2+}$ . Apesar desta grande entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  os parasitos sobreviveram. Nestes vermes o efluxo de  $\text{Ca}^{2+}$  foi mais rápido. Os pesquisadores também observaram grande influxo de cálcio em vermes de 28 dias expostos ao PZQ, embora estes sejam menos sensíveis aos efeitos da droga. Com estes achados os autores sugerem que apenas o acúmulo de cálcio não represente a única explicação para ação esquistossomicida do PZQ.

Também se observam alterações morfológicas no tegumento de parasitos tratados com PZQ. Há formação de bolhas na camada superficial do tegumento que pode ser desencadeado por um processo de vacuolização do lado interno para o externo na camada sincicial (Mehlhorn et al 1981). Estágios imaturos de desenvolvimento do *S. mansoni* são mais resistentes à formação de vesículas que as formas maduras do parasito, quando tratadas com PZQ (Xiao et al 1985), o que talvez esteja envolvido com a pequena sensibilidade de vermes imaturos a droga. Estas alterações morfológicas promovem um aumento da exposição de antígenos na superfície do parasito (Harnet & Kusel 1986). Células do sistema de defesa do hospedeiro se ligam aos vacúolos no tegumento e iniciam a penetração para o interior do parasito cerca de 4 horas após tratamento, em consequência ocorrem lesões e eliminação do verme (Mehlhorn et al 1981). Dessa forma a imunodependência da ação do PZQ parece estar relacionada ao dano induzido pela droga na superfície do verme, que resulta na exposição de antígenos susceptíveis ao dano por anticorpos (Doenhoff et al 1988).

Estudos revelam que o PZQ possui muito baixa toxicidade aguda em testes realizados em ratos, camundongos, coelhos e cachorros. Não apresenta efeitos

teratogênicos em camundongos, coelhos e ratos além de não apresentar sinais de potencial carcinogênico em pequenos roedores (Frohberg & Schulze 1981).

Os efeitos colaterais mais comumente relatados são dor de cabeça, náusea, anorexia, vômito, dor abdominal, dor epigástrica, diarreia com ou sem sangue e muco, tonteira, febre, mialgia, zumbido, insônia e mais raramente rash cutâneo com edema (Jaoko et al 1996). A frequência e a intensidade dos efeitos colaterais têm sido diretamente correlacionadas à intensidade da infecção (Stelma et al 1995, Pica-Mattocchia & Cioli 2004).

### 1.3 Oxamniquina

A OXA pertence a uma série de derivados 2-amino-metil-tetrahydroquinolínicos que apresentaram ação esquistossomicida marcante (Richards & Foster 1969).

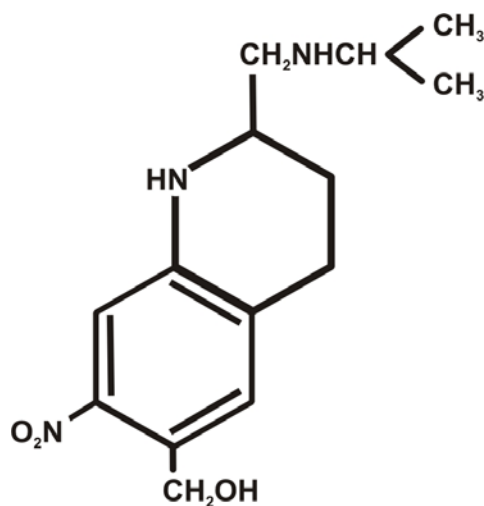


Figura 4 - Estrutura química da OXA

É uma droga de cor amarelada, pouco solúvel em água. A OXA usada na dose de aproximadamente 15 mg/kg, possui pico de concentração plasmática entre 1 e 4 horas após ingestão e o tempo de meia-vida em torno de 2,2 horas (Kokwaro & Taylor 1991, Daneshmend & Homeida 1987).

A droga é extensamente metabolizada por processos oxidativos gerando metabólitos inativos. A maior parte é excretada pela urina, apenas 0,4 a 1,9 % sendo eliminada na forma inalterada (Cioli, Pica-Mattocchia, & Acher 1995). Parâmetros farmacocinéticos da OXA não são influenciados pela gravidade da doença (Daneshmend & Homeida 1987).

Por ser um produto que necessita de uma etapa de fermentação continuam a ser fabricadas unicamente pela Pfizer, sendo comercializada no Brasil com o nome de Mansil<sup>®</sup>. A falta de concorrência manteve o alto preço dessa droga, o que nos últimos anos fez com que seu uso diminuísse muito (Katz 2005).

Ao contrário do PZQ, a OXA apresenta atividade apenas contra *S. mansoni*. Esse composto além da ação curativa em dose oral única apresenta também, atividade profilática e ação contra todos os estágios imaturos em camundongos (Foster *et al.* 1971). Vermes machos mostraram-se mais susceptíveis à droga do que as fêmeas (Foster *et al.* 1971), além disso, OXA é ativa contra todas as fases de infecção com exceção da terceira semana (Foster 1973). É eficaz no tratamento da esquistossomose aguda (Garcia *et al.* 1997).

Pellegrino *et al.* (1973) relataram que a OXA mostrou atividade acentuada na esquistossomose mansoni em camundongos, hamsters e macacos *Cebus*. Dose intramuscular única em camundongos de 100 mg/kg e em hamsters de 50 mg/kg produziu alterações do oograma de todos animais tratados e deslocamento de vermes para o fígado. Macacos *Cebus* tratados com dose única de 20-40 mg/kg intramuscular levou ao desaparecimento progressivo dos ovos e não foram encontrados vermes em perfusão realizada após 120 dias.

Ensaio clínico no Brasil mostrou que a dose única oral de 15 mg/kg para adultos e 20 mg/kg para crianças apresentou boa tolerância, poucos efeitos tóxicos e índice de cura entre 80 e 90 % em adultos e 65 a 90 % em crianças (Silva *et al.* 1974; Katz N 2008-b ).

O mecanismo de ação da OXA é razoavelmente bem conhecido (Utzinger *et al.* 2003), parece estar relacionado com a capacidade de inibição irreversível da síntese dos ácidos nucléicos nos vermes. É aceita a seguinte hipótese: a droga é ativada em um único passo, em que uma enzima do *schistosoma* converte a OXA em um éster (provavelmente acetato, fosfato, ou sulfato). Subsequentemente, o éster dissocia espontaneamente, enquanto o reagente eletrofílico resultante é capaz de realizar a alquilação do DNA do *schistosoma* (Cioli, Pica-Mattocchia, & Acher 1995). Estudos realizados por Pica-Mattocchia *et al.* (2006) avaliaram evidências que sugerem que este éster ativo é um sulfato e a enzima uma sulfotransferase. Neste estudo, substratos clássicos da sulfotransferase como beta-estradiol inibiram competitivamente a ação da OXA. Além disso, estes substratos puderam ser sulfonados *in vitro* usando extrato de schistosomas sensíveis (não resistentes). Análise em gel mostrou que o fator de ativação eluído corresponde massa molecular

de 32kDa, que é o tamanho médio típico de subunidade da sulfotransferase. Cromatografia de troca iônica e afinidade confirmaram a natureza da enzima de sulfotransferase.

Os efeitos adversos observados após administração de OXA são geralmente leves, e, frequentemente relacionados ao sistema nervoso central como vertigens, e dor de cabeça (Katz et al 1977).

Conforme Katz (2005) afirma após 13 milhões de tratamentos realizados em zonas endêmicas de esquistossomose no Brasil, a OXA é uma droga bem tolerada e com boa atividade terapêutica, para tratamento individual ou em larga escala.

#### 1.4 Artesunato e outros derivados das Artemisina

A Artemisina, uma lactona sesquiterpena ligada a um grupo peróxido, é o princípio ativo obtido das folhas de *Artemisia annua* que possui excelente propriedade antimalárica.

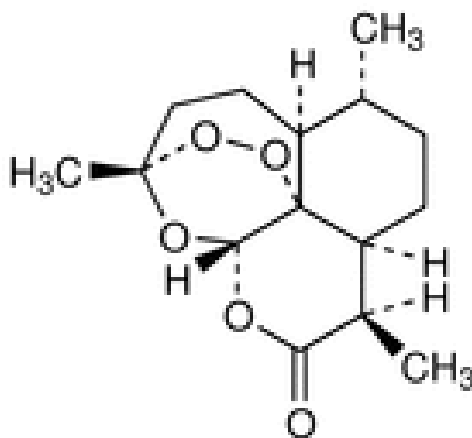


Figura 5 - Estrutura química da artemisina

Esta planta é usada há mais de 2000 anos na medicina chinesa tradicional, inicialmente para tratamento de hemorróidas e mais tarde também para tratamento de febres (Xiao 2005, Utzinger et al 2003). Foram desenvolvidos vários derivados semi-sintéticos com melhores propriedades físico-químicas e com grande atividade antimalárica (Xiao et al 2002), entre eles destacamos o ART(dihidroartemisina-10- $\alpha$ -succinato).



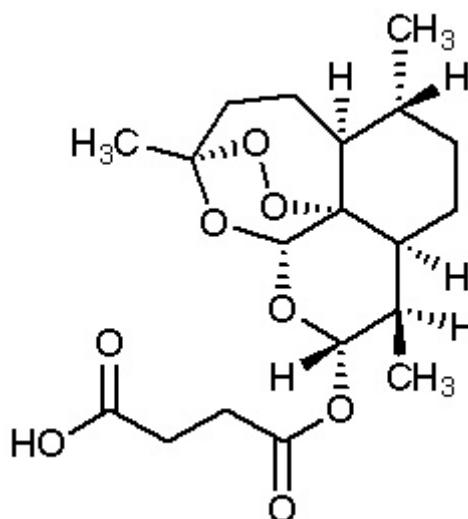


Figura 6 - Estrutura química do ART

A atividade esquistossomicida dos derivados da Artemisina foi inicialmente estudada pelos chineses a partir da década de 80 em experimentos com *S. japonicum*. Em 1983 a publicação do primeiro estudo de atividade do ART em infecção experimental por *S. japonicum* (Le et al 1983). Posteriormente, sua ação esquistossomicida também foi comprovada em *S. mansoni* (Araújo, Kohn & Katz 1991), *S. Haematobium* (Xiao et al 2002) e *S. mekongi* (Jiraungkoorskul et al 2006).

Estudos farmacocinéticos realizados Na-Bangchang et al (2002) com voluntários tailandeses sadios revelaram que o ART via oral é rapidamente biotransformado em dihidroartemisina, que é detectada na plasma em até 15 minutos após ingestão da droga. Utilizando-se a dose de 4 mg/kg de peso corporal de ART, o pico de concentração plasmática máximo foi encontrado 0,7 horas e o tempo de  $\frac{1}{2}$  vida foi de 0,74 horas. A mesma dose de dihidroartemisina (4 mg/kg peso) atingiu pico de concentração plasmática máximo em 1,5 horas e tempo de  $\frac{1}{2}$  vida em 1,2 horas, sendo que a concentração plasmática máxima de ART atingida foi maior que a obtida com dihidroartemisina, porém a exposição sistêmica foi maior com a dihidroartemisina.

Num estudo realizado com 180 pacientes revelou que o ART é uma droga bem tolerada, provocando efeitos adversos leves como náusea e cefaléia (DeClerq 2000). O ART é menos tóxico que Artemeter (Shaohong et al 2006).

Derivados de Artemisina demonstram maior atividade nas formas mais jovens de schistosoma. Utzinger et al (2002) compararam a atividade esquistossomicida de Artemeter e ART em diferentes estágios de desenvolvimento de *S. mansoni*. Quando o esquema terapêutico utilizado foi Artemeter ou Artesunato, 150 ou 300 mg/kg em três doses (7<sup>o</sup>, 21<sup>o</sup> e 35<sup>o</sup> dias de infecção) obteve-se 88-97% de redução

de vermes com Artemeter que foi significativamente maior que 67-77% alcançada com ART. Doses de 600 ou 800 mg/kg administradas 2 ou 4 dias consecutivos em camundongos infectados com vermes adultos levou a redução na recuperação de vermes de 46-51% com Artemeter contra 24-33% com ART que não diferiu estatisticamente do controle não tratado.

Estudos realizados por Lu et al (2004) para avaliar o efeito do ART na esquistossomose mansoni experimental revelaram a dosagem ótima de ART na prevenção da doença como 300 mg/kg. Os parasitos mostraram-se especialmente susceptíveis a droga na forma de esquistossômulo de 14 e 21 dias, com percentual de redução de vermes de 84% e 93% respectivamente.

A atividade esquistossomicida dos derivados de Artemisininas ainda não é bem conhecida, mas parece envolver vários mecanismos. A alteração bioquímica mais notável medida em vermes adultos recuperados de camundongos tratados com Artemeter é a redução de seu conteúdo de glicogênio (Utzinger 2001). Esta redução nos níveis de glicogênio foi parcialmente paralela ao decréscimo ao nível de glicose, que foi particularmente proeminente em fêmeas. Entretanto, a redução do nível de glicose não foi acompanhada pelo decréscimo da incorporação de glicose ao glicogênio, sugerindo que redução de glicogênio induzida pelo Artemeter foi até certo ponto mais relacionada à inibição da glicólise que a interferência com o nível de glicose.

Assim como ocorre com PZQ foram observadas lesões no tegumento com vesiculação, degeneração de estruturas sensoriais, dano na musculatura subtegumental, tecidos parênquimais, lise focal ou extensa e redução no retículo endoplasmático granular quando camundongos infectados com *S. mansoni* foram tratados com Artemeter 400 mg/kg em dose única no 21º dia após infecção (Xiao et al 2002a), bem como quando este mesmo tratamento foi realizado em infecção de sete semanas (Xiao et al 2002b).

Estudos histológicos e histoquímicos mostraram que o tratamento com Artemeter na dose de 300 mg/kg por 2 dias, em infecção experimental com *S. japonicum*, leva a vesiculação do tegumento do parasito, distensão do intestino, aparente decréscimo ou até mesmo desaparecimento do glicogênio e inibição da atividade da fosfatase alcalina no tegumento e no tecido parênquimal, bem como morte do ovo no granuloma (Xiao et al 1992).

A microscopia eletrônica revelou que o ART também causa dano principalmente no tegumento de vermes, com vesiculação e formação de rugas, há

colapso das ventosas de machos e fêmeas, e adesão de leucócitos do hospedeiro nos locais de dano do tegumento (Shaohong et al 2006).

O ART inibe a maturação sexual de fêmeas reduzindo sua fecundidade (Lu et al 2004). Estudos conduzidos por Araújo, Kohn & Katz (1999) demonstraram que camundongos infectados com *S. mansoni* e tratados 45 dias após, com ART 300 ou 500 mg/kg em dose oral única ou por cinco dias, causaram alterações no aparelho reprodutor de vermes fêmeas, diminuição do volume ovariano, rarefação dos folículos vitelínicos. Entretanto, quando os animais foram submetidos à eutanásia 60 ou 90 dias após tratamento estas alterações foram menores, mostrando que os vermes sobreviventes ao tratamento se recuperam e iniciam postura.

El-Bassiouni et al 2007 estudaram a ação do ART na defesa antioxidante de vermes imaturos e adultos e verificaram que a droga causa depleção dos níveis de glutathione (GSH) tempo-concentração dependentes, além de promover o aumento nos níveis de peroxidação lipídica tempo-concentração dependente, ambos efeitos são importantes nas formas jovens do parasito. Além disso, o ART induziu atividade da superóxido dismutase em vermes adultos, e induziu atividade de glutathione peroxidase (tGPx, nGPx) além da glutathione transferase de maneira tempo-concentração dependentes nas formas imatura e adulta do verme. Estes fatos indicam que o mecanismo de ação do ART envolve morte por processos de stress oxidativo sendo que as formas mais jovens do parasito se revelaram mais susceptíveis.

Chippaux et al (2003), questionam o uso de derivados da Artemisina em áreas co-endêmicas para malária. Os autores alertam para os riscos do uso destas drogas no tratamento da esquistossomose, pois os mesmos são realizados com dosagens insuficientes para o tratamento da malária o que poderia provocar resistência do *Plasmodium*.

A possibilidade do ART ser usado no tratamento da esquistossomose como outra opção diante do surgimento de resistência ao PZQ e OXA, associado a estas drogas ou como escolha durante o período pré-patente da doença, ou até mesmo em casos de co-infecção com malária, tornam necessários mais estudos sobre sua aplicação na esquistossomose.

## 1.5 Resistência à drogas esquistossomicidas

Atualmente o controle da esquistossomose é dependente principalmente do uso de PZQ que é uma droga segura e eficaz. Até hoje são poucas as evidências importantes de desenvolvimento de resistência, apesar de casos de baixas taxas de cura no Senegal, e o preocupante fato dos regulares e repetidos tratamentos administrados no Brasil, China e particularmente Egito, onde mais de 53 milhões de doses de PZQ já foram administradas (Fenwick et al 2003).

Coles (2002) define resistência em *Schistosoma* como sendo quando um isolado tem uma taxa de cura significativamente mais baixa do que a maioria dos isolados sensíveis. O termo resistência está relacionado com a pressão seletiva. Por outro lado, o termo tolerância deve ser usado para espécies que não respondem a uma droga onde quer que ela seja usada, assim tolerância é ausência natural de resposta a determinada droga. Dessa forma, o autor sugere que alteração da resposta a drogas antiparasitárias é devido à resistência.

Os mecanismos de escape da ação de drogas mais comuns são: diminuição na captação da droga pelo organismo, diminuição ou inativação da droga após sua entrada, alteração da formação do complexo alvo-droga, exclusão da droga para o exterior do organismo e maior eficiência do reparo do DNA. Os mecanismos de ativação da droga podem ser suprimidos ou perdidos. A interação da droga com o alvo pode ser menos efetiva devido ao aumento da competição pelo substrato ou pela interação do alvo (Lage 2005).

O primeiro relato de um percentual de cura muito baixa após tratamento com PZQ (apenas 18%) ocorreu num foco de intensa transmissão de *S. mansoni* no norte de Senegal (Stelma et al 1995). Outros estudos realizados no local confirmaram a cura de apenas 36-39% com dose de 40 mg/kg de PZQ, embora redução na contagem de ovos foi de 85%, considerada significativamente alta (Gryseels et al 1994). Tratamentos realizados nesta população com OXA 20 ou 40 mg/kg obtiveram sucesso de cura dentro do padrão esperado, sugerindo mais estudos para confirmar esta resistência ao PZQ (Stelma et al 1997). O baixo percentual de cura obtido com a droga foi associado à intensa carga parasitária, rápida re-infecção, maturação de infecções pré-patentes mais longas, resposta imune específica ainda não desenvolvida da população exposta, ou a combinação destes fatores, e dessa forma a presença de resistência ao PZQ não foi completamente confirmada (Gryseels et al 2001).

Fallon & Doenhoff (1994) demonstraram relativa resistência ao PZQ ou OXA de schistosomas sujeitos repetidamente a pressão das drogas esquistossomicidas, em laboratório. A resistência a esquistossomicidas é estável por longos períodos mesmo sem continuidade de exposição às drogas (Drescher et al 1993, Ismail et al 2002).

Lage (2005) demonstrou que a pressão seletiva com PZQ altera a estrutura genética da cepa LE de *S. mansoni* diminuindo a sua variabilidade genética.

No Brasil, Araújo et al (1996) estudaram dez isolados de *S. mansoni* derivados de pacientes de áreas endêmicas no estado da Bahia, que haviam sido tratados com OXA e PZQ mas que não tinham sido parasitologicamente curados. A resposta terapêutica *in vivo em* alguns isolados foi estatisticamente diferente, mas não o suficiente para caracterizar nenhum isolado como resistente. Bonesso-Sabadini & Souza-Dias (2002) avaliaram a susceptibilidade à OXA e PZQ, da quarta geração da cepa Ouh de *S. mansoni*, isolada em pacientes nunca tratados com esquistossomicidas. Dos diferentes esquemas terapêuticos utilizados foi identificado resistência a dose de 100 mg/kg com ambas drogas. Os autores sugerem necessidade de uma nova dose da droga no acompanhamento dos pacientes.

Coelho et al (1997) compararam a susceptibilidade da cepa LE conhecida susceptível a esquistossomicidas e a cepa R1 isolada de paciente tratado quatro vezes com OXA e uma vez com PZQ, não curado e que informou não ter contato com água contaminada durante o período de tratamento. O tratamento em camundongos com PZQ 500 mg/kg no 50º dia após infecção praticamente erradicou o parasitismo nas duas cepas. Já OXA 250 mg/kg curou todos os tratados da cepa LE, enquanto 12 dos 17 camundongos infectados com R1 apresentaram vermes vivos. Na dose de 200 mg/kg a cepa R1 obteve recuperação de 18,57% contra 1,06% da cepa LE para machos, e 61,14% contra 20,58% da cepa LE para fêmeas. Na dose de 100 mg/kg foram recuperados 29,9% de machos em R1 contra 2,26% de LE, não houve diferença estatística entre fêmeas recuperadas. Os achados sugerem resistência da cepa R1 a OXA.

Estudos realizados por Cioli et al (1992) revelaram que a resistência à OXA é controlada por um único gene autossômico recessivo. Posteriormente, associou-se esta resistência a perda de uma enzima ativadora da droga – a sulfotransferase, que está presente em *S. mansoni* sensíveis e ausentes em vermes resistentes. Possivelmente, há uma inibição irreversível na síntese de DNA e RNA nos parasitos

susceptíveis enquanto nos resistentes esta inibição ocorra de modo reversível (Cioli et al 1993).

Vários estudos são realizados na tentativa de entender os mecanismos de resistência ao PZQ, porém estas investigações são dificultadas pela ausência de uma clara compreensão dos mecanismos de ação desta droga (Redman et al 1996). Estudos realizados por Willian et al (2001) demonstraram redução no dano ao tegumento causado pelo PZQ em isolados de cepas menos susceptíveis a droga.

Na intenção de verificar se mutações nos genes que codificam as estruturas dos canais dependentes de  $Ca^{2+}$  seriam os responsáveis por resistência de algumas cepas de *S. mansoni* ao PZQ, Valle et al (2003) seqüenciaram os cDNAs que codificam as subunidades SmCavbeta1 e SmCavbeta2 de cepas sensíveis e resistentes mas não foram capazes de detectar diferenças significativas entre elas. Também não foi possível detectarem diferenças quantitativas na expressão das subunidades beta avaliando várias cepas e diferentes estágios de desenvolvimento do parasito.

Para tratar vermes resistentes ao PZQ, a única alternativa disponível atualmente é a OXA. Assim, pesquisa e desenvolvimento de novas drogas esquistosomicidas é urgentemente necessário (Cioli 2000).

### **1.6 Efetividade de drogas esquistosomicidas no período pré-patente da esquistossomose**

A resposta do *S. mansoni* ao tratamento com esquistosomicidas durante os estágios imaturos difere de acordo com a droga utilizada. Na literatura existem poucos trabalhos sobre o tratamento da esquistossomose durante o período pré-patente apesar de evidências demonstrarem que o tratamento poderia prevenir as complicações da doença.

Sabe-se que o PZQ não apresenta a mesma eficácia durante o período pré-patente da esquistossomose. Para estudar ação do PZQ nas formas juvenis de *S. mansoni*, Gönnert & Andrews (1977) trataram camundongos infectados com 100-120 cercárias, com 1000 mg/kg de PZQ 4 horas antes ou após infecção obtendo o percentual de redução de esquistosômulos de 98%. Quando a droga foi administrada do 1º ao 7º dia de infecção, o percentual de redução de esquistosômulos diminuiu de 78,5 para 69,4. Doses únicas de 1000 mg/kg

fornecidas no 14º, 21º, 28º, 35º ou 48º dias obtiveram percentual de cura de 31%, 50%, 17%, 71% e 95%, respectivamente.

Um trabalho realizado por Xiao et al (1985) sugeriu que a eficácia antiparasitária de PZQ em diferentes estágios de desenvolvimento do *S. mansoni* estaria relacionada principalmente a capacidade da droga de produzir lesão no tegumento sendo necessário dose maior da droga para produzir dano mais grave. Os vermes com lesões menos graves recuperavam seu movimento e migravam novamente para veias mesentéricas.

Estudos *in vitro* realizados por Pica-Mattoccia & Cioli (2004) demonstraram que esquistossômulos de *S. mansoni* aos 28 dias foram intensamente refratários a altas concentrações de PZQ (80 µl ml<sup>-1</sup> ou mais).

Grandière-Pèrez et al (2006) acompanharam um grupo de 18 turistas infectados por *Schistosoma haematobium*. O grupo 1 composto de 8 pacientes assintomáticos receberam PZQ 40 mg/kg por volta do 14º dia de infecção, o segundo grupo com 4 pacientes também assintomáticos, receberam o mesmo tratamento em média no 33º dia de infecção e o último grupo composto de 6 pacientes sintomáticos foram tratados em torno do 26º dia de infecção. Todos pacientes do grupo 1 desenvolveram esquistossomose aguda semelhante a apresentada pelo grupo sintomático, ao contrário do grupo 2 que não apresentou sintomas agudos. Dos 18 pacientes acompanhados, 17 desenvolveram esquistossomose crônica. Os autores concluem pela ineficácia do PZQ administrado precocemente para prevenção da fase aguda e crônica da doença.

A OXA possui eficácia maior sobre formas juvenis de *S. mansoni* comparada ao PZQ. Estudos realizados por Coelho et al (1993) revelaram eficácia da OXA 400mg/kg, em dose única oral administrada 24 horas após infecção experimental de camundongos. A recuperação dos esquistossômulos realizada 4, 24, 48, 72 horas e 35 dias após tratamento demonstrou que a migração dos esquistossômulos da pele aos pulmões foi prevenida, confirmando a eficácia da droga nesta fase da infecção.

Ainda Coelho et al (1998) testaram a eficácia da OXA 200 mg/kg no período pré-patente em duas cepas (LE e R1) sendo uma delas (R1) conhecidamente resistente na fase adulta. Tratamentos realizados em esquistossômulos de 1 e 5 dias obtiveram eficácia parcial em ambas cepas sem diferenças estatísticas entre elas. Entretanto, quando o tratamento foi realizado no 25º dia de infecção a cepa LE mostrou significativa redução na taxa de recuperação de vermes enquanto a cepa R1 foi resistente ao tratamento.

Enk, Katz & Coelho (2008) relataram caso de duas famílias infectadas em lagos contaminados, além de dois técnicos infectados acidentalmente em laboratório. Todos foram tratados com OXA dose oral única de 50 mg/kg, com exceção de uma pessoa. O tratamento preveniu o aparecimento de sinais e sintomas patognômicos da fase aguda, nenhum paciente teve complicações e ninguém apresentou ovos nas fezes 50 dias após exposição. O paciente não tratado teve a forma toxêmica da doença com febre, dor abdominal, diarreia, perda de peso e foi então tratado com OXA 20 mg/kg.

Os derivados da Artemisina têm demonstrado boa atividade no tratamento da esquistossomose, especialmente contra schistosomas imaturos (Cioli 1998). A avaliação da efetividade do ART em estádios imaturos de *S. mansoni* foi estudada por Shaohong et al (2006). Foi demonstrada atividade máxima alcançada nos tratamentos realizados entre 14<sup>o</sup>-15<sup>o</sup> e 21<sup>o</sup>-22<sup>o</sup> de infecção quando o percentual de redução de vermes foi de 93%. No estágio pulmonar (7<sup>o</sup>-8<sup>o</sup> dias após infecção) também houve redução significativa de 41%. Em jovens adultos (35<sup>o</sup>-36<sup>o</sup> dias) o percentual de redução de vermes encontrado foi de 46%.

Em estudos com Artemeter, Xiao et al (2004) encontraram como dose mínima efetiva 200 mg/kg contra esquistossômulos de *S. mansoni* com 21 dias, resultando num percentual de redução de vermes de 81%.

A associação entre drogas poderia ser uma alternativa na busca de uma droga para o tratamento efetivo da fase inicial da esquistossomose. Campos et al (1985) avaliaram os efeitos da associação OXA + PZQ no tratamento da esquistossomose mansônica aos 23 dias de infecção. Foram testados a associação OXA 50 mg/kg + PZQ 75 mg/kg, e as drogas OXA 50 mg/kg e PZQ 75 mg/kg isoladamente. Em todos os grupos houve recolhimento de vermes adultos e perfeitos, autores concluíram pela ineficácia dos tratamentos testados no período pré-patente.

Botros et al (1989) compararam o efeito da combinação de OXA e PZQ (ambas 1/3 da dose curativa) com a dose usual, dose reduzida e controle não tratado, administrados 24 horas antes da infecção, 4 horas, 1, 2, 3, 4 e 5 semanas após infecção. Animais que receberam a combinação obtiveram menores recuperações de vermes, sendo maior eficácia quando administrada 4 horas após infecção (96% redução vermes). Entretanto, valor similar foi encontrado com PZQ na dose usual (94%) e mais eficaz que dose usual da OXA (89%). A recuperação de



vermes em camundongos que receberam a combinação foi significativamente diferente em todos diferentes tempos de tratamento.

Silva et al (2003) estudaram o efeito terapêutico de OXA e PZQ durante estágios imaturos do *S. mansoni*. Durante os 20 primeiros dias de infecção a OXA apresentou baixo percentual de redução de vermes (28-34%). Entretanto, 30 dias após exposição o percentual de redução de vermes foi de 86-100%. Para o PZQ a eficácia foi de 48-52% para animais tratados até 10 dias após exposição a cercária, reduzindo para 19% no 30º dia.

Evidências sugerem que as combinações PZQ e derivados da Artemisina são promissoras (Utzinger et al 2003). O efeito da associação PZQ 75 mg/kg + Artemeter 150 mg/kg em camundongos infectados simultaneamente com esquistossômulos de 14 e 21 dias e vermes adultos de *S. mansoni* foi estudado por Utzinger et al (2001). Os tratamentos com drogas isoladas obtiveram taxa de redução de vermes de 2% para PZQ, 66 % para Artemeter e 77 % para associação quando as drogas foram administradas juntas. Quando a associação foi administrada com intervalo de 6h, 1, 3 ou 7 dias a redução variou entre 68- 81% para administração iniciando com PZQ e entre 81- 84% para administração iniciando com Artemeter. O aumento das dosagens para 100 mg/kg de PZQ e 300 mg/kg Artemeter elevou a taxa de redução de vermes a 36 e 76% para drogas isoladas respectivamente, e variou entre 92-96% para administração iniciando por PZQ e entre 95- 99% quando administração iniciou por Artemeter.

Estudos feitos por De Clercq et al (2000) mostraram que a associação PZQ 40 mg/kg (dose única) + ART 12 mg/kg (5 dias) aumentou significativamente o número de indivíduos curados na quinta semana após tratamento quando comparados as drogas isoladas, porém durante o acompanhamento dos pacientes, a contagem de ovos recuperados nas fezes na décima - segunda e vigésima – quarta semanas não diminuiu significativamente na combinação, se comparada ao tratamento com PZQ isoladamente.

Outros schistosomas também apresentam susceptibilidade diferente durante o período pré-patente. Em trabalho realizado por Botros et al (2005) utilizando hamsters infectados com *S. haematobium*, cujos primeiros ovos aparecem nas fezes em torno de 75 dias, foram tratados aos 35 dias após infecção apresentando percentual de redução de vermes de 60,6- 68,0% para doses de 150- 250 mg/kg de PZQ respectivamente. Porém o tratamento realizado aos 55 dias de infecção elevou este percentual para 97,8- 99,6%, revelando-o completamente sensível. *In vitro*

vermes jovens (28-35 dias) demonstraram susceptibilidade muito menor ao PZQ, entretanto, vermes com 49 dias ou mais a susceptibilidade não foi significativamente diferente de vermes adultos.

Em estudos realizados com camundongos infectados com *S. japonicum* o PZQ apresentou mais efetivo contra esquistossômulos tratados com dose de 400 mg/kg, 2-4 h antes da infecção com percentual de redução de vermes maior que 94%, em esquistossômulos de 28 dias e vermes adultos de 42 dias com percentuais de redução de vermes de 47,2- 84,3 %, respectivamente. Porém, eficácia muito pequena foi encontrada contra esquistossômulos de 3 a 21 dias (com percentuais de redução de vermes entre 2,5- 3,7%) (Xiao et al 1987).

Com base nestas informações podemos perceber que o estudo da susceptibilidade do parasito ao tratamento com as drogas esquistossomicidas na fase imatura do ciclo do parasito demanda certo cuidado, uma vez que as abordagens metodológicas utilizadas não foram padronizadas e, portanto resultaram em conclusões às vezes conflitantes. Mas no geral, podemos observar que estudos revelam maior resistência ao PZQ e maior susceptibilidade a OXA, principalmente no início do período pré-patente. Verifica-se ainda boa eficácia terapêutica dos derivados de Artemisina principalmente em esquistossômulos jovens, na maioria dos artigos publicados.

Em nosso trabalho propomos contribuir para elucidar quais são os estádios evolutivos dos esquistossômulos mais resistentes a ação do PZQ, OXA e ART em dois períodos críticos na resposta a drogas esquistossomicidas, em torno do 15º e 21º dia após infecção.

Para tanto foi utilizado o schistograma que consiste em contar e classificar os esquistossômulos recuperados com auxílio de microscópio estereoscópico, classificando-os por critérios morfológicos baseados no desenvolvimento do intestino sendo que as proporções de cada estágio evolutivo em todos os dias da fase pré-patente já foram bem definidas por Barbosa et al (1978). Nosso trabalho teve o objetivo de avaliar quais os estádios evolutivos durante a fase de esquistossômulos são sensíveis ao tratamento específico, observando alterações nas proporções de esquistossômulos recuperados e comparando-as com as proporções dos vermes do controle não tratado. Foram utilizadas doses maiores que as doses efetivas usadas na fase pós-postural uma vez que o *S. mansoni* é sabidamente menos susceptível ao tratamento na fase pré-postural.

A carência de informações na literatura científica sobre o comportamento do *S. mansoni* durante a fase pré-postural do ciclo justifica a realização de nosso trabalho. Dessa forma, estes esclarecimentos poderiam contribuir para novas abordagens na terapêutica experimental da esquistossomose nesta fase da infecção, considerando que a cura nesta etapa vai abortar toda a patogenia resultante da fase adulta do parasito que tem no ovo o elemento fundamental das lesões, o granuloma esquistossomótico. Enk, Katz & Coelho (2008), Coelho, Enk & Katz (inpress, 2009) enfatizam a necessidade de estudos visando estabelecer esquemas terapêuticos para a cura da esquistossomose na fase pré-postural que eliminaria as manifestações mais graves da fase pós-postural.

## **OBJETIVOS**

## **2 Objetivo Geral**

Avaliar a susceptibilidade de estádios de desenvolvimento do *S. mansoni*, na fase de esquistossômulo, frente a diferentes drogas durante a fase pré-postural da esquistossomose experimental.

### **2.1 Objetivos específicos**

- 1- Verificar qual(ais) estágio(s) de maturação do parasito, durante a fase de esquistossômulo é(são) mais ou menos susceptível(is) ao tratamento com PZQ, OXA e ao ART através de avaliação de alterações no schistograma comparando o perfil dos grupos tratados ao controle não tratado.
- 2- Verificar se o tratamento realizado no período pré-patente promove danos no parasito interferindo no seu desenvolvimento posterior.
- 3- Avaliar através da marcação com sonda fluorescente, se o tratamento realizado no período pré-patente promove danos no tegumento do parasito.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

### **3 Materiais e Métodos**

#### **3.1 Parasitos**

Foram utilizadas cercárias da cepa LE (Belo Horizonte) de *S. mansoni*, cujo ciclo é mantido rotineiramente em caramujos da espécie *Biomphalaria glabrata*, e camundongos albinos no Centro de Pesquisa René Rachou/ FIOCRUZ. O ciclo evolutivo desta linhagem está sendo mantido a mais de 35 anos no Centro de Pesquisas René Rachou.

#### **3.2 Camundongos**

Foram utilizados camundongos *Mus musculus*, albinos, sem linhagem definida, fêmeas com aproximadamente dois meses de idade, pesando cerca de 20 g, nascidos e criados no Biotério de Criação do Centro de Pesquisa René Rachou/ FIOCRUZ.

Os animais utilizados em todos os experimentos foram mantidos no biotério de experimentação, em gaiolas devidamente identificadas, alimentados com ração comercial autoclavada e água *ad libitum*.

Os procedimentos realizados com os animais foram submetidos a Comissão de Ética no Uso de Animais de Experimentação da Fundação Oswaldo Cruz (CEUA/FIOCRUZ), e aprovados com licença de nº L-019/09.

#### **3.3 Infecção**

Os camundongos foram inoculados no dorso, individualmente, por via subcutânea segundo Pellegrino & Katz (1968). A infecção foi realizada utilizando uma seringa com volume ajustável sendo que a quantidade de cercárias a serem inoculadas estava contida num volume máximo 0,5ml ou mínimo 0,2ml por camundongo.

Para permitir a avaliação de alterações na distribuição dos esquistossômulos nos vários estádios evolutivos, o número de cercárias inoculadas variou entre 50 ou 200 cercárias. Com intuito de minimizar a mortalidade dos camundongos foram inoculadas cerca de 50 cercárias nos experimentos de longa duração cujos vermes foram recuperados 100 dpi e nos outros experimentos foram inoculadas cerca de 200 cercárias.

### **3.4 Tratamento experimental**

Os camundongos foram pesados individualmente e com a média de peso obtida para cada grupo foram realizados cálculos da quantidade de droga a ser pesada através de regras de três simples.

Os comprimidos de PZQ contendo 600 mg de substância ativa (FIOCRUZ/Farmanguinhos lote nº 06122554 – validade 12/08) foram pesados individualmente e uma regra de três simples foi usada para ajustar a quantidade a ser pesada, considerando a presença dos excipientes. A seguir os comprimidos foram triturados com grau e pistilo e a dose necessária para os tratamentos foi pesada.

As cápsulas de OXA contendo 500 mg de substância ativa (Mansil<sup>®</sup> – Pifzer S.A. lote nº 60442001- validade 02/2011) foram abertas para obtenção do pó e pesadas individualmente; uma regra de três simples foi usada para ajustar a quantidade a ser pesada considerando a presença dos excipientes.

O ART disponível já na forma de pó PA (registro 27354).

As drogas foram pesadas em balança analítica (Fabricante/ modelo: Mettler/ H10). PZQ e OXA foram diluídos em água destilada e homogeneizados em vórtex. O ART foi diluído em solução de gelatina a 10% e homogeneizado em vórtex.

Os tratamentos foram administrados com auxílio de seringa de gavagem por via oral, em dose única.

As drogas e dosagens utilizadas, bem como o dia de realização do tratamento e o número de animais utilizados variou para cada experimento e está descrito detalhadamente nos tópicos relacionados aos experimentos.

### **3.5 Perfusão – Obtenção de esquistossômulos ou vermes adultos**

Nos experimentos de 1 a 8 foi empregada a técnica descrita por Pellegrino & Siqueira (1956) que resumidamente consiste em: após expor o conteúdo visceral dos camundongos que foram submetidos à eutanásia por fratura cervical; o fígado e mesentério foram separados pela ligadura da veia renal e a veia porta foi seccionada. Com auxílio de uma agulha, acoplada a um pipetador automático (Brewer), injetou-se solução salina 0,85% heparinizada na aorta descendente permitindo, assim, a perfusão do sistema porta e das veias mesentéricas, recuperando-se os vermes presentes.



Para recuperar vermes adultos, o líquido coletado da perfusão foi filtrado em tela plástica para placas de Petri e posterior contagem com auxílio de microscópio estereoscópio.

No caso de obtenção de esquistossômulos foi utilizada a técnica de separação descrita por Barbosa et al (1978) com adaptações. O líquido coletado da perfusão em copos foi sedimentado por quinze minutos e então eliminado todo sobrenadante deixando cerca de 35ml, que foram transferidos para tubos falcon de 40 ml e ficando novamente 15 minutos para sedimentação. Em seguida todo sobrenadante foi eliminado e os 15 ml restantes transferidos para tubos tipo falcon de 15 ml e centrifugados a 1000 rpm durante 2 minutos. Foi eliminado o sobrenadante e aos 3 ml restantes foi adicionado solução salina a 0,85%. O procedimento foi repetido 3 vezes e somente o sedimento ressuspensão em 3 ml foi colocado em placa de petri para realização do schistograma.

### 3.6 Schistograma

O schistograma consiste em contar e classificar os esquistossômulos recuperados com auxílio de microscópio estereoscópio. Critérios morfológicos são usados para classificar o parasito em relação ao seu estágio, sendo estes baseados no desenvolvimento do intestino do parasito após ingestão de sangue (Barbosa et al, 1978). O esquema representativo dos estádios evolutivos de esquistossômulos de *S. mansoni* podem ser visualizados na fig. 2 pag. 22.

A classificação seguiu os critérios:

- Esquistossômulos de estágio 1 são recém-chegados dos pulmões apresentam somente uma pequena mancha escura que representa o início do ceco. Este estágio tem uma curta duração.

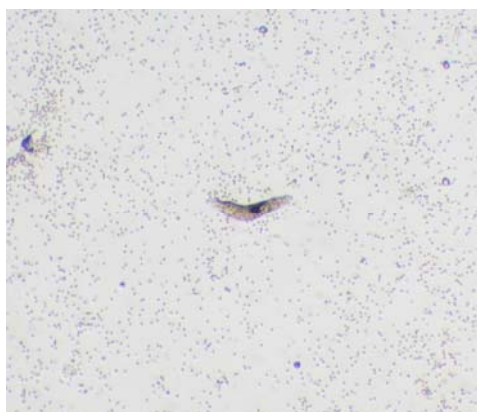


Figura 7 - esquistossômulo 1º estágio

- No estágio 2 a mancha escura agora bifurca, mas não ultrapassa o acetábulo.

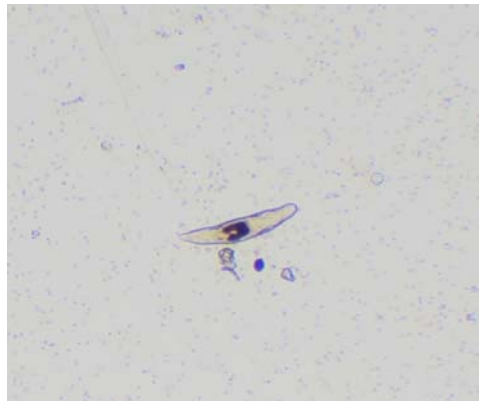


Figura 8 - esquistossômulo 2º estágio

- No estágio 3 a mancha escura bifurcada ultrapassa o acetábulo e se religa depois dele.



Figura 9 - esquistossômulo 3º estágio

- No estágio 4 a mancha escura na porção reconectada começa crescer para extremidade do parasito, mas não é maior que sua parte bifurcada.



Figura 10 - esquistossômulo 4º estágio

- O 5º estágio possui o final ligado do ceco maior que a parte bifurcada, mas é menor que três vezes seu tamanho final.



Figura 11- esquistossômulo 5º estágio

- No estágio 6 encontramos adultos jovens e maduros. Seu ceco está completamente desenvolvido, sendo três vezes maior que no 5º estágio (Barbosa *et al* 1978).

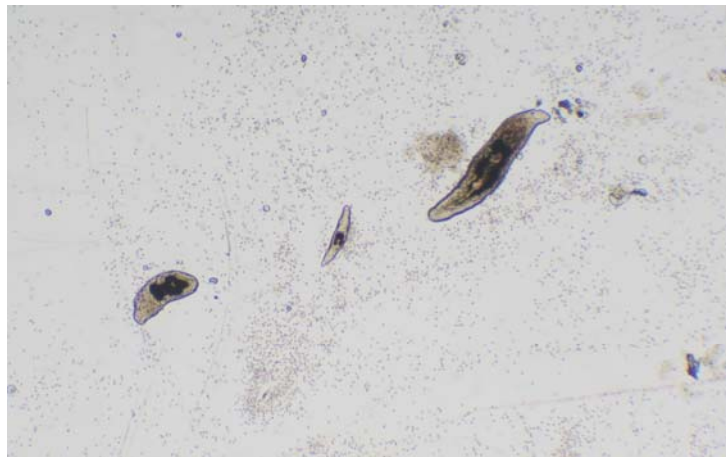


Figura 12 - esquistossômulos de 3º, 2º e 4º estágio evolutivo.

### 3.7 Oograma

A técnica consiste em remover fragmentos do intestino (íleo terminal) após a perfusão de cada animal, lavagem dos fragmentos com salina 0,85% para retirada das fezes. Esses fragmentos são colocados em uma lâmina de vidro e uma lamínula de plástico. A preparação é pressionada em uma prensa de ferro. As lâminas então são levadas ao microscópio a fim de se verificar a presença de estádios de desenvolvimento dos ovos em cada grupo.

### 3.8 Avaliação da susceptibilidade do *S. mansoni* à drogas durante o período pré-patente da esquistossomose experimental

Para verificar como ocorrem as diferenças na susceptibilidade do *S. mansoni* as drogas durante a fase pré-postural da esquistossomose, foi executado o modelo experimental proposto que está descrito a seguir.

### 3.8.1 Experimentos 1 e 3: Avaliação do Schistograma e contagem de vermes adultos provenientes de camundongos tratados com OXA, ART e PZQ no 15º dia de infecção

Em cada um destes experimentos foram infectados subcutaneamente 100 camundongos fêmeas, pesando cerca de 20 gramas, com cerca de 200 cercárias da cepa LE.

Quinze dias após infecção os animais foram divididos em 4 grupos de 25 animais cada, devidamente identificados. Os animais receberam tratamento via oral individualmente e em dose única. Os seguintes esquemas terapêuticos foram administrados:

Experimento 1: 200 mg/kg de OXA; 300 mg/kg de ART e 400 mg/kg de PZQ.

Experimento 3: 400 mg/kg de OXA; 600 mg/kg de ART e 800 mg/kg de PZQ.

Em cada experimento um grupo não recebeu tratamento e foi mantido como controle positivo de infecção.

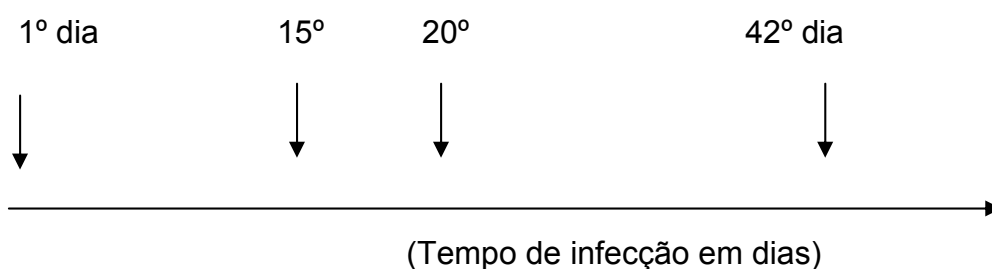
Quadro 2 - Esquemas terapêuticos dos experimentos 1 e 3

	Grupo	Nº animais	Dia do tratamento	Tratamento
<b>Experimento 1</b>	A	25	15º dpi	OXA 200 mg/kg
	B	25	15º dpi	ART 300 mg/kg
	C	25	15º dpi	PZQ 400 mg/kg
	D	25	-	Controle não tratado
<b>Experimento 3</b>	A	25	15º dpi	OXA 400 mg/kg
	B	25	15º dpi	ART 600 mg/kg
	C	25	15º dpi	PZQ 800 mg/kg
	D	25	-	Controle não tratado

No vigésimo dia após infecção (quinto dia após tratamento), metade dos camundongos de cada grupo foi submetido à eutanásia e realizada a perfusão do sistema porta (Pellegrino & Siqueira, 1956) a fim de recuperar os esquistossômulos.

No quadragésimo segundo dia após infecção (e vigésimo sétimo dia após tratamento), o restante dos camundongos foram perfundidos (Pellegrino & Siqueira, 1956) para recuperação de vermes adultos.

Os experimentos 1 e 3 acompanharam a seguinte cronologia:



- 1º dia infecção experimental
- 15º dpi realização dos tratamentos.
- 20º dpi realização de perfusão para coleta de esquistossômulos e avaliação de schistograma.
- 42º dpi perfusão para recuperação de vermes adultos.

### **3.8.2 Experimentos 2 e 4: Avaliação do Schistograma e contagem de vermes adultos recuperados de camundongos tratados com OXA, ART e PZQ no 23º dia de infecção**

Para cada um destes experimentos também foram infectados subcutaneamente 100 camundongos fêmeas pesando cerca de 20 gramas, com cerca de 200 cercárias da cepa LE.

Os procedimentos realizados nos experimentos 2 e 4 foram idênticos aos realizados nos experimentos 1 e 3 diferenciando apenas o dia de realização do tratamento. Os esquemas terapêuticos estão no quadro 2:

Experimento 2: 200 mg/kg de OXA; 300 mg/kg de ART e 400 mg/kg de PZQ.

Experimento 4: 400 mg/kg de OXA; 600 mg/kg de ART e 800 mg/kg de PZQ.

Em cada experimento um grupo não recebeu tratamento e foi mantido como controle positivo de infecção.

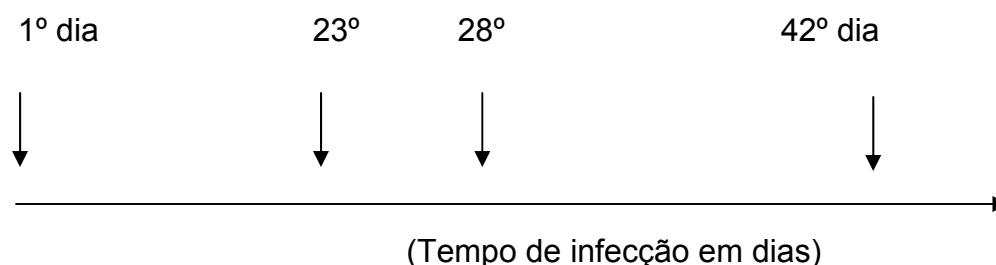
Quadro 3 - Esquemas terapêuticos dos experimentos 2 e 4

	Grupo	Nº animais	Dia do tratamento	Tratamento
<b>Experimento 2</b>	A	25	23º dpi	OXA 200 mg/kg
	B	25	23º dpi	ART 300 mg/kg
	C	25	23º dpi	PZQ 400 mg/kg
	D	25	-	Controle não tratado
<b>Experimento 4</b>	A	25	23º dpi	OXA400 mg/kg
	B	25	23º dpi	ART 600 mg/kg
	C	25	23º dpi	PZQ 800 mg/kg
	D	25	-	Controle não tratado

No vigésimo-oitavo dia de infecção (quinto dia após tratamento), metade dos camundongos de cada grupo experimental foi submetida à eutanásia para perfusão do sistema porta, a fim de recuperar os esquistossômulos, em seguida foi realizada a avaliação do schistograma.

No quadragésimo-segundo dia após infecção (décimo-nono dia após tratamento), o restante dos camundongos foram perfundidos, para contagem de vermes adultos recuperados.

Os experimentos 2 e 4 acompanharam a seguinte cronologia:



- 1º dia infecção experimental
- 23º dpi realização dos tratamentos.
- 28º dpi realização de perfusão para coleta de esquistossômulos e avaliação de schistograma.
- 42º dpi perfusão para recuperação de vermes adultos.

### 3.8.3 Experimentos 5 e 6: Avaliação do Schistograma de esquistossômulos recuperados de camundongos tratados com associação ART + PZQ no 14º ou 21º dia de infecção

Em cada um destes experimentos foram infectados subcutaneamente 80 camundongos fêmeas pesando cerca de 20 gramas, com cerca de 200 cercárias da cepa LE.

Os animais foram divididos em 7 grupos, devidamente identificados recebendo tratamento via oral e em dose única. Os seguintes esquemas terapêuticos foram administrados no 14º ou 21º dia após infecção:

Quadro 4 - Esquemas terapêuticos dos experimentos 5 e 6

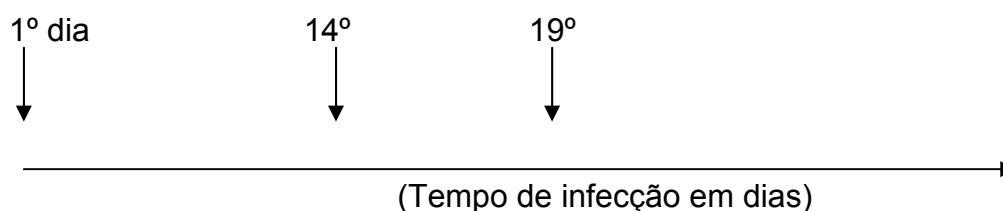
	<b>Grupo</b>	<b>Nº animais</b>	<b>Dia do tratamento</b>	<b>Tratamento</b>
<b>Experimento 5</b>	A	11	14º dpi	PZQ 400 mg/kg
	B	11	14º dpi	PZQ 800 mg/kg
	C	11	14º dpi	ART 300 mg/kg
	D	11	14º dpi	ART 600 mg/kg
	E	12	14º dpi	PZQ 400 + ART 300
	F	12	14º dpi	PZQ 800 + ART 600
	G	12	-	Controle não tratado
<b>Experimento 6</b>	<b>Grupo</b>	<b>Nº animais</b>	<b>Dia do tratamento</b>	<b>Tratamento</b>
	A	11	21º dpi	PZQ 400 mg/kg
	B	11	21º dpi	PZQ 800 mg/kg
	C	11	21º dpi	ART 300 mg/kg
	D	11	21º dpi	ART 600 mg/kg
	E	12	21º dpi	PZQ 400 + ART 300
	F	12	21º dpi	PZQ 800 + ART 600
G	12	-	Controle não tratado	

Em cada experimento um grupo não recebeu tratamento e foi mantido como controle positivo de infecção.

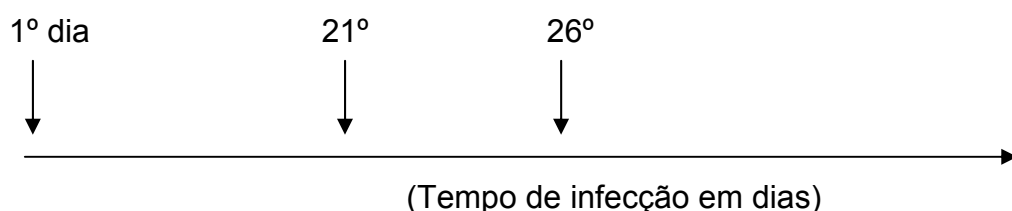
No quinto dia após tratamento (correspondente ao décimo-nono dia após infecção no experimento 5 e vigésimo-sexto dia após infecção no experimento 6) foi realizada a perfusão do sistema porta a fim de recuperar os esquistossômulos, em seguida foi realizada a avaliação do schistograma.

Os experimentos 5 e 6 acompanharam a seguinte cronologia:

#### Experimento 5



#### Experimento 6



- 1º dia infecção experimental
- 14º ou 21º dpi realização dos tratamentos.
- 19º ou 26º dpi após tratamento realização de perfusão para coleta de esquistossômulos e avaliação de schistograma.

### **3.9 Avaliação de vermes adultos recuperados após exposição à drogas esquistossomicidas no período pré-patente**

#### **3.9.1 Experimentos 7 e 8 – Contagem de vermes adultos recuperados aos 100 dias de infecção, de camundongos tratados com diferentes esquemas terapêuticos no período pré-patente**

Os procedimentos realizados nos 7º e 8º experimentos foram semelhantes, variando a dose utilizada de cada medicamento. Para realização de cada um destes experimentos foram infectados subcutaneamente 105 camundongos fêmeas pesando cerca de 20 gramas, com cerca de 50 cercárias da cepa LE. Quatorze dias após infecção foram separados 45 animais (para cada experimento) e divididos em 3 grupos de 15 animais cada, devidamente identificados. Os animais receberam tratamento via oral individualmente e em dose única conforme os esquemas terapêuticos:

Experimento 7: 200 mg/kg de Oxaminiquina; 300 mg/kg de Artesunato e 400 mg/kg de Praziquantel.



Experimento 8: 400 mg/kg de Oxaminiquina; 600 mg/kg de Artesunato e 800 mg/kg de Praziquantel.

Quadro 5 - Esquemas terapêuticos dos experimentos 7 e 8

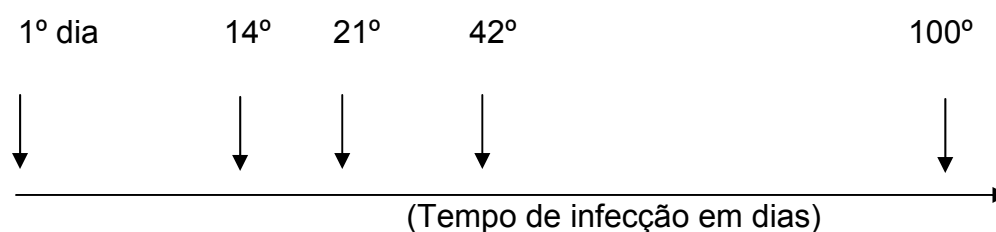
Experimentos 7 e 8				
Grupo	Nº animais	Dia do tratamento	Tratamento exp. 7	Tratamento exp. 8
A	15	14º dpi	OXA 200 mg/kg	OXA 400 mg/kg
B	15	14º dpi	ART 300 mg/kg	ART 600 mg/kg
C	15	14º dpi	PZQ 400mg/kg	PZQ 800mg/kg
D	15	21º dpi	OXA 200mg/kg	OXA 400 mg/kg
E	15	21º dpi	ART 300 mg/kg	ART 600 mg/kg
F	15	21º dpi	PZQ 400mg/kg	PZQ 800mg/kg
G	15	-	Controle não tratado	Controle não tratado

No quadragésimo-segundo dia após infecção, os camundongos do grupo controle foram perfundidos para contagem de vermes adultos recuperados. A perfusão antecipada do controle não tratado foi necessária para minimizar o sofrimento dos camundongos, que estavam infectados com cerca de 50 cercárias, e evitar perda destes camundongos nestes experimentos de longa duração.

Os camundongos tratados foram submetidos à eutanásia por fratura cervical e perfundidos cem dias após infecção (correspondente ao octogésimo-sexto dia após tratamento no experimento 7 e septuagésimo-nono dia após tratamento no experimento 8) para contagem de vermes adultos recuperados.

Os fígados dos camundongos foram esmagados entre duas placas de vidro e observados quanto à presença de vermes mortos. Também foi realizada a técnica do oograma.

Os experimentos 7 e 8 acompanharam a seguinte cronologia:



- 1º dia infecção experimental
- 14º ou 21º dpi realização dos tratamentos.

- 42º dpi realização de perfusão dos grupos controle para coleta e contagem de vermes adultos, avaliação de vermes mortos no fígado e realização do oograma.
- 100º dpi perfusão dos grupos tratados para coleta e contagem de vermes adultos, avaliação de vermes mortos no fígado e realização do oograma.

### 3.10 Efeitos do tratamento “*in vivo*” com OXA, ART e PZQ sobre o tegumento de esquistossômulos de *S. mansoni*

#### 3.10.1 Microscopia de Fluorescência

A fluorescência é um tipo de luminescência (emissão de luz) em que um corpo absorve luz e após um curto intervalo de tempo re-emite essa luz.

Dependendo da fonte de energia, a luminescência pode ser do tipo eletroluminescência, radioluminescência, quimioluminescência ou fotoluminescência, onde a última, que é utilizada na microscopia de fluorescência, ocorre quando a fonte de energia são fótons.

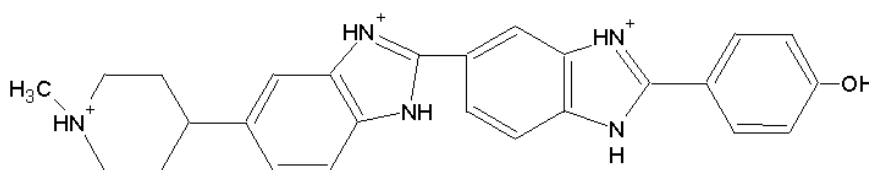
Os compostos químicos chamados fluoróforos ou sondas fluorescentes são usados para produzir a fluorescência do material em estudo, permitindo visualização de estruturas, compostos ou processos em curso.

#### 3.10.2 Marcação dos parasitos com sonda fluorescente

Para avaliar se OXA, ART e PZQ promovem danos no tegumento de esquistossômulos expostos as drogas no 14º e 21º dia de infecção, foram realizados experimentos utilizando microscopia de fluorescência e como marcador de fluorescência a sonda Hoechst 33258.

#### Hoechst 33258

É conhecido que a sonda Hoechst 33258 (fig. 13) possui a propriedade de se ligar ao DNA.



[http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/2/2b/Hoechst\\_33258\\_Structure.gif&imgrefurl](http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/2/2b/Hoechst_33258_Structure.gif&imgrefurl)

Figura 13 - Estrutura química sonda Hoechst 33258

Entretanto, por se tratar de uma molécula hidrofílica só é capaz de se difundir para o interior das células na presença de lesões e portanto pode ser usada como indicador da integridade de membrana (Oliveira 2005).

Nestes experimentos foram observados presença ou não de dano na membrana de esquistossômulos tratados com OXA, ART ou PZQ , através da fluorescência emitida pela sonda Hoechst 33258 quando esta foi capaz de se ligar ao DNA. A fluorescência dos esquistossômulos submetidos à ação das drogas foi comparada qualitativamente a observada em esquistossômulos recuperados de grupos controle não tratados.

Hoechst 33258 produzida por Sigma Chemical Co.St. Louis, MO, USA. Pó diluído em água destilada para solução estoque de 10 mg/mL.

### **3.10.3 Perfusão – Obtenção de esquistossômulos para uso nas técnicas de fluorescência**

Foi empregada a técnica de perfusão retrógrada do fígado descrita por Smithers & Terry (1965), resumidamente: os camundongos foram submetidos à eutanásia por “*overdose*” de pentobarbital sódico 3% (Hypnol<sup>®</sup>), administrado por via intraperitoneal ( $\pm$  0,3mL). Posteriormente, as vísceras abdominais e o coração foram expostos, a veia porta foi seccionada com o auxílio de uma agulha conectada a uma seringa de 10mL. Imediatamente, na parte inferior dos ventrículos do coração, foi injetado meio de cultura RPMI – 1640, pH 7,4 heparinizado, obtendo-se assim, os parasitos que foram coletados em cálices de sedimentação. Para separação dos esquistossômulos, o líquido coletado foi sedimentado por quinze minutos, retirado o sobrenadante e transferidos os 15 ml restantes para tubos tipo falcon. Os tubos foram centrifugados a 1000 rpm por 1 minuto, o sobrenadante foi coletado e aos 3 ml restantes foi adicionado meio de cultura RPMI – 1640. O procedimento foi repetido 4 vezes. A última lavagem foi realizada com meio de cultura RPMI – 1640 acrescido de 5% de soro fetal bovino (SFB).

RPMI – 1640 produzido por Sigma- Aldrich Chemical Co.St Louis, MO, USA. Pó diluído em água destilada e pH ajustado para 7,2. Lote 026K83582.

### 3.10.4 Experimentos 9 e 10 – Tratamento “*in vivo*” com OXA, ART e PZQ e marcação com sonda Hoechst para avaliação de dano no tegumento de vermes imaturos aos 14 e 21 dias de infecção

Os procedimentos realizados nos experimentos 9 e 10 foram idênticos, distinguindo-se apenas o dia de realização dos mesmos após infecção e por isso serão descritos conjuntamente.

Para cada experimento foram utilizados quatorze camundongos infectados a 14 ou 21 dias, com cerca de 200 cercárias de *S. mansoni* e foram divididos em sete grupos que receberam tratamento conforme quadro a seguir.

Quadro 6 - Esquemas terapêuticos dos experimentos 9 e 10

Experimento 9	Grupo	Nº de animais	Dia do tratamento	Droga/Dosagem
	A	2	14°	OXA 200 mg/kg
	B	2	14°	OXA 400 mg/kg
	C	2	14°	ART 300 mg/kg
	D	2	14°	ART 600 mg/kg
	E	2	14°	PZQ 400 mg/kg
	F	2	14°	PZQ 800 mg/kg
	G	2	--	Controle não tratado
Experimento 10	Grupo	Nº de animais	Dia do tratamento	Droga/Dosagem
	A	2	21°	OXA 200 mg/kg
	B	2	21°	OXA 400 mg/kg
	C	2	21°	ART 300 mg/kg
	D	2	21°	ART 600 mg/kg
	E	2	21°	PZQ 400 mg/kg
	F	2	21°	PZQ 800 mg/kg
	G	2	--	Controle não tratado

Os esquistossômulos recuperados após perfusão retrógrada foram mantidos em 1mL de meio de cultura RPMI – 1640 acrescido de 5% de SFB onde acrescentou-se 5µL da sonda Hoechst 33258 (solução estoque 10mg/mL) e os vermes foram incubados por 60 minutos em estufa 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Os vermes foram lavados por cinco vezes com meio de cultura sendo mantidos por 15 minutos para sedimentação entre cada troca de meio de cultura. Finalmente foram

transferidos para lâminas delimitadas com vaselina para evitar o extravasamento dos vermes e levados para observação em microscópio de fluorescência (K- Zeiss) utilizando-se de filtro com DAPI - excitação/emissão máxima da Hoechst 33258 352/455 nm.

### **3.11 Imagens fotográficas**

Imagens registradas com máquina fotográfica digital Cannon Rebel modelo EOS 300D.

### **3.12 Análise estatística**

A princípio foi verificado se os dados eram paramétricos ou não paramétricos através testes de normalidade em todos os resultados obtidos. Logo após esta análise era feita a opção pelo teste estatístico mais adequado.

Quando os dados se apresentavam paramétricos, eram aplicados testes de análise de variância- ANOVA seguida das comparações múltiplas de Tukey com o objetivo de comparar os resultados dos grupos controles e cada um dos grupos tratados. Também foram comparadas a eficácia dos grupos tratados entre si.

Para dados não paramétricos foram aplicados os testes de Kruskal Wallis, seguido das comparações múltiplas de Dunn's para comparar os resultados dos grupos controles e cada um dos grupos tratados. Também foram comparadas a eficácia dos grupos tratados entre si.

Todas as análises deste estudo foram realizadas com 5% de significância, utilizando-se o programa estatístico PRISMA 4.2. Testes de normalidade foram realizados no programa MINITAB.

**Os resultados dos experimentos 1 a 5 serão apresentados em duas partes:**

**A- Distribuição média de vermes no schistograma após diferentes esquemas terapêuticos.**

A avaliação do schistograma foi realizada através da observação e contagem de esquistossômulos, seguida da média vermes recuperados em cada estágio evolutivo para cada grupo de tratamento comparado com controle não tratado e posteriormente entre os diferentes grupos de tratamento.

**B- Total de vermes adultos recuperados e percentuais de redução de vermes após diferentes esquemas terapêuticos.**

O percentual de redução de vermes adultos recuperados foi calculado de acordo com a fórmula:

$$\%RV = 100 - \frac{VT \times 100}{VC}$$

Onde %RV é percentual de redução de vermes, VT é o número de vermes recuperado no grupo tratado e VC é o número de vermes recuperados no grupo controle não tratado.

## RESULTADOS

## 4 Resultados

### 4.1 Avaliação da susceptibilidade do *S. mansoni* à drogas durante o período pré-patente da esquistossomose experimental

#### 4.1.1 Experimento 1-a

Tabela 1 - Distribuição de esquistossômulos no schistograma recuperados de camundongos tratados com OXA 200 mg/kg, ART 300 mg/kg ou PZQ 400 mg/kg. Tratamento realizado no 15º dia após infecção com cerca de 200 cercárias e submetidos à eutanásia no 20º dia de infecção (5 dias após tratamento).

Grupos de tratamento	Número de animais		Média de Vermes	Distribuição média de vermes por estágio evolutivo (nº absolutos)							Total
	Tratados	Examinados		1	2	3	4	5	6	NI.	
Controle	13	12	29,1	0,9(11)	2,1(25)	7,7(92)	17,2(206)	0,1(1)	0(0)	1,2(14)	349
OXA 200 mg/kg	13	13	12,5*	0,1(1)	1,5(20)	4,6(60)	6,2(81)**	0(0)	0(0)	0,1(1)	163**
ART 300 mg/kg	13	13	10*	0,4(5)	0,9(11)	1,1 (14)***	5,8(75) **	0,2(3)	0(0)	1,7(0)	130***
PZQ 400 mg/kg	13	13	16,5	0,2(2)	1,0(13)	4,0(52)	11,2(145)	0,2(2)	0(0)	0,1(1)	215

NI. -Esquistossômulo não identificado

Diferença em relação ao controle não tratado \*  $p < 0,05$  \*\*  $p < 0,01$  \*\*\*  $p < 0,001$

Os vermes imaturos que possuíam o intestino deteriorado e não permitiram sua classificação por estágio evolutivo foram classificados como NI, ou seja, esquistossômulo não identificado. Neste experimento não houve diferença estatisticamente significativa entre média de esquistossômulos NI dos grupos tratados entre si ou em relação ao controle não tratado.

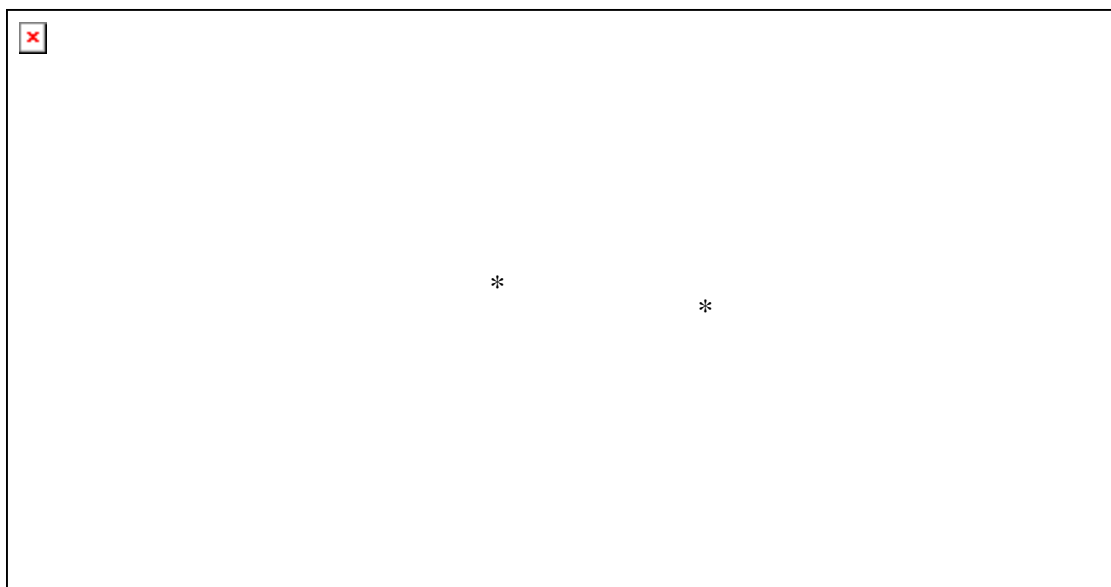
Análises estatísticas demonstraram que o grupo tratado com PZQ 400 mg/kg não apresentou redução estatisticamente significativa na média de vermes recuperados em comparação com o controle não tratado.

O grupo tratado com OXA 200 mg/kg apresentou redução estatisticamente significativa no número de esquistossômulos recuperados no 4º estágio em relação ao mesmo estágio do grupo controle. Esta redução foi suficiente para acarretar diferença estatisticamente significativa no número total de esquistossômulos recuperados deste grupo em comparação com o grupo controle.

Da mesma forma que OXA 200 mg/kg, o grupo tratado com ART 300 mg/kg mostrou diferenças estatisticamente significativas entre 4º estágio e controle. Além disso, houve redução estatisticamente significativa no número de esquistossômulos do 3º estágio em relação ao controle não tratado.



Ao comparar o perfil dos tratamentos entre si, ART 300 mg/kg apresentou redução de esquistossômulos no 3º estágio estatisticamente significativa em relação ao tratamento com OXA 200 mg/kg e PZQ 400 mg/kg. O esquema terapêutico proporcionou maior redução no número total de esquistossômulos em relação aos outros esquemas utilizados (dados não foram sinalizados na tabela).



\*  $p < 0,05$  diferença estatisticamente significativa em relação ao controle não tratado.

Gráfico 1 - Gráfico representativo das médias de vermes imaturos recuperados dos grupos experimentais e grupo controle e os respectivos desvios padrão obtidos no experimento 1- a.

#### 4.1.2 Experimento 1- b

Tabela 2 - Percentual de redução de vermes adultos recuperados de camundongos tratados com OXA 200 mg/kg, ART 300 mg/kg ou PZQ 400 mg/kg

Tratamento realizado no 15º dia após infecção com cerca de 200 cercárias e submetidos à eutanásia 42 dias após infecção.

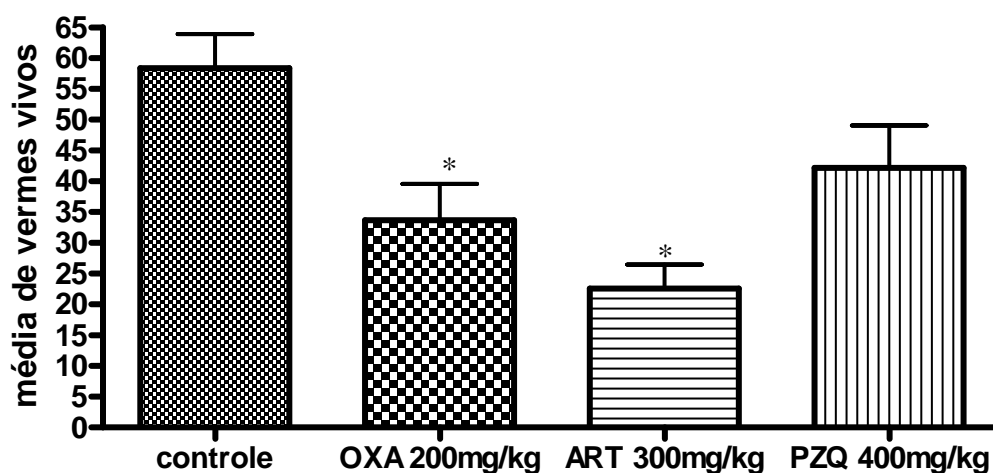
Grupos de Tratamento	Nº de animais Tratados-Examinados		Média de vermes	Número de vermes (% de redução)			Percentual de vermes imaturos
				Macho	Fêmea	Total	
Controle	13	13	58,4	386	355	759	(18) 2,4
OXA 200 mg/kg	13	12	33,7*	194 (49,7)**	191 (53,8)*	404 (46,8)*	(19) 4,7
ART 300 mg/kg	13	13	22,5*	129 (66,5)**	134 (66,5)***	293 (61,4)***	(45) 15,4*
PZQ 400 mg/kg	13	12	41,2	244 (36,8)	223 (37,2)	506 (33,3)	(39) 7,7

Diferença em relação ao controle não tratado \*  $p < 0,05$  \*\*  $p < 0,01$  \*\*\*  $p < 0,001$

O tratamento com PZQ 400 mg/kg no 15º dia de infecção não foi capaz de reduzir significativamente o número de vermes adultos recuperados, dado que reforça o resultado encontrado no schistograma, quando PZQ 400 mg/kg não foi capaz de reduzir o número de esquistossômulos recuperados.

Em contrapartida, os grupos tratados com OXA 200 mg/kg e ART 300 mg/kg apresentaram redução de vermes estatisticamente significativas em relação ao controle, tanto nos vermes machos quanto nas fêmeas.

O grupo tratado com ART 300 mg/kg apresentou maior percentual de vermes imaturos, além de maior redução na carga de vermes recuperados.



\*  $p < 0,05$  diferença estatisticamente significativa em relação ao controle.

Gráfico 2 - Gráfico representativo das médias de vermes imaturos recuperados dos grupos experimentais e grupo controle e os respectivos desvios padrão obtidos no experimento 1- b.

### 4.1.3 Experimento 2- a

Tabela 3 - Distribuição de esquistossômulos recuperados de camundongos tratados com OXA 200 mg/kg, ART 300 mg/kg ou PZQ 400 mg/kg.

Tratamento realizado no 23º dia após infecção com cerca de 200 cercárias e submetidos à eutanásia no 28º dia de infecção (5 dias após tratamento).

Grupos de tratamento	Número de animais Tratados - Examinados		Média de Vermes	Distribuição média de vermes por estágio evolutivo (nº absolutos)						NI	Total
				1	2	3	4	5	6		
Controle	13	11	53,8	0(0)	0,2(2)	0,6(7)	4,8(53)	17,7(195)	30,5(335)	0(0)	592
OXA 200 mg/kg	13	12	37,0	0(0)	0(0)	0,3(3)	5,4(65)	14,2(170)	17,4(209)*	0(0)	444
ART 300 mg/kg	13	13	27,8*	0(0)	0,1(1)	0,1(1)	3,6(47)	8,8(114)*	15,3(198)*	0(0)	361*
PZQ 400 mg/kg	13	13	42,7	0(0)	0(0)	0,9(11)	5,8(75)	16,4(213)	19,8(257)	0(0)	556

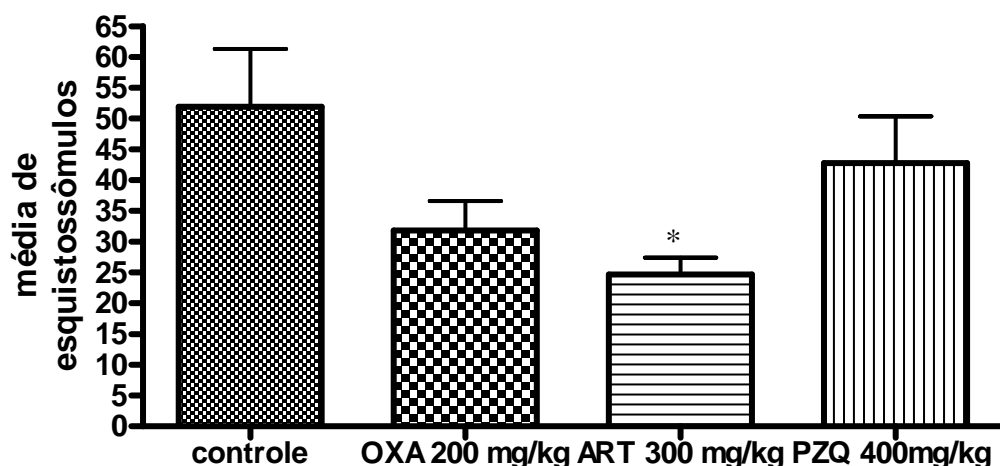
NI. -Esquistossômulo não identificado

Diferença em relação ao controle não tratado \* p<0,05 \*\* p<0,01 \*\*\* p<0,001

Os resultados demonstraram que o grupo tratado com PZQ 400 mg/kg não promoveu redução no total de esquistossômulos recuperados, bem como na média de vermes recuperados em nenhum dos estádios evolutivos, uma vez que não houve diferenças significativas entre este grupo e o controle não tratado.

O grupo tratado com OXA 200 mg/kg apresentou redução significativa no número de esquistossômulos recuperados no 6º estágio em relação ao mesmo estágio do grupo controle. Esta redução não foi suficiente para acarretar diferença estatisticamente significativa no número total de esquistossômulos recuperados deste grupo e os do grupo controle.

O grupo tratado com ART 300 mg/kg mostrou diferenças significativas no 5º estágio comparado com o controle. Também houve redução significativa no número de esquistossômulos do 6º estágio em relação ao controle não tratado. O esquema terapêutico proporcionou redução no total de esquistossômulos em relação ao controle, diferentemente do resultado encontrado no tratamento com os outros esquemas utilizados.



\*  $p < 0,05$  diferença estatisticamente significativa em relação ao controle.

Gráfico 3 - Gráfico representativo das médias de vermes imaturos recuperados dos grupos experimentais e grupo controle e os respectivos desvios padrão obtidos no experimento 2- a.

#### 4.1.4 Experimento 2- b

Tabela 4 - Percentual de redução de vermes adultos recuperados de camundongos tratados com OXA 200 mg/kg, ART 300 mg/kg ou PZQ 400 mg/kg.

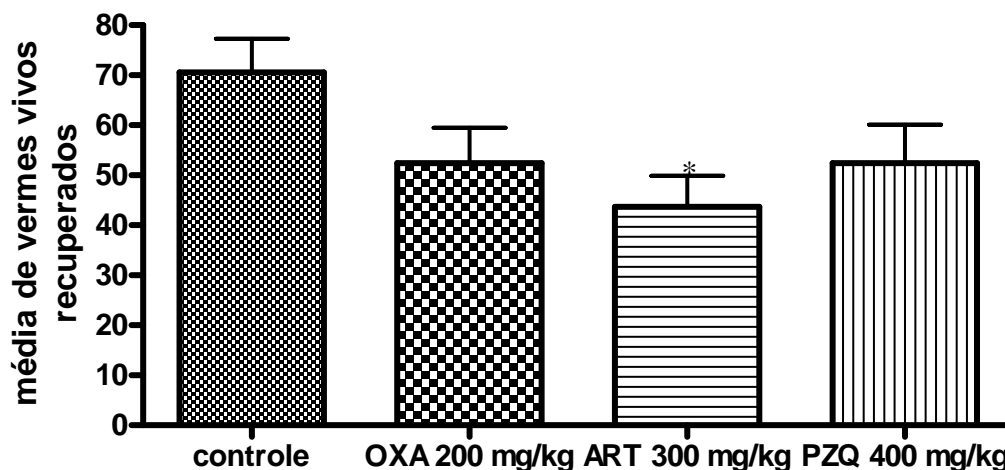
Tratamento realizado no 23º dia após infecção com cerca de 200 cercárias e submetidos à eutanásia 42 dias após infecção.

Grupos de tratamento	Nº de animais Tratados-Examinados	Média de Vermes	Número de vermes (% de redução)			Percentual de vermes imaturos	
			Macho	Fêmea	Total		
Controle não tratado	12	12	70,6	381	450	847	(16) 1,9
OXA 200 mg/kg	12	12	52,4	228 (39,6)	273 (39,3)*	629 (25,7)	(128) 20,3*
ART 300 mg/kg	12	11	43,7*	200 (47,5)	248 (44,9)*	481 (43,2)*	(33) 6,9
PZQ 400 mg/kg	12	12	52,4	277 (27,3)	282 (37,8)*	629 (25,7)	(70) 11,1*

Diferença em relação ao controle não tratado \*  $p < 0,05$  \*\*  $p < 0,01$  \*\*\*  $p < 0,001$

Análises estatísticas demonstraram que tanto o tratamento com PZQ 400 mg/kg quanto com OXA 200 mg/kg no 23º dia de infecção não foi capaz de reduzir significativamente o total de vermes adultos recuperados, embora ambos tenham causado redução significativa do número de vermes fêmeas. Estes esquemas terapêuticos ocasionaram maior número de vermes ainda imaturos em relação ao controle.

Em contrapartida, o tratamento com ART 300 mg/kg foi capaz de promover uma redução de vermes estatisticamente significativa em relação ao controle, reduzindo principalmente o número de fêmeas. Este grupo não apresentou diferença em relação ao número de vermes imaturos comparado ao controle.



\*  $p < 0,05$  diferença estatisticamente significativa em relação ao controle.

Gráfico 4 - Gráfico representativo das médias de vermes imaturos recuperados dos grupos experimentais e grupo controle e os respectivos desvios padrão obtidos no experimento 2- b.

#### 4.1.5 Experimento 3- a

Tabela 5 - Distribuição de esquistossômulos recuperados de camundongos tratados com OXA 400 mg/kg, ART 600 mg/kg ou PZQ 800 mg/kg.

Tratamento realizado no 15º dia após infecção com cerca de 200 cercárias e submetidos a eutanásia no 20º dia de infecção (5 dias após o tratamento).

Grupos de tratamento	Número de animais Tratados - Examinados	Média de Vermes	Distribuição média de vermes por estágio evolutivo (nº absolutos)						Total		
			1	2	3	4	5	6		NI	
Controle	13	11	49,4	0,5(5)	3,6(40)	9,3(102)	34,6(381)	0,3(3)	0(0)	1,1(12)	543
OXA 400 mg/kg	13	9	33,3*	0,6(5)	3,7(33)	8,1(73)	19(171)**	0(0)	0(0)	2(18)	300*
ART 600 mg/kg	13	12	24,1***	1,5(18)	4,6(55)	2,9(35)**	8,6(103)***	0(0)	0(0)	6,5(78)*	289***
PZQ 800 mg/kg	13	9	28,9*	0,4(4)	4(36)	8,6(77)	15,8(142)**	0(0)	0(0)	0,1(1)	260*

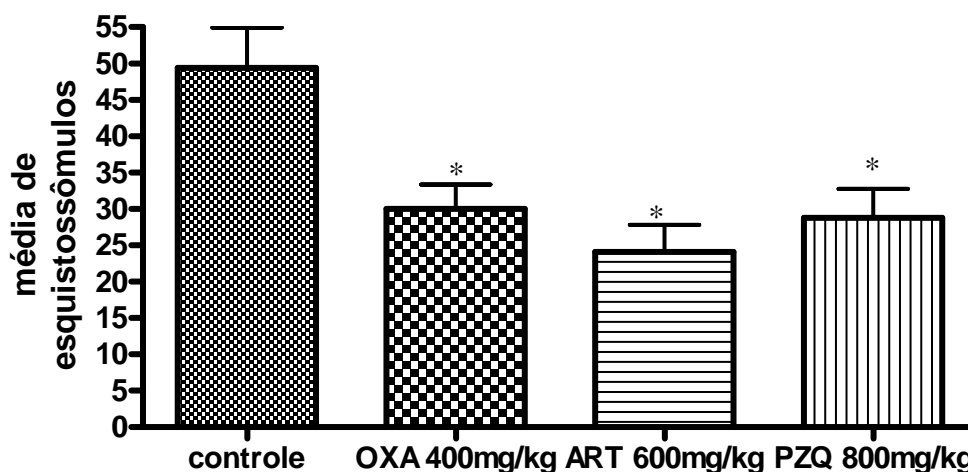
NI. -Esquistossômulo não identificado

Diferença em relação ao controle não tratado \*  $p < 0,05$  \*\*  $p < 0,01$  \*\*\*  $p < 0,001$

Em todos os grupos foi observado redução no número de vermes estatisticamente significativas em relação ao controle. Porém OXA 400 mg/kg e PZQ 800 mg/kg atuaram reduzindo significativamente apenas o 4º estágio em relação ao controle.

Enquanto isso, ART 600 mg/kg foi capaz de promover diferenças significativas nos 3º e 4º estádios evolutivos, além de aumentar o número de esquistossômulos com o intestino deteriorado sendo computados como esquistossômulos não identificados.

Comparando os esquemas terapêuticos entre si, ART 600 mg/kg promoveu redução significativa do 3º estágio em relação ao PZQ 800 mg/kg e ainda apresentou diferença em relação ao número de esquistossômulos não identificados comparado a OXA 400 mg/kg e PZQ 800 mg/kg (dados não sinalizados na tabela).



\*  $p < 0,05$  diferença estatisticamente significativa em relação ao controle.

Gráfico 5 - Gráfico representativo das médias de vermes imaturos recuperados dos grupos experimentais e grupo controle e os respectivos desvios padrão obtidos no experimento 3- a.

#### 4.1.6 Experimento 3- b

Tabela 6 - Percentual de redução de vermes adultos recuperados de camundongos tratados com OXA 400 mg/kg, ART 600 mg/kg ou PZQ 800 mg/kg.

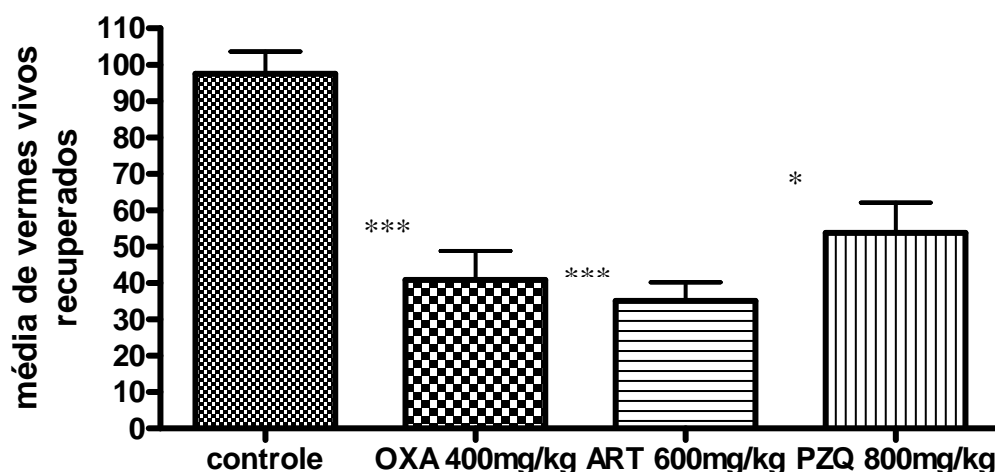
Tratamento realizado no 15º dia após infecção com cerca de 200 cercárias e submetidos à eutanásia 42 dias após infecção.

Grupos de tratamento	Nº de animais Tratados-Examinados		Média de vermes	Número de vermes (% de redução)			Percentual de vermes imaturos
				Macho	Fêmea	Total	
<b>Controle</b>	15	14	97,5	662	682	1365	(21) 1,5
<b>OXA 400 mg/kg</b>	15	15	40,8***	233(64,8)***	270(60,4)***	612 (55,2)***	(104) 16,8**
<b>ART 600 mg/kg</b>	15	15	35,1***	241(63,6)***	261(61,7)***	526 (61,5)***	(24) 4,6
<b>PZQ 800 mg/kg</b>	15	14	53,8*	339(48,8)*	362(46,9)*	753 (44,8)*	(52) 6,9

Diferença em relação ao controle não tratado \* p<0,05 \*\* p<0,01 \*\*\* p<0,001

O aumento na dose das três drogas permitiu que todos os tratamentos reduzissem o percentual de vermes adultos recuperados. Foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre o número de vermes machos e fêmeas dos grupos tratados em relação ao controle não tratado.

O grupo tratado com OXA 400 mg/kg apresentou percentual de vermes imaturos significativamente maior que o controle.



\*  $p < 0,05$  \*\*\*  $p < 0,001$  diferença estatisticamente significativa em relação ao controle.

Gráfico 6 - Gráfico representativo das médias de vermes imaturos recuperados dos grupos experimentais e grupo controle e os respectivos desvios padrão obtidos no experimento 3- b.

Deve-se ressaltar que os vermes adultos recuperados do grupo tratado com OXA 400 mg/kg foram menores que os vermes do grupo controle, as fêmeas na sua maioria com aspecto de imaturas, machos apresentando manchas escuras. Também houve presença de vermes ainda nos 4º e 5º estádios evolutivos (fig.14).

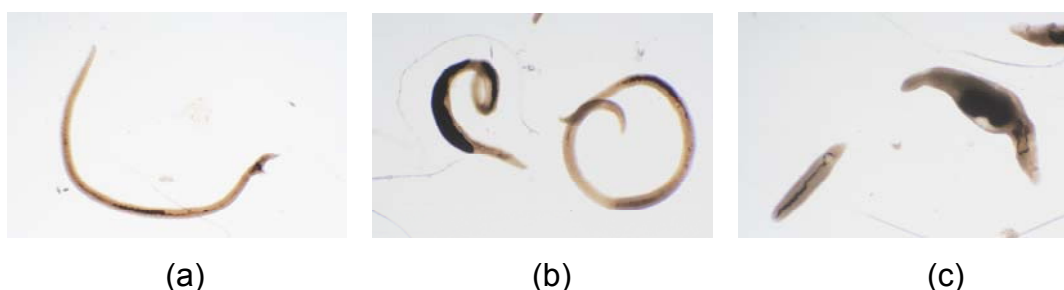


Figura 14 - Vermes recuperados do grupo tratado com OXA 400 mg/kg no 15º dpi.

(a) fêmea visivelmente menor que recuperadas no controle. (b) Macho pequeno e com manchas escuras. (c) Macho apresentando manchas escuras ao lado de esquistossômulo no início do 5º estágio.

Vermes recuperados de grupo tratado com ART 600 mg/kg também se apresentaram menores que os vermes recuperados no grupo controle. As fêmeas apresentaram aspectos de imaturas (fig. 15).



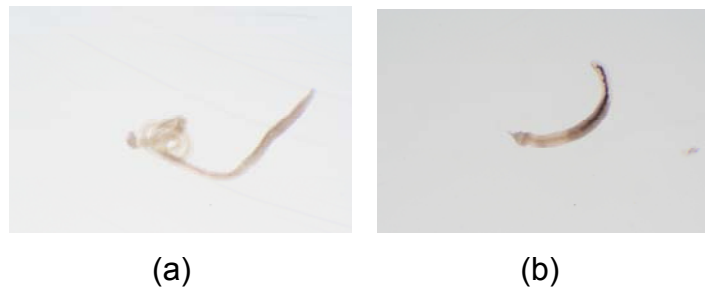


Figura 15 - vermes recuperados do grupo tratado com ART 600 mg/kg no 15º dpi.

(a) fêmea pequena e com intestino claro e (b) macho pouco desenvolvido.

Os vermes recuperados dos animais tratados com PZQ 800 mg/kg apresentaram aspecto semelhante ao controle (fig.16).

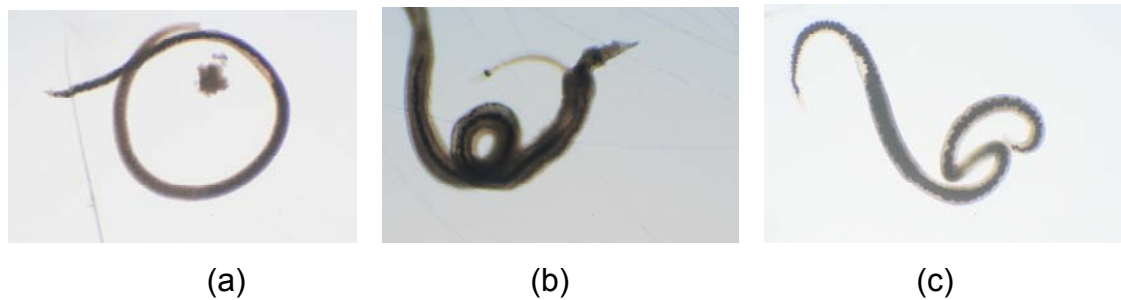


Figura 16 – vermes recuperados do grupo tratado com PZQ 800 mg/kg no 15º dpi e controle não tratado

(a) fêmea aparentemente normal (b) casal recuperado grupo tratado com PZQ 800 mg/kg (c) fêmea recuperada do grupo controle.

#### 4.1.7 Experimento 4- a

Tabela 7 - Distribuição de esquistossômulos recuperados de camundongos tratados com OXA 400 mg/kg, ART 600 mg/kg ou PZQ 800 mg/kg.

Tratamento realizado no 23º dia após infecção com cerca de 200 cercárias e submetidos a eutanásia no 28º de infecção (5 dias após tratamento).

Grupos de tratamento	Número de animais Tratados - Examinados	Média de Vermes	Distribuição média de vermes por estágio evolutivo (nº absolutos)							Total	
			1	2	3	4	5	6	NI		
Controle não	12	12	59,1	0(0)	0,1(1)	0,8(9)	6,2(74)	24,8(298)	26,7(320)	0,6(7)	709
OXA 400 mg/kg	12	12	28,9***	0(0)	0,1(1)	1,2(14)	8(96)	12,1(145)**	3,8(45)***	3,8(46)	347***
ART 600 mg/kg	12	12	25,8***	0(0)	0,1(1)	0,1(1)	1,3(15)**	8,3(99)***	6,1(73)***	10(120)**	309***
PZQ 800 mg/kg	12	12	40,4**	0(0)	0,3(3)	0,6(7)	4,3(51)	24,8(297)	10,4(125)***	0,2(2)	485**

NI. -Esquistossômulo não identificado

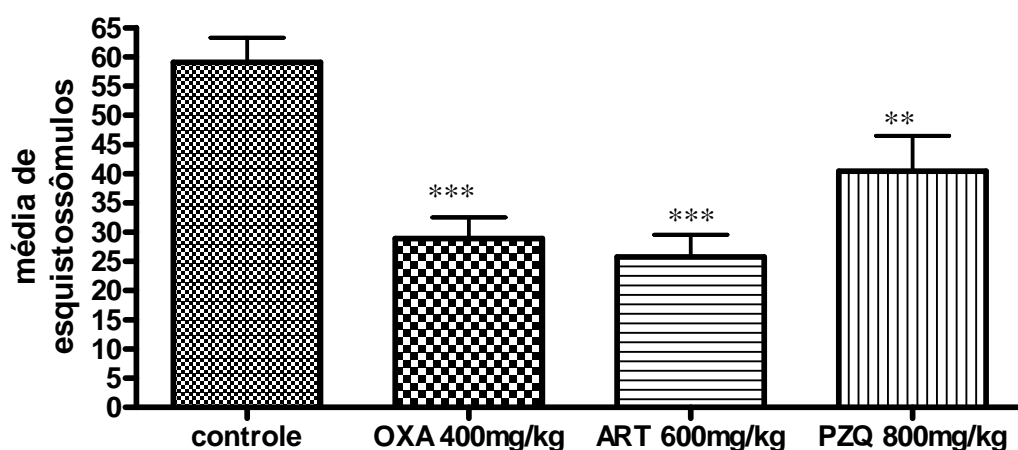
Diferença em relação ao controle não tratado \* p<0,05 \*\* p<0,01 \*\*\* p<0,001

As comparações estatísticas para avaliar a eficácia do tratamento com OXA 400 mg/kg, ART 600 mg/kg e PZQ 800 mg/kg no 23º dia de infecção, foram realizados da mesma maneira que nos experimentos anteriores.

De fato, o aumento da dose permitiu que todos os grupos promovessem redução no número de vermes estatisticamente significativas em relação ao controle. Porém, o perfil de atuação das três drogas foi diferente. PZQ 800 mg/kg atuou reduzindo significativamente apenas o 6º estágio em relação ao controle.

OXA 400 mg/kg gerou diferenças entre 5º e 6º estágio em relação ao controle. Enquanto isso, ART 600 mg/kg foi capaz de promover diferenças significativas nos 4º, 5º e 6º estágios evolutivos, além de aumentar o número de esquistossômulos não identificados.

Na comparação entre os esquemas terapêuticos, ART 600 mg/kg apresentou diferença significativa no 4º estágio evolutivo em relação a OXA 400 mg/kg e ainda diferença no 5º estágio e esquistossômulos não identificados se comparado ao PZQ 800 mg/kg (dados não sinalizados na tabela).



\*\*  $p < 0,01$  \*\*\*  $p < 0,001$  diferença estatisticamente significativa em relação ao controle.

Gráfico 7 - Gráfico representativo das médias de vermes imaturos recuperados dos grupos experimentais e grupo controle e os respectivos desvios padrão obtidos no experimento 4- a.

#### 4.1.8 Experimento 4- b

Tabela 8 - Percentual de redução de vermes adultos recuperados de camundongos tratados com OXA 400 mg/kg, ART 600 mg/kg ou PZQ 800 mg/kg.

Tratamento realizado no 23º dia após infecção com cerca de 200 cercárias e submetidos à eutanásia 42 dias após infecção.

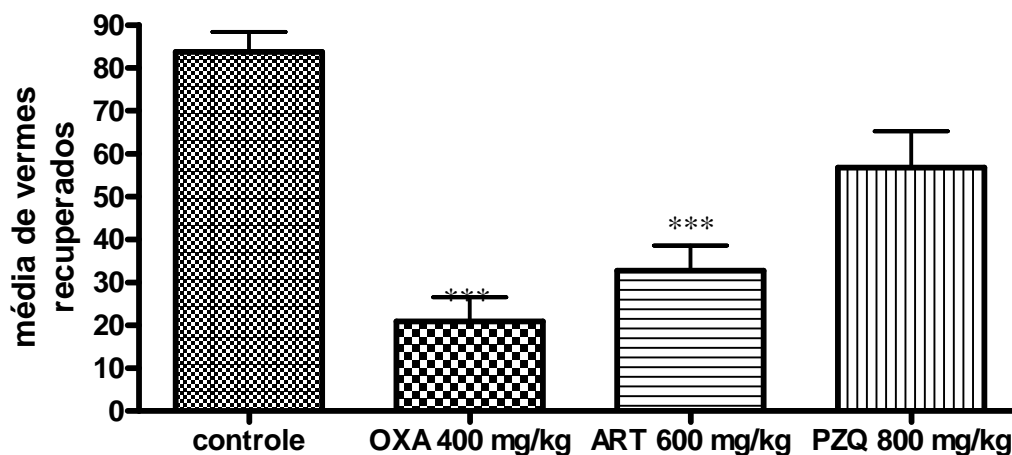
Grupos de tratamento	Nº de animais Tratados-Examinados	Média de vermes	Nº de vermes (% de redução )			Percentual de vermes imaturos	
			Macho	Fêmea	Total		
<b>Controle</b>	14	13	83,8	577	497	1089	(15) 1,4
<b>OXA 400 mg/kg</b>	14	13	20,9***	64(88,9)***	113(77,3)***	272(75,0)***	(95) 34,9***
<b>ART 600 mg/kg</b>	14	14	32,7***	141(75,6)***	132(73,4)***	458(57,9)***	(185)40,4***
<b>PZQ 800 mg/kg</b>	14	12	56,8	329(42,9)	314(36,8)	681(37,5)	(38) 5,6

Diferença em relação ao controle não tratado \* p<0,05 \*\* p<0,01 \*\*\* p<0,001

Os tratamentos com OXA 400 mg/kg e ART 600 mg/kg administrados no 23º dia após infecção foram capazes de reduzir significativamente o número total de vermes recuperados, bem como o número de machos e fêmeas. Estes grupos também revelaram maior número de vermes ainda imaturos.

No grupo tratado com PZQ 800 mg/kg não ocorreu diferença significativa no número de vermes recuperados em relação ao controle.

Comparações entre os esquemas terapêuticos revelam diferenças significativas entre total de vermes recuperados, totais de machos e fêmeas do grupo tratado com OXA 400 mg/kg, comparado ao grupo tratado com PZQ 800 mg/kg. ART 600 mg/kg apresentou diferença significativa em relação ao grupo tratado com PZQ 800 mg/kg na recuperação de vermes fêmeas (dados não sinalizados na tabela).



\*\*\*  $p < 0,001$  diferença estatisticamente significativa em relação ao controle.

Gráfico 8 - Gráfico representativo das médias de vermes imaturos recuperados dos grupos experimentais e grupo controle e os respectivos desvios padrão obtidos no experimento 4.

O aspecto debilitado apresentado pelos vermes recuperados dos grupos tratados no 15º dpi se repetiu quando o tratamento foi realizado no 23º dpi (fig. 17). Vermes machos recuperados do grupo tratado com OXA 400 mg/kg apresentavam “bolhas” escuras no tegumento. Os vermes recuperados no tratamento com ART 600 mg/kg tinham aspecto de frágeis, pequenos, fêmeas com intestino claro. Parasitos recuperados do grupo tratado com PZQ 800 mg/kg eram semelhantes ao controle não tratado.

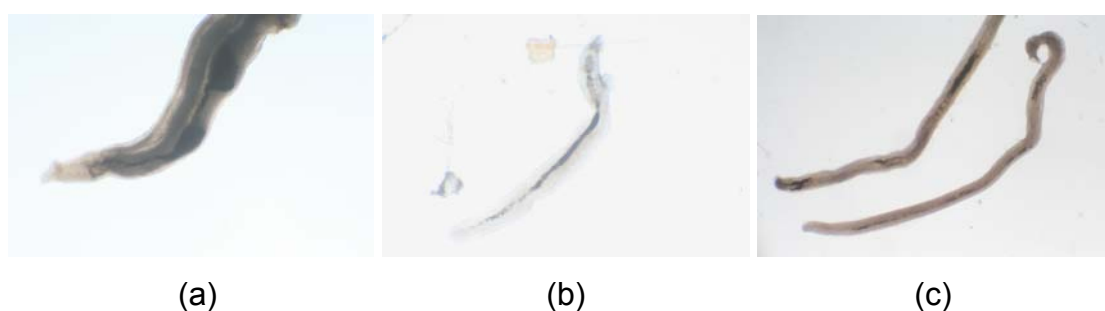


Figura 17– vermes recuperados de grupos tratados com OXA 400 mg/kg e ART 600 mg/kg (a) macho recuperado do grupo tratado com OXA 400 mg/kg apresentando “manchas” escuras no seu tegumento (b) macho recuperado do grupo tratado com ART 600 mg/kg, pequeno, claro (c) fêmeas recuperadas do grupo tratado com ART 600 mg/kg, pequenas e com intestino claro.

#### 4.1.9 Experimento 5

Tabela 9 - Distribuição de esquistossômulos no schistograma recuperados de camundongos tratados com ART 300 ou 600 mg/kg; PZQ 400 ou 800 mg/kg; ART 300 + PZQ 400 mg/kg; e ART 600 + PZQ 800 mg/kg.

Tratamento realizado no 14º dia após infecção com cerca de 200 cercárias e submetidos à eutanásia no 19º dia de infecção (5 dias após tratamento).

Grupos de tratamento	Número de animais tratados-examinados		Média de Vermes	Distribuição média de vermes por estágio evolutivo (nº absolutos)							Total
				1	2	3	4	5	6	NI	
Controle	12	12	43,5	0,3(3)	1,7(20)	8,1(97)	32,4(386)	1(12)	0	0,3(4)	522
PZQ 400 mg/kg	11	10	29,3	0,1(1)	1,6(16)	8,0(80)	22,0(220)	0,1(1)	0	0,5(5)	293
PZQ 800 mg/kg	11	11	23,5 ***	0,2(1)	1,1(12)	7,3(80)	12,7(140)***	1,6(17)	0	0,7(8)	258***
ART 300 mg/kg	11	10	17,9 ***	0,2(2)	1,5(15)	2,9(29)**	9,2(92)***	0,1(1)	0	3,3(33)	172***
ART 600 mg/kg	11	9	7,7 ***	0,1(1)	1,6(14)	0,6(5)***	2,7(24)***	0,1(1)	0	2,7(24)	69***
PZQ 400+ ART300	12	12	9,8 ***	0,3(3)	1,7(20)	2,9(35)*	4,2(50)***	0	0	0,8(10)	118***
PZQ 800 + ART 600	12	11	9,1 ***	0,1(1)	0,6(6)	1,7(19)**	5,1(56)***	0,1(1)	0	1,6(18)	101***

NI. Esquistossômulos não identificados

Diferença em relação ao controle não tratado \* p<0,05 \*\* p<0,01 \*\*\* p<0,001

Os grupos tratados com ART 300 ou 600 mg/kg e PZQ 400 ou 800 mg/kg apresentaram o mesmo perfil relatado nos experimentos anteriores para animais tratados aos 15 dias após infecção.

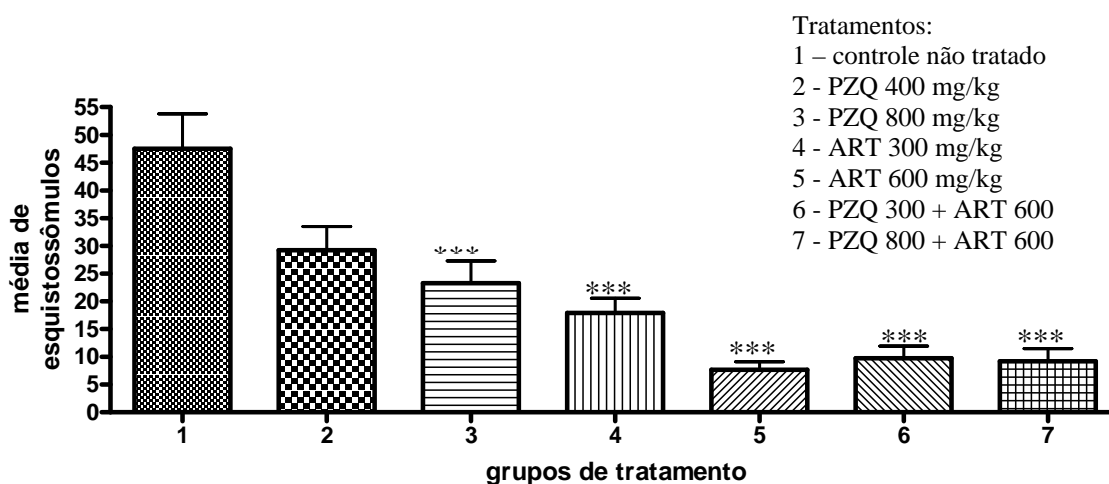
A associação de ART 300 + PZQ 400 mg/kg promoveu redução significativa nos esquistossômulos de 3º e 4º estádios evolutivos, bem como no total de esquistossômulos recuperados, comparada ao controle não tratado.

Associação ART 300 + PZQ 400 teve vantagem terapêutica em relação ao PZQ 400 mg/kg isoladamente, pois apresentou redução significativa nos 3º e 4º estádios evolutivos e no total de esquistossômulos. No entanto, a associação não apresentou diferença estatisticamente significativa nos resultados obtidos em relação ao tratamento com ART 300 mg/kg isoladamente.

Os resultados obtidos com a associação ART 300 + PZQ 400 mg/kg não demonstraram diferença significativa na redução total de esquistossômulos nem nos estádios evolutivos se comparado ao PZQ 800 mg/kg e ao ART 600 mg/kg isoladamente.

Associação ART 600 + PZQ 800 apresentou redução significativa nos 3º e 4º estádios evolutivos e no total de esquistossômulos em relação ao grupo controle não tratado. Entretanto a associação não apresentou diferença estatisticamente significativa nos resultados obtidos em relação ao tratamento com ART 600 mg/kg ou PZQ 800 mg/kg utilizados isoladamente.

Não houve diferença estatisticamente significativa entre os dois tratamentos com as associações. As comparações dos grupos entre si não foram sinalizadas nas tabelas.



\*\*\*  $p < 0,001$  diferença estatisticamente significativa em relação ao controle.

Gráfico 9 - Gráfico representativo das médias de vermes imaturos recuperados dos grupos experimentais e grupo controle e os respectivos desvios padrão obtidos no experimento 5 para avaliação da associação ART + PZQ administrada no 15º dia após infecção.

#### 4.1.10 Experimento 6

Tabela 10 - Distribuição de esquistossômulos recuperados de camundongos tratados com ART 300 ou 600 mg/kg; PZQ 400 ou 800 mg/kg; ART 300 + PZQ 400 mg/kg; e ART 600 + PZQ 800 mg/kg.

Tratamento realizado no 21º dia após infecção com cerca de 200 cercárias e submetidos a eutanásia no 26º dia de infecção (5 dias após tratamento).

Grupos de tratamento	Número de animais tratados-examinados		Média de Vermes	Distribuição média de vermes por estágio evolutivo (nº absolutos)							Total
				1	2	3	4	5	6	NI	
<b>Controle</b>	11	11	61	0	0,2(2)	2,0(22)	13,2(145)	23,1(254)	21,5(236)	1,1(12)	671
<b>PZQ 400 mg/kg</b>	11	10	57,6	0	1,0(10)	2,2(22)	20,1(201)	25,6(256)	7,9(79)	0,8(8)	576
<b>PZQ 800 mg/kg</b>	11	11	36,0*	0	0,1(1)	3,5(38)	12,3(135)	16,5(181)	3,5(38)*	0,3(3)	396*
<b>ART 300 mg/kg</b>	11	11	26,9 **	0	0,1(1)	0,4(4)	2,7(30)	7,9(87)*	3,9(43)**	1,9(131)**	296**
<b>ART 600 mg/kg</b>	12	12	20,6 ***	0	0,2(2)	0	3,2(38)***	7,3(87)*	1,0(12)***	9,0(108)**	247***
<b>PZQ 400+ ART 300</b>	12	11	29,3 **	0	0,3(3)	1,0(11)	7,9(87)	8,1(89)*	1,4(15)**	0,6(117)**	322**
<b>PZQ 800+ ART 600</b>	12	11	19,2 ***	0	0,1(1)	0,8(9)	3,8(42)*	7,5(82)*	1,6(17)***	5,5(60)*	211***

NI. Esquistossômulos não identificados

Diferença em relação ao controle não tratado \* p<0,05 \*\* p<0,01 \*\*\* p<0,001

Os grupos tratados com ART 300 ou 600 mg/kg e PZQ 400 ou 800 mg/kg apresentaram o perfil relatado nos experimentos anteriores para animais tratados no 23º dia após infecção.

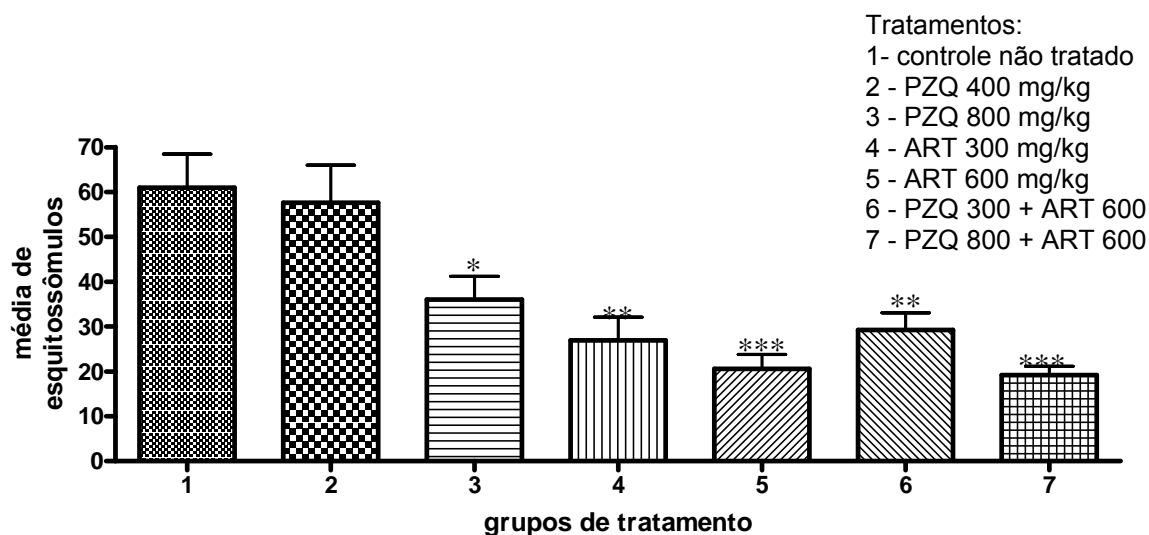
A associação ART 300 + PZQ 400 mg/kg levou a redução de esquistossômulos de 5º e 6º estádios e, conseqüentemente, do total de esquistossômulos recuperados. Também foi observado aumento significativo de esquistossômulos com intestino danificado.

Esta associação apresentou redução estatisticamente significativa no 5º estágio e no número total de vermes em relação ao grupo tratado com PZQ 400 mg/kg. Também promoveu aumento no número de esquistossômulos não identificados comparado aos grupos tratados com PZQ 400 mg/kg e PZQ 800 mg/kg isoladamente.

Quando a dose na associação foi aumentada para ART 600 + PZQ 800 mg/kg houve redução estatisticamente significativa no número total esquistossômulos recuperados, bem como no número de vermes de 4º, 5º e 6º estádios.

A associação ART 600 + PZQ 800 mg/kg levou a redução estatisticamente significativa de esquistossômulos de 4º, 5º estágio e no total recuperado em relação aos tratados com PZQ 400 mg/kg.

As associações apresentam vantagem terapêutica apenas em relação ao tratamento com PZQ 400 mg/kg isoladamente. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os outros tratamentos isolados com as associações. As comparações dos grupos entre si não foram sinalizadas na tabela.



\*  $p < 0,05$  \*\*  $p < 0,01$  \*\*\*  $p < 0,001$  diferença estatisticamente significativa em relação ao controle.

Gráfico 10 - Gráfico representativo das médias de vermes imaturos recuperados dos grupos experimentais e grupo controle e os respectivos desvios padrão obtidos no experimento 6 para avaliação da associação ART + PZQ administrada no 21º dia após infecção.



## 4.2 Avaliação de vermes adultos recuperados após exposição a drogas esquistossomicidas no período pré-patente

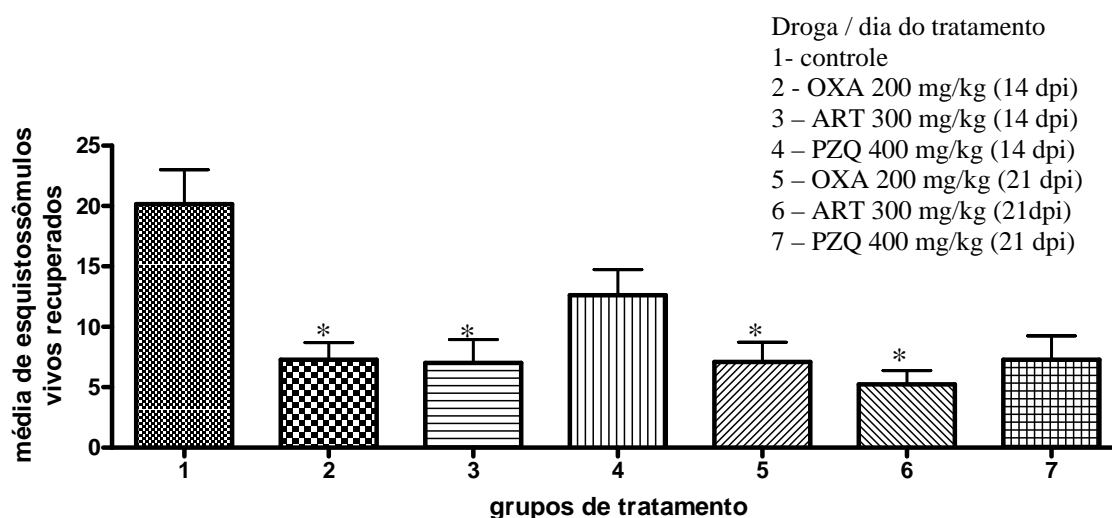
### 4.2.1 Experimento 7

Tabela 11 - Número de vermes vivos recuperados 100 dias após a infecção, de camundongos tratados com OXA 200 mg/kg, ART 300 mg/kg e PZQ 400 mg/kg. Tratamentos realizados nos 14° ou 21° dia após infecção com cerca de 50 cercárias.

Droga .....mg/kg	Sacrificados ... dias após o tratamento	Tratado ..... dias após infecção	Número de animais Tratados-Examinados	Média de Vermes	Distribuição de vermes (%) Mesentério-Fígado	Vermes mortos no fígado (%)	Alteração do oograma (%)		
OXA 200	100	14	15	11	7,1*	86,2	13,8	0,0	45,5
ART 300	100	14	15	9	7,0*	94,9	5,1	0,0	11,1
PZQ 400	100	14	15	13	12,6	97,6	2,4	0,0	0,0
OXA 200	100	21	15	11	7,4*	93,6	6,4	0,0	27,3
ART 300	100	21	15	13	5,2***	95,6	4,4	0,0	15,4
PZQ 400	100	21	15	7	9,3	82,4	17,6	0,0	28,6
Controle	42	--	15	13	20,2	88,5	11,5	0,0	0

Diferença em relação ao controle não tratado \* p<0,05 \*\* p<0,01 \*\*\* p<0,001

Análises estatísticas mostraram que os grupos tratados com OXA 200 mg/kg e ART 300 mg/kg apresentaram redução na carga parasitária detectada em perfusão 100 dias após infecção, nos tratamentos realizados tanto no 14° quanto no 21° dia. O grupo tratado com PZQ 400 mg/kg não apresentou redução da carga parasitária.



\* p< 0,05 diferença estatisticamente significativa em relação ao controle.

Gráfico 11 - Gráfico de barras da média de esquistossômulos vivos recuperados dos grupos experimentais e grupo controle e os respectivos desvios padrão obtidos no experimento 7.

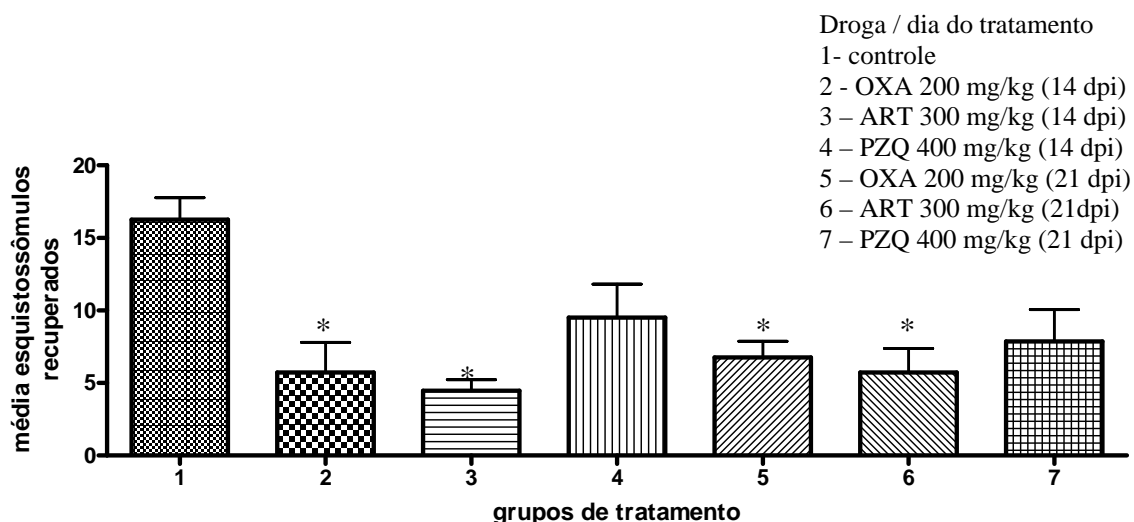
## 4.2.2 Experimento 8

Tabela 12 - Número de vermes vivos recuperados 100 dias após a infecção, de camundongos tratados com OXA 400 mg/kg, ART 600 mg/kg e PZQ 800 mg/kg. Tratamentos realizados nos 14° ou 21° dias após infecção com cerca de 50 cercárias.

Droga .....mg/kg	Sacrificados ... dias após o infecção	Tratado ..... dias após infecção	Número de animais Tratados - Examinados	Média de Vermes	Distribuição de vermes (%) Mesentério-Fígado	Vermes mortos no fígado (%)	Alteração do oograma (%)		
OXA 400	100	14	15	11	5,2***	76,2	23,8	9,5	63,6
ART 600	100	14	15	13	4,5***	81,0	19,0	0,0	15,4
PZQ 800	100	14	15	8	9,5	76,9	23,1	0,0	0,0
OXA 400	100	21	15	12	6,8*	85,2	14,8	0,0	58,6
ART 600	100	21	15	11	5,7**	87,3	12,7	0,0	27,3
PZQ 800	100	21	15	7	7,9	83,6	16,4	0,0	14,3
Controle	42	-	-	15	16,2	86,1	13,9	0,0	0,0

\* p<0,05    \*\* p<0,01    \*\*\* p<0,001

Os resultados apresentados mostram que o aumento das doses não aumentou a eficácia dos fármacos em relação à redução da carga parasitária, quando os tratamentos foram realizados 14° ou 21° dias após infecção.



\* p< 0,05 diferença estatisticamente significativa em relação ao controle.

Gráfico 12 - Gráfico de barras da média de esquistossômulos vivos recuperados dos grupos experimentais e grupo controle e os respectivos desvios padrão obtidos no experimento 8.

É importante ressaltar que mesmo realizando a perfusão após 100 dias de infecção, os vermes recuperados dos grupos tratados com OXA 400 mg/kg e ART

600 mg/kg mantiveram aspecto de frágeis e pequenos. Grande parte das fêmeas estava com intestino claro, com aspecto de imaturas. No grupo tratado com ART 600 mg/kg no 21º dpi, 16 das 34 fêmeas estavam imaturas, enquanto 14 das 36 fêmeas estavam imaturas no grupo tratado no 14º dpi. No grupo tratado com OXA 400 mg/kg no 21º dpi, 22 das 49 fêmeas estavam imaturas, enquanto 8 das 28 fêmeas estavam imaturas no grupo tratado no 14º dpi.

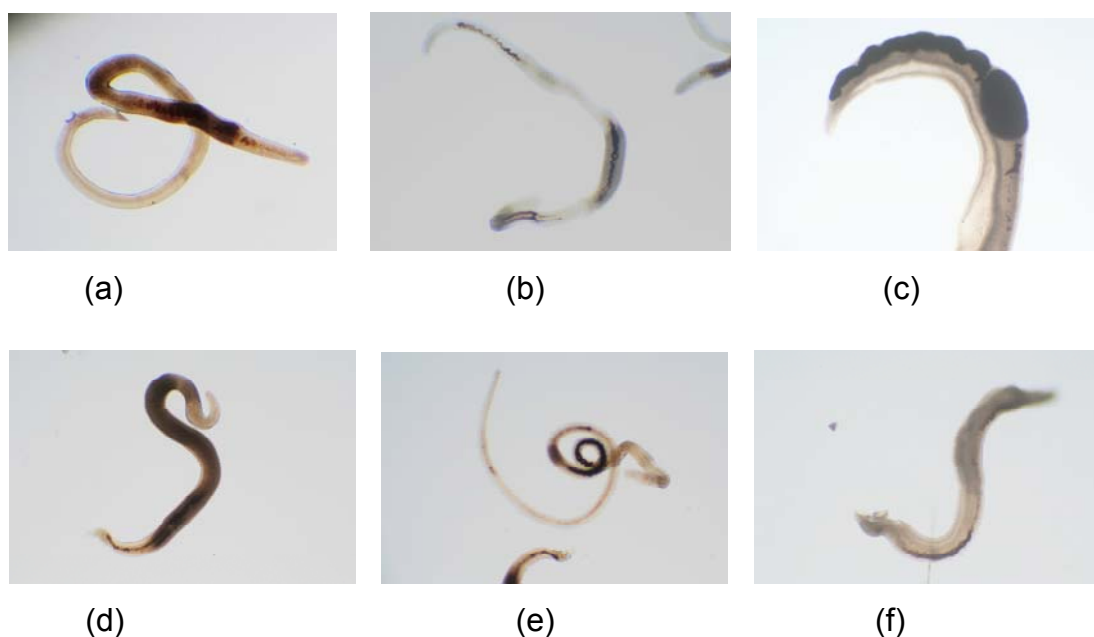


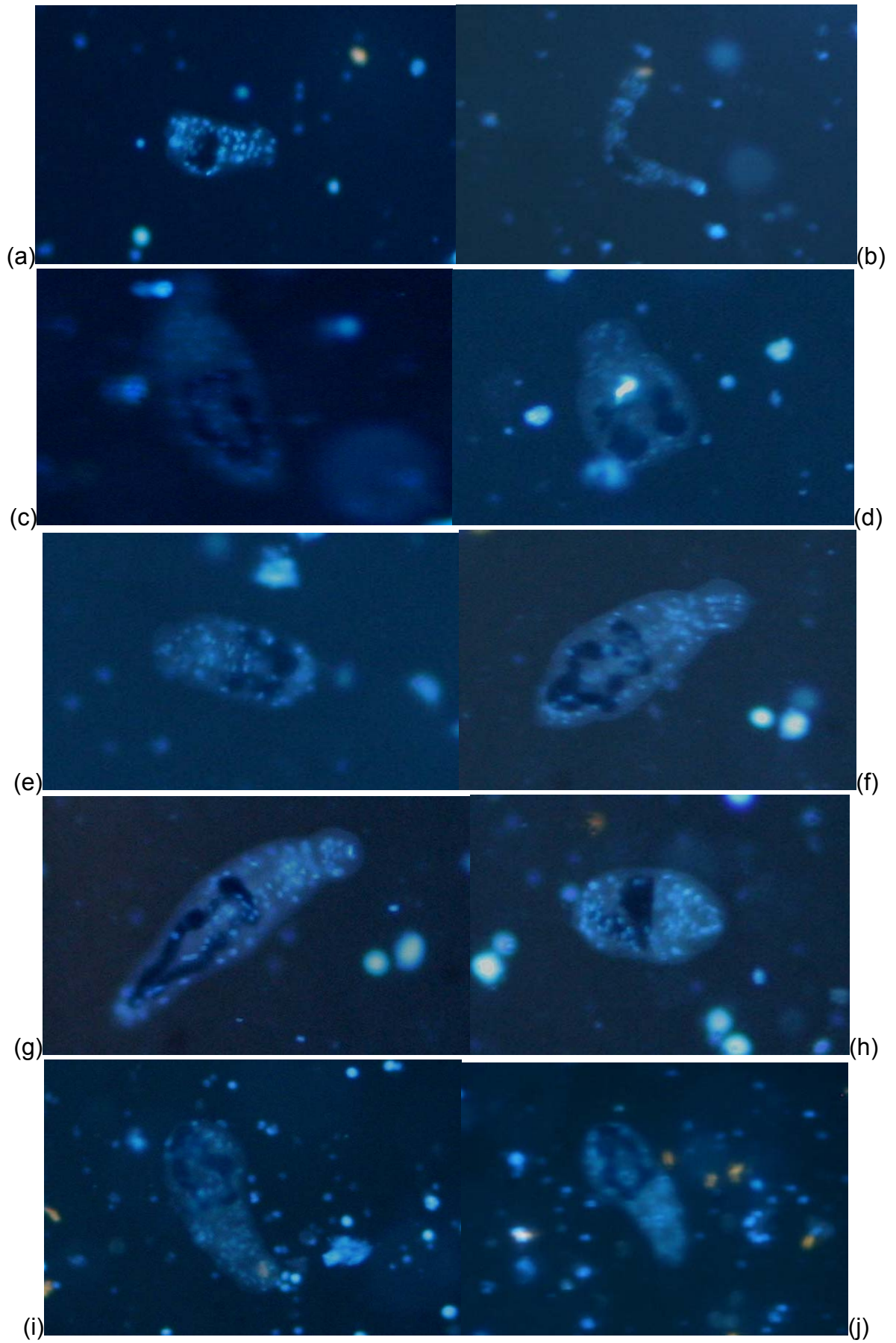
Figura 18 – Vermes recuperados após 100 dias de infecção

(a) fêmea recuperada de camundongo tratado com OXA 400 mg/kg aos 21 dpi. (b) fêmea recuperada de camundongo tratado com OXA 400 mg/kg aos 14 dpi. (c) detalhe macho recuperado de camundongo tratado com OXA 400 mg/kg 14 dpi. (d) fêmea recuperada de camundongo tratado com ART 600 mg/kg 21 dpi. (e) fêmea recuperada de camundongo tratado com ART 600 mg/kg aos 14 dpi (f) macho recuperado de camundongo tratado com ART 600 mg/kg aos 14 dpi.

#### **4.3 Efeitos do tratamento “*in vivo*” com OXA, ART e PZQ sobre o tegumento de esquistossômulos de *S. mansoni***

##### **4.3.1 Experimento 9 – a**

Todos os vermes coletados dos grupos experimentais apresentaram marcação pela sonda Hoechst 33258, mas nos grupos tratados com OXA 400 mg/kg, ART 600 mg/kg e 300 mg/kg e PZQ 800 mg/kg a marcação foi um pouco mais intensa.



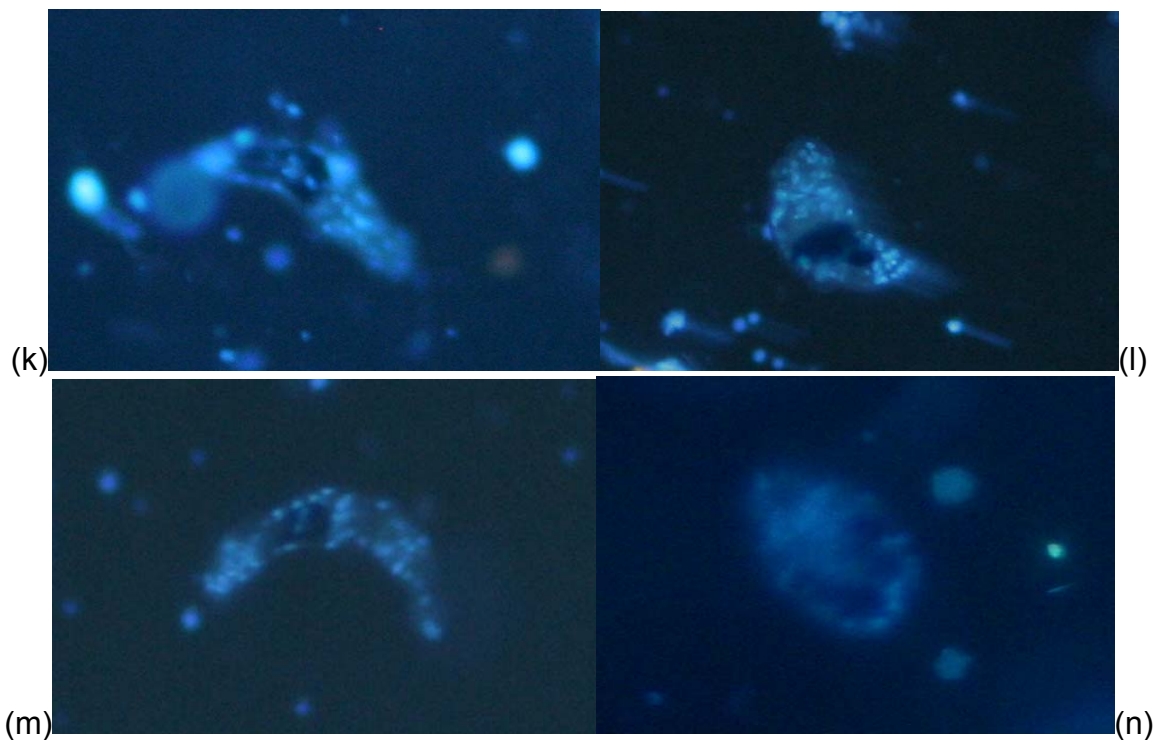


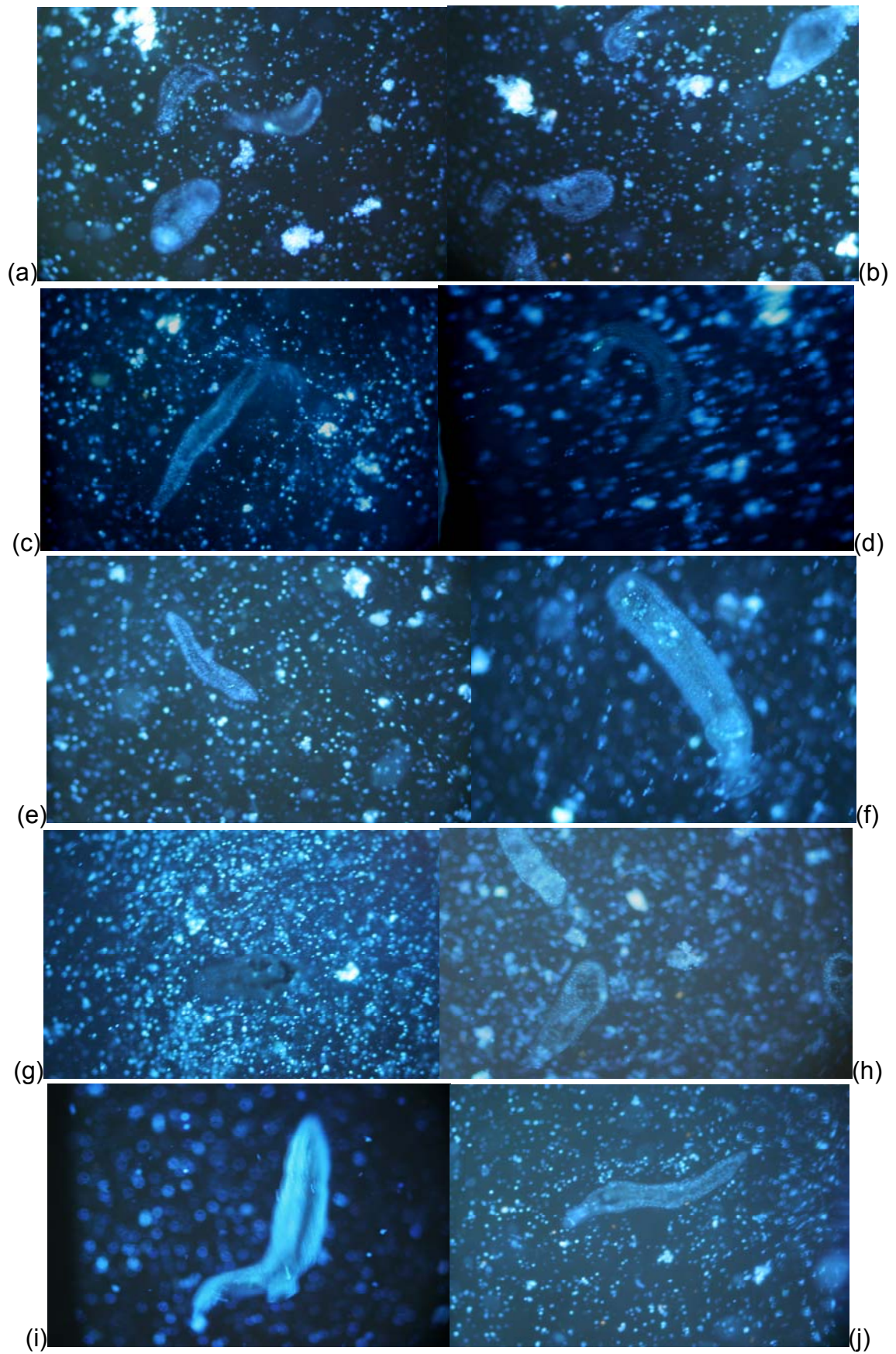
Figura 19 – Marcação dos parasitos com sonda Hoechst 33258 tratados no 14º dpi e coletados 2 horas após tratamento.

(a) e (b) tratamento OXA 400 mg/kg (c) e (d) tratamento OXA 200 mg/kg (e) e (f) tratamento ART 600 mg/kg (g) e (h) tratamento ART 300 mg/kg (i) e (j) tratamento PZQ 800 mg/kg (k) e (l) tratamento PZQ 400 mg/kg (m) e (n) Controle não tratado.

Por se tratar de uma análise qualitativa através da observação da fluorescência do tegumento do verme e como não houve marcação muito intensa semelhante à observada ao padrão de marcação de vermes adultos tratados, não é possível afirmar que houve diferença entre os vermes recuperados dos grupos tratados com OXA 400 mg/kg, ART 600 e 300 mg/kg e PZQ 800 mg/kg comparados ao controle não tratados.



### 4.3.2 Experimento 9- b



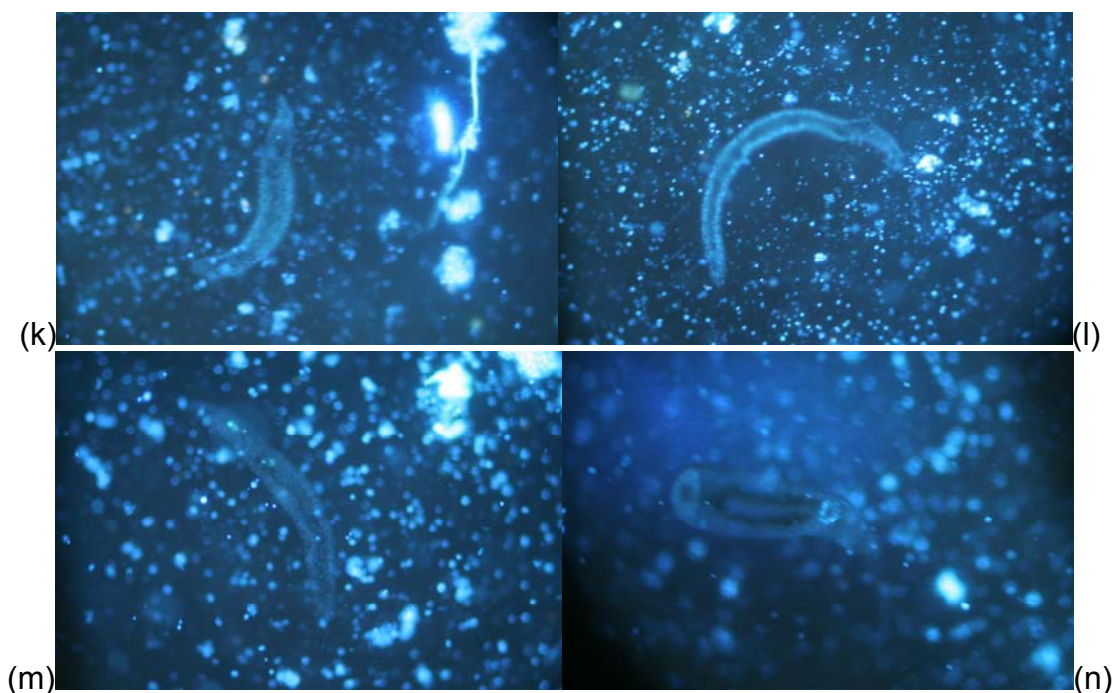


Figura 20 - Marcação dos parasitos com sonda Hoechst 33258 tratados 21º dpi e coletados 2 h após tratamento.

(a) e (b) tratamento OXA 400 mg/kg (c) e (d) tratamento OXA 200 mg/kg (e) e (f) tratamento ART 600 mg/kg (g) e (h) tratamento ART 300 mg/kg (i) e (j) tratamento PZQ 800 mg/kg (k) e (l) tratamento PZQ 400 mg/kg (m) e (n) Controle não tratado.

As marcações foram mais intensas nos vermes que sofreram a ação da droga 21 dias após infecção, principalmente naqueles que se encontravam em estádios de desenvolvimento mais avançados.

Nos experimentos 9-a e 9-b os vermes tratados apresentavam movimentação normal, comparável ao controle não tratado. Também foi visualizada presença de vermes bem marcados e outros com leve marcação em todos os grupos de tratamento dos experimentos 9-a e 9-b.

## **DISCUSSÃO**



## 5 DISCUSSÃO

A esquistossomose pertence ao grupo das doenças tropicais consideradas negligenciadas que poderiam ser controladas com medidas de baixo custo e eficientes intervenções de saúde pública como investimento em saneamento básico, educação e tratamento da população (WHO 2006).

Atualmente, o tratamento da esquistossomose na fase postural da doença é bem estabelecido e tem como arsenal terapêutico disponível no mercado o praziquantel (PZQ) e a oxamniquina (OXA). Entretanto o PZQ é o fármaco recomendado pela OMS para o tratamento da doença, pois apresenta efetividade contra todos os tipos de esquistossomose, é seguro e principalmente de baixo custo (WHO 2006).

Embora a indicação médica para tratamento da esquistossomose ocorra somente quando a infecção é comprovada pela presença de ovos viáveis de parasitas nas fezes e/ou eventualmente nos tecidos (Enk, Katz & Coelho 2008), alguns autores sugerem que o tratamento da esquistossomose durante a fase pré-postural deveria ser melhor estudado, uma vez que através dele poderia se prevenir o desenvolvimento da doença (Coelho et al 1993, Coelho et al 1998, Enk, Katz & Coelho 2008, Coelho, Enk & Katz -inpress, 2009).

A esquistossomose *mansoni* é uma doença que decorre da reação inflamatória granulomatosa em torno dos ovos vivos do parasito (Bogliolo 1959, Warren 1968), seu abortamento na fase pré-postural seria a melhor forma de prevenção de quase toda patogenia da doença.

Inicialmente esse trabalho teve como objetivo determinar quais seriam os estádios evolutivos que apresentam maior ou menor susceptibilidade frente a OXA, PZQ e ART. Para tanto utilizamos o schistograma, uma técnica desenvolvida por Barbosa et al (1978) que estabelece com boa precisão os estádios evolutivos do *S. mansoni* no hospedeiro vertebrado.

O assincronismo apresentado pelo *S. mansoni* pode ser observado claramente nesse trabalho e a distribuição de esquistossômulos recuperados nos grupos controle não tratados foi semelhante a descrita por Barbosa et al (1978) para cada período específico do desenvolvimento. Assim é possível avaliar alterações nas médias de esquistossômulos de cada estágio do schistograma recuperados dos grupos tratados em relação a média de esquistossômulos dos respectivos estádios recuperados do grupo controle não tratado. Dessa forma pode-se determinar qual(is)

estádio(s) seria(m) afetado(s) pelo tratamento. No presente estudo, optou-se por tratar em torno do 15º ou 21º dias de infecção, períodos conhecidamente críticos para sucesso da terapêutica e com o schistograma bem diversificado de estádios evolutivos. No 15º dpi há predomínio de 3º e 4º estágio, vermes ainda no 2º e 1º estádios e apenas alguns esquistossômulos no 5º estágio. Em torno do 23º dia encontra-se mais vermes entre 4º e 5º estádios.

Considerando o tratamento nesta fase inicial da esquistossomose, uma característica importante do *schistosoma* que deve ser considerada é a resposta terapêutica pouco eficiente apresentada neste período. A abordagem do presente estudo é original com o uso do schistograma.

Das drogas utilizadas na clínica médica, o PZQ considerado a principal droga esquistossomicida mostra-se parcialmente eficaz nos primeiros dias de infecção, tornando-se praticamente inativo contra vermes jovens entre 7 a 28 dias (Gönnert and Andrews 1977, Xiao et al 1985, Sabah et al 1986, Utzinger et al 2003, Pica-Mattocchia & Cioli 2003, Ribeiro et al 2004). Os resultados aqui apresentados também demonstraram a baixa eficácia da droga nesta fase da doença. Quando PZQ 400 mg/kg foi administrado no 15º dpi obteve-se apenas 33% de percentual de redução de vermes, e este percentual tornou-se ainda mais baixo quando o tratamento foi realizado no 23º dpi sendo de apenas 26% o percentual de redução de vermes. Para os dois esquemas terapêuticos utilizados o schistograma ficou inalterado o que confirma a menor susceptibilidade das formas jovens ao PZQ. Entretanto, o percentual de redução de *S. mansoni* no 14º dia de infecção encontrado por Xiao, Catto & Webster (1985) foi de 63% que apesar de ser menor que o valor normalmente encontrado para PZQ em tratamento na fase pós-postural foi o dobro do resultado apresentado nesse trabalho. Estas diferenças podem em parte ser justificadas por divergências na metodologia como, por exemplo, pela carga parasitária elevada utilizada nos experimentos deste trabalho (cerca de 200 cercárias). Contudo, resultados semelhantes aos aqui apresentados foram encontrados em estudos com *S. japonicum* que mostraram vermes totalmente resistentes ao PZQ 400 mg/kg do 3º ao 21º dia de infecção, alcançando 47% de percentual de redução de vermes aos 28 dpi (Xiao et al 1987).

Segundo Xiao, Catto & Webster (1985) a eficácia de PZQ contra diferentes estádios de desenvolvimento está associada principalmente a capacidade da droga promover dano no tegumento do verme sendo necessárias altas concentrações da droga para produzir lesões graves.

Dessa forma, foi realizado tratamento com uma dose mais alta de PZQ (800 mg/kg) a fim de verificar se o aumento da dose mudaria essa condição de baixa sensibilidade à droga pelo parasito. Observou-se que PZQ 800 mg/kg promoveu redução estatisticamente significativa de vermes recuperados quando o tratamento foi realizado aos 15 dias de infecção (45%). Neste caso o schistograma mostrou-se alterado, com redução dos esquistossômulos do 4º estágio evolutivo e conseqüentemente no total de esquistossômulos recuperados. O tratamento no 23º dpi acarretou redução estatisticamente significativa no número de vermes do 6º estágio evolutivo e do número total de esquistossômulos recuperados, mas, ao contrário do que se esperava, essa redução não se manteve estatisticamente significativa quando a perfusão foi realizada aos 42 dpi para recuperação de vermes adultos, levando a um percentual de redução de 38%. Este fato possivelmente ocorreu porque, embora a média de esquistossômulos recuperados do grupo tratado com PZQ 800 mg/kg e grupo controle tenha apresentado diferença estatisticamente significativa, esta não foi significativa quando confrontada com a média encontrada nos outros tratamentos e em relação ao controle. Assim, com o amadurecimento dos esquistossômulos essa pequena diferença não foi suficiente para dar resultados estatisticamente significativos.

Segundo Doenhoff et al (1987), a ineficácia do PZQ nestas fases imaturas da infecção parecem estar relacionadas, em parte, com a necessidade de uma resposta imune contra o *S. mansoni* para sua completa eliminação. Na fase inicial da doença o hospedeiro não previamente imunizado ainda não teve tempo de desenvolver resposta adequada contra o parasito. Este fato pode ser ilustrado com estudos em que há redução na carga parasitaria de camundongos infectados e re-infectados e finalmente tratados com PZQ na fase pré-patente da re-infecção (Silva et al 2003, Ribeiro et al 2004). Assim, possivelmente apesar das altas doses usadas em nosso trabalho o efeito do PZQ não foi melhorado por deficiência da resposta imune específica contra o parasito nesta fase da infecção.

A OXA mostra-se efetiva contra o parasito nas fases jovens, com exceção a 3º semana, de acordo com Foster et al (1973). Doses administradas nas fases de pele e pulmonar revelam abortamento da infecção experimental (Coelho et al 1993 e 1998), além de promover a cura de pacientes sabidamente infectados e tratados com OXA 50 mg/kg logo nos primeiros dias de infecção (García Goyco et al 1997, Enk, Katz & Coelho 2008, Coelho, Enk & Katz 2009 *in press*). Resultados compatíveis foram observados nesse estudo, uma vez que OXA 200 mg/kg

administrada no 15º dpi levou a alteração no percentual de redução de vermes que, embora baixa, foi estatisticamente significativa (47%); entretanto, no 23º dia de infecção este percentual de redução de vermes atingiu apenas 27%, confirmando a baixa eficácia da droga neste período. Existem controvérsias na literatura quanto a eficácia da droga administrada no período pré-patente da doença, como exemplo as conclusões de Silva et al (2003). A OXA na dose de 100 mg/kg revelou percentual de redução de vermes entre 28-34% para grupos tratados do 5º ao 20º dpi. No presente trabalho, a alteração no schistograma para o tratamento no 15º reduziu a média de esquistossômulos recuperados por atuar em vermes de 4º estágio evolutivo, revelando ser essa forma evolutiva mais susceptível a ação da OXA nesta fase da infecção. O schistograma do grupo tratado no 23º dpi apresentou redução de esquistossômulos de 6º estágio evolutivo, mas não foi suficiente para promover redução estatisticamente significativa no total de esquistossômulos recuperados.

O aumento da dose de OXA para 400 mg/kg melhorou o desempenho do tratamento, elevando para 55 o percentual de redução de vermes quando os camundongos foram tratados no 15º dia de infecção e para 75% nos que receberam tratamento no 23º dia de infecção, ou seja o aumento da dose melhorou a ação da OXA no período crítico da infecção que é em torno do 21º dpi. Esta melhora talvez tenha sido possível devido ao fato de, ao contrário do PZQ, o mecanismo de ação da OXA não ser tão marcadamente dependente da resposta imune específica do hospedeiro (Cioli, Pica-Mattocia & Archer, 1995). Os esquistossômulos que demonstraram maior susceptibilidade foram de 4º estágio para tratamento no 15º dpi. A quantidade de esquistossômulos recuperados no 5º e 6º estádios foi diminuída quando o tratamento foi no 23º dpi, ou seja, o aumento da dose de OXA para tratamento neste período crítico tornou possível atuar em mais estádios evolutivos sendo uma das possíveis explicações para a eficácia da OXA nesta fase crítica para a terapêutica.

Vale ressaltar que os vermes adultos vivos recuperados dos grupos tratados com OXA 400 mg/kg tinham aspectos de vermes frágeis, eram menores que os vermes recuperados do grupo controle. Machos possuíam “bolhas” escuras no tegumento. Parte das fêmeas apresentava aspecto de imaturas, bem pequenas e com o intestino claro. Nos dois esquemas terapêuticos avaliados o número de vermes imaturos foi estatisticamente maior do que no grupo controle indicando que a droga pode estar retardando o tempo de desenvolvimento dos parasitos.

Dentre as demais drogas testadas para tratamento da esquistossomose destacam-se os derivados de artemisina que mostram maior atividade contra vermes jovens, em torno do 14º ao 22º dia de infecção (Xiao et al 2002, Xiao et al 2004, Shaolong et al 2006), entretanto alguns resultados são divergentes e sua aplicação nesta fase da doença carece de mais investigações.

Estudos conduzidos por Utzinger et al (2002) resultaram em percentual de redução de vermes 67-77% para esquemas terapêuticos realizados com três doses de ART 150 ou 300 mg/kg (7, 21, e 35 dpi). Nesse trabalho doses de 300 mg/kg de ART administradas no 15º ou 23º dias de infecção foram capazes de promover redução no número de vermes estatisticamente significativa, sendo de 61 e 43%, respectivamente. Estudos realizados por Shaohong et al (2006) mostraram 93% de percentual de redução para tratamento com ART 300 mg/kg realizados entre 14º-15º e 20º-21º dpi. Esta diferença em relação ao resultado aqui obtido pode ter ocorrido por diferenças no esquema terapêutico uma vez que o referido trabalho optou por tratar com ART 300 mg/kg em dois dias consecutivos (600 mg/kg no total), enquanto no presente trabalho foi administrado ART 300 mg/kg em dose única.

O schistograma revelou-se alterado com redução estatisticamente significativa nos 3º e 4º estádios para os grupos tratados aos 15 dpi, e 5º e 6º estádios nos grupos que receberam tratamento aos 23 dpi. Estes achados mostram que ART comparado a OXA e PZQ consegue atuar em mais estádios evolutivos e em consequência promover maior redução no total de esquistossômulos recuperados.

Com o aumento da dose de ART para 600 mg/kg obteve-se percentual de redução de vermes de 62 e 58 nos tratamentos realizados no 15º e 23º dpi, respectivamente. Este aumento de dose apenas acarretou em diferença terapêutica para tratamento no 23º dia de infecção. Isso talvez possa ser explicado pelo fato de que ART 600 mg/kg administrado no 15º dpi atuou nos mesmos estádios evolutivos que ART 300 mg/kg ou seja, 3º e 4º estádios evolutivos. Todavia, ART 600 mg/kg promoveu aumento no número de vermes computados como NI (não identificados) por possuírem danos em seu intestino e sua forma, impossibilitando sua classificação dentre os estádios evolutivos. Estes vermes NI podem ter amadurecido, chegando a vermes adultos e talvez possam ser parte dos vermes de estrutura comprometida exemplificados nas figuras 15 (a, b) para grupos tratados no 15º dpi e figuras 17 (b, c) para grupos tratados no 23º dpi. Dessa forma pode-se sugerir que o aumento da dose não gerou diferença na quantidade, mas sim na

“qualidade” de vermes adultos recuperados. Por outro lado, ART 300 mg/kg administrado no 23º dpi atuou apenas nos 5º e 6º estádios, enquanto ART 600 mg/kg no 23º dia atuou diminuindo os esquistossômulos de 4º, 5º e 6º estádios evolutivos. Esta interferência em mais estádios evolutivos pode ter promovido a diferença observada em relação ao percentual de redução de vermes recuperados. Além disso, no tratamento aos 23 dpi houve aumento estatisticamente significativo no número de vermes NI e ao recuperar vermes adultos aos 42 dpi, também foi observada presença de grande número de vermes adultos pouco desenvolvidos.

Nestes experimentos, os vermes recuperados do grupo tratado com PZQ tinham aspecto semelhante aos parasitos recuperados do grupo controle.

As observações de que muitos esquistossômulos recuperados de animais tratados com ART possuíam intestino degradado e ainda, que vermes expostos ao tratamento com OXA ou com ART nos 15º ou 23º dpi e recuperados aos 42 dpi, apresentavam-se mal desenvolvidos nos levou a realizar experimentos, cujos dias de tratamentos foram 14º ou 21º dpi, mas a recuperação dos vermes aos 100 dias de infecção para verificar se este dano seria reversível.

Um fato interessante foi que, vermes recuperados dos grupos tratados com OXA e ART apesar de passados 100 dias após a infecção, mantiveram aparência de frágeis, parte das fêmeas eram claras, pequenas com aspecto de imaturas. Machos apresentavam “bolhas” escuras pelo tegumento. Apesar de acasalados muitos vermes eram bem menores do que os recuperados do controle. Estas observações nos levam a sugerir que o tratamento com estas drogas poderia interferir no desenvolvimento normal dos vermes sobreviventes ao tratamento.

A alteração no oograma dos grupos tratados no 14º ou 21º dpi com OXA 200 mg/kg foram de 46 e 21% respectivamente, e de 63 e 59% quando foi usado OXA 400 mg/kg. Supõe-se que o tratamento com OXA interferiu na maturação sexual dos vermes uma vez que os oogramas alterados foram provenientes de camundongos cujas fêmeas recuperadas tinham aspecto de imaturas.

Nos animais tratados com ART foi encontrada pequena alteração no oograma sendo que ART 300 mg/kg ocasionou 11 e 15% de alteração no oograma para grupos tratados no 14º ou 21º dpi e com ART 600 mg/kg obteve-se 15 e 27% de alteração, respectivamente. De acordo com Araújo, Kohn & Katz, (1999) o tratamento na fase postural com ART é capaz de interromper a postura, mas de forma reversível. Assim o tratamento na fase pré-postural pode não ter afetado a

produção de ovos ou esta interferência da droga já havia sido revertida quando foi realizada a perfusão dos camundongos.

Os tratamentos com OXA e ART nas duas dosagens, usadas no 14º ou 21º dpi promoveram reduções estatisticamente significativas nas médias de vermes adultos recuperados se comparadas com o controle não tratado. Vale lembrar que utilizamos cerca de 50 cercárias nestes experimentos de maior duração o que pode ter contribuído para uma melhor ação da OXA 200 mg/kg no 21º dpi.

O PZQ e derivados de artemisina são eficazes em diferentes estágios de desenvolvimento dos vermes, têm-se sugerido que sua associação seria mais eficaz do que ambas isoladamente (Abdul-Ghani et al 2009). A associação Arthemeter/PZQ utilizada por Xiao et al (2000) para tratamento de coelhos infectados simultaneamente com formas jovens e adultas de *S. japonicum* demonstrou maior atividade que as drogas isoladamente. Resultados promissores também foram encontrados com a associação PZQ/Arthemeter em camundongos infectados com *S. mansoni* e *S. japonicum*, infecção simultânea com vermes imaturos e maduros (Utzinger et al 2001).

A associação PZQ 40 mg/kg / ART 4 mg/kg apresentou maior eficácia terapêutica que as drogas administradas isoladamente no tratamento de escolares nigerianos infectados por *S. haematobium*, apresentando poucos eventos adversos e revelando ser uma associação segura (Inyang-Etoh et al 2008). Entretanto alguns estudos não revelaram vantagem terapêutica na associação PZQ/derivados de artemisina. A combinação PZQ/ART foi administrada por DeClercq et al (2000) em pacientes infectados, de área endêmica para *S. mansoni* mas não houve benefício comparada ao PZQ administrado isoladamente.

No presente trabalho, foram verificadas as alterações ocorridas no schistograma pelas combinações PZQ 400 mg/kg + ART 300 mg/kg e PZQ 800 mg/kg + ART 600 mg/kg em animais com alta carga parasitária, a fim de detectar se o efeito do ART poderia potencializar a atividade de PZQ na fase pré-patente da infecção. Comparando a associação PZQ 400 mg/kg + ART 300 mg/kg administrada no 15º dia de infecção com PZQ 400 isoladamente observou-se uma aparente vantagem terapêutica, pois a droga isolada não altera o schistograma, mas a associação alterou 3º e 4º estádios no schistograma além de reduzir o total de esquistossômulos recuperados. Porém, o perfil apresentado pela associação é o mesmo observado pela administração de ART 300 mg/kg isoladamente e não há diferença estatisticamente significativa entre estes tratamentos. Do mesmo modo

não ocorre diferença estatisticamente significativa entre esta combinação e doses de ART 600 mg/kg ou PZQ 800 mg/kg usados isoladamente em tratamentos.

Era esperado que a associação PZQ 800 mg/kg + ART 600 mg/kg por efeito de sinergismo ou aditividade fosse capaz de eliminar completamente os esquistossômulos, já que se trata de uma combinação usando o dobro da dose usual usada para camundongos. Contudo este resultado esperado não ocorreu, e o perfil do schistograma encontrado para associação foi semelhante ao do ART 600 mg/kg usado isoladamente. Talvez, melhor desempenho seria obtido se a associação fosse utilizada em infecções mistas, com vermes adultos e imaturos (Utzinger et al 2001). Aumento na dose da associação não levou a diferença estatisticamente significativa na média de esquistossômulos recuperados.

Quando as associações foram administradas no 21º dia de infecção, percebeu-se que o tratamento com PZQ 400 mg/kg + ART 300 mg/kg apresentou o perfil de schistograma semelhante ao obtido com ART 300 mg/kg isoladamente, apresentando diferença estatisticamente significativa apenas em relação ao tratamento com PZQ.

Novamente, observou-se que a associação PZQ 800 mg/kg + ART 600 mg/kg apresentou perfil do schistograma semelhante à administração isolada de ART 600 mg/kg, apresentando diferença estatisticamente significativa apenas em relação aos grupos tratados com PZQ. O aumento da dose para PZQ 800 mg/kg + ART 600 mg/kg não levou a diferenças estatisticamente significativas em relação ao grupo tratado com PZQ 400 mg/kg + ART 300 mg/kg.

Os resultados aqui apresentados permitem inferir que o melhor tratamento testado para o 15º dia de infecção seria ART 600 mg/kg já que esta dose promoveu maior alteração no schistograma, comparável ao efeito das associações e superior ao das drogas isoladamente. Pelos mesmos motivos pode-se sugerir que para grupos tratados no 23º dia de infecção, a droga e dosagem que promove maior alteração no schistograma seria ART 600 mg/kg. Além disso, os tratamentos tanto no 15º quanto 21º dpi não mostraram aumento na mortalidade dos camundongos se comparado as doses menores ou controle, sugerindo que esta dose é pelo menos em parte segura para tratamento experimental de camundongos. Também foi observado que em todos os grupos tratados com ART houve aumento estatisticamente significativo nos esquistossômulos classificados por NI, o que nos sugere capacidade do ART interferir no perfeito desenvolvimento dos esquistossômulos, como discutido anteriormente.



Diversos estudos demonstram que PZQ e derivados da artemisina atuam promovendo danos no tegumento de schistosomas (Mehlhorn et al 1981, Doenhoff et al 1988, Xiao et al 2002, Jiraungkoorskul et al 2006).

Nesse estudo foi utilizada sonda Hoechst 33258 a fim de verificar a extensão do dano causado pelos tratamentos. Em todos os experimentos as marcações foram pouco intensas e não seguiram o padrão de marcação observado em vermes adultos, isso dificulta a análise dos resultados uma vez que é feita de maneira qualitativa. Contudo, pode-se sugerir que nos tratamentos realizados aos 15 dpi os esquistossômulos recuperados dos grupos tratados com OXA 400 mg/kg, ART 600 e 300 mg/kg e PZQ 800 mg/kg apresentavam marcação ligeiramente mais intensa que os outros grupos.

De fato, era de se esperar que os grupos tratados com ART apresentassem marcação mais intensa que os demais. Em todos os experimentos observou-se nos esquistossômulos recuperados dos grupos tratados com ART a presença de vermes com intestino deteriorado, dessa forma não se pode excluir a hipótese que havia dano no tegumento também. Estudos de microscopia eletrônica demonstraram que Artemether foi capaz de causar danos extensos no tegumento de esquistossômulos de 21 dias (Xiao et al 2000), o que poderia justificar esses achados.

Apesar de diversos trabalhos mostrando que PZQ promove danos no tegumento de schistosomas, estudos sugerem que estágios imaturos de desenvolvimento do *S. mansoni* são mais resistentes à formação de vesículas que as formas maduras do parasito, quando tratadas com PZQ (Xiao et al 1985), o que talvez reflita a pequena sensibilidade de vermes imaturos à droga. Associado a este fato ainda pode-se lembrar a ausência de resposta imune eficiente formada contra o parasito que normalmente atua em sinergia com o PZQ na fase adulta (Fallon et al 1992, Ribeiro et al 2004). Isso poderia justificar o fato da marcação ligeiramente mais intensa apenas nos vermes pertencentes aos grupos tratados com a maior dose PZQ 800 mg/kg.

Quanto aos vermes coletados dos grupos tratados com OXA, apenas na maior dosagem nota-se esquistossômulos marcados um pouco mais intensamente. Esta observação está de acordo com os resultados encontrados em estudos com vermes adultos, onde parasitos recuperados de grupos tratados com OXA 200 mg/kg foram expostos a várias sondas de marcação de dano no tegumento, sendo marcados apenas com a sonda mais sensível, sugerindo que OXA possivelmente promove danos menos intensos no tegumento dos parasitos (Oliveira 2005).

Outra observação feita foi que principalmente nos grupos tratados com OXA 400 mg/kg, ART 300 e 600 mg/kg e PZQ 800 mg/kg houve presença de vermes bem marcados e outros com leve marcação, o que leva a sugerir por exemplo, que talvez os vermes pouco marcados sejam os que sobrevivem quando o tratamento é feito nesta fase da infecção ou ainda poderia ser necessário aguardar tempo maior depois do tratamento para a perfusão, permitindo a recuperação completa e inquestionável destes vermes.

É necessário reforçar que como dito anteriormente, a marcação fora do padrão encontrado para vermes adultos inspira cuidados ao formular estes comentários.

Finalmente, com todos estes resultados pretende-se contribuir para elucidar de maneira inovadora, algumas dificuldades da terapêutica experimental na fase pré-postural da doença, revelando os estádios mais sensíveis aos esquemas terapêuticos testados. A observação dos vermes realizada longo período após quimioterapia é original e mostrou que muitos vermes não conseguem atingir o estágio de adulto. Pela sua relevância estes achados devem ser levados em conta em ensaios sobre desenvolvimento de drogas esquistosomicidas.

## **CONSIDERAÇÕES**

## 6 CONSIDERAÇÕES

A partir do presente estudo pode-se considerar que:

1. Os tratamentos acarretaram alterações nos estádios do *S. mansoni* avaliados pelo schistograma,
2. Os grupos tratados com ART 300 mg/kg e 600 mg/kg apresentaram maior redução no percentual de vermes adultos recuperados em tratamentos realizados no 15º ou 23º dpi comparados as outras drogas testadas,
3. A OXA 200 mg/kg não foi eficaz na redução do percentual de vermes adultos recuperados para grupos tratados aos 23 dpi, confirmando estudos anteriores, entretanto a dose 400 mg/kg mostrou atividade de 75% (percentual de redução de vermes),
4. O PZQ apenas alterou schistograma na dose 800 mg/kg, no 15º dpi promovendo redução estatisticamente significativa no percentual de vermes adultos recuperados (45%),
5. As alterações no desenvolvimento dos vermes tratados no período pré-patente com OXA e ART são irreversíveis na maior parte da população sobrevivente ao tratamento,
6. O ART 600 mg/kg leva a alterações morfológicas no intestino de esquistossômulos com tal impacto que impede sua classificação no schistograma,
7. As associações PZQ 400 mg/kg + ART 300 mg/kg e PZQ 800 mg/kg + ART 600 mg/kg não causam alterações no schistograma mais significativas do que o ART 600 mg/kg administrado isoladamente. A média de esquistossômulos recuperados não apresenta diferenças estatisticamente significativas entre estes grupos,
8. Grupos tratados com os esquemas anteriores e em seguida expostos a sonda Hoechst 33258 sugerem maior dano no tegumento dos grupos tratados com OXA 400 mg/kg, ART 300 mg/kg e 600 mg/kg e PZQ 800 mg/kg.

## **Perspectivas**

## 7 Perspectivas

- Avaliar a susceptibilidade do parasito a associação OXA + ART durante a fase pré-patente da infecção.
- Avaliar o dano no tegumento do verme imaturo exposto as drogas por marcação por sonda, usando-se de métodos quantitativos.
- Testar a ação no parasito de outros derivados de artemisina, como por exemplo, o Artemeter.

## **CONCLUSÕES**

## 8 CONCLUSÕES

Foram demonstradas diferenças estatisticamente significativas na susceptibilidade entre os estádios evolutivos do parasito, principalmente em relação aos tratamentos com Oxamniquina e Artesunato. Por outro lado, confirmou-se a pequena sensibilidade do parasito quando o tratamento é realizado com Praziquantel no período pré-patente da esquistossomose. O estudo revela que a exposição a Oxamniquina e ao Artesunato, na fase pré-postural, compromete o desenvolvimento do verme que sofre alterações morfológicas, em sua maioria irreversíveis. Entretanto, foi observado que o tratamento com Artesunato atua em mais estádios evolutivos em relação a Oxamniquina e Praziquantel. Assim, pode-se inferir que dentre os tratamentos testados para infecção entre o décimo-quarto e vigésimo-terceiro dia, o Artesunato revelou ser a droga mais eficiente no tratamento na fase pré-postural da esquistossomose.

Uma droga que atua eficientemente na fase pré-postural tem o potencial de prevenir toda patologia resultante de uma infecção com vermes adultos, produzindo ovos, os elementos fundamentais da patogenia da esquistossomose.



## **Referências**

## 9 REFERÊNCIAS

- Abdul-Ghani R, Loutfy N, Sahn AE, Hassan A. Current chemotherapy arsenal for schistosomiasis mansoni: alternatives and challenges. *Parasitol. Res.* 2009. Abr; 104(5):955-65
- Andrade ZA, Azevedo TM. A contribution to the study of the acute schistosomiasis (an experimental trial). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 1987 Jul-Set; 82 (3): 311-17
- Andrade ZA, Azevedo TM. A patologia da esquistossomose humana. In: Carvalho OS, Coelho PMZ, Lenzi HL (Orgs.). *Schistosoma mansoni e Esquistossomose: uma visão multidisciplinar.* Rio de Janeiro: Ed. Fiocruz, 2008. p. 549-68.
- Aragon AD, Blackburn R, Cupit PM, Melman SD, Goronga T, Webb T, Loker ES, et al. Towards an understanding of the mechanism of action of PZQ . *Mol and Bioc Parasitol.* 2009 Mar; 164(1):57-65
- Araújo N, Kohn A, Katz N. Activity of the artemether in experimental Schistosomiasis mansoni. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 1991: 86 supl 2: 185-8
- Araújo N, de Souza CP, Passos LK, Simpson AJ, Dias Neto E, Pereira TR, et al Susceptibility to chemotherapeutic agents of *Schistosoma mansoni* isolates from patients treated with oxamniquine and PZQ and not cured. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 1996 Set-Out; 29(5):467-6
- Araújo N., Kohn A., Katz N. Therapeutical evaluation of the artesunate in experimental *Schistosoma mansoni*. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 1999 Jan-Fev; 32(1):7-12
- Barbosa MA, Pellegrino J, Coelho PMZ, Sampaio IBM. Quantitative aspects of the migration and evolutive asynchronism of *Schistosoma mansoni* in mice. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo.* 1978 Mai-Jun; 20(3): 121-32.

Barbosa CS, Favre TC, Amaral RS, Pieri OS. Epidemiologia e Controle da Esquistossomose Mansonii, In: Carvalho OS, Coelho PMZ, Lenzi HL (Orgs.). *Schistosoma mansoni e Esquistossomose: uma visão multidisciplinar*. Rio de Janeiro: Ed. Fiocruz, 2008. p. 965-08

Bergquist R. A century of schistosomiasis research. *Acta Trop.* 2008 Nov-Dez;108(2-3):65-8.

Bezerra FSM. Moluscos Transmissores do *Schistosoma mansoni*. In: Neves DP. *Parasitologia Humana*. 11° ed. São Paulo: Atheneu, 2005 .p. 193-12.

Blair KL, Bennett JL, Pax RA PZQ: physiological evidence for its site(s) of action in magnesium-paralysed *Schistosoma mansoni*. *Parasitology*. 1992 Feb; 104(1):59-6.

Bogliolo L. Schistosomiasis mansoni. Pathology. *Rev. Bras. Malariol. Doenças. Trop.* 1959 Apr-Jul;11:359-24

Bonesso-Sabadini PIP & Souza Dias LC. Altered response of strain of *Schistosoma mansoni* to Oxamniquine and Praziquantel. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 2002 Abr; 97(3):381-5

Botros S, Soliman N, El-Gawhary, Selim 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: 86-9

Botros S, Pica-Mattoccia L, William S, El-Lakkani N, Cioli D. Effect of PZQ on the immature stages of *Schistosoma haematobium*. *Int J Parasitol.* 2005 Nov; 35(13):1453-7.

Campos R, Pinto PLS, Moreira AAB, Sant'ana EJ, Padilha LAA, Leval E et al. Terapêutica experimental da esquistossomose mansônica em período pré-patente com associação oxamniquine e praziquantel. XXI Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. São Paulo; 1985 Fev 3 – 8; São Paulo, Brasil.1985.

Chippaux JP, LE Hesran JY, Garcia A, Brasseur. P Letters to the editor. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2003; 69(1), p.1–2

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

Cioli D, Pica-Mattoccia L, Moroni R. *Schistosoma mansoni*: hycanthone/oxamniquine resistance is controlled by a single autosomal recessive gene. *Exp. Parasitol.* 1992 Dez; 75(4):425-32

Cioli D, Pica-Mattoccia L, Archer S Drug resistance in schistosomes. *Parasitol. Today.* 1993 Mai;9(5):162-6

Cioli D, Pica-Mattoccia L, & Acher S. Antichistosomal drugs: past, present ... and future? *Pharmacol. Ther.* 1995; 68: 35-85

Cioli D. Chemotherapy of Schistosomiasis: an update. *Parasitol. Today* 1998; 14(10): 418-22

Cioli D. PZQ: Is there real resistance and there alternatives? *Curr. Opin. Infect. Dis.* 2000 Dez; 13 (6): 659-63.

Coelho PMZ, Mello RT, Gerken SE. *Schistosoma mansoni*: evaluation of the activity of oxamniquine on schistosomules, at 24 hours after infection. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo.* 1993; 35(6): 557-61.

Coelho PMZ, Lima FCS, Nogueira JAM. Resistance to oxamniquine of a *Schistosoma mansoni* strain isolate from a patient submitted to repeated treatments. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo.* 1997; 39: 101-6.

Coelho PMZ, Ribeiro F, Mello RT, Lima e Silva FC, Nogueira-Machado JA. Activity of oxamniquine skin, pulmonary and sexual maturation phases, on a *Schistosoma mansoni* strain (R1) previously reported as resistant at the adult phase. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 1998; 93: 267-8.

Coelho PMZ, Enk MJ, Katz N. Treatment of clinical schistosomiasis at the prepatent phase: an option? *Trends Parasitol.* In press 2009.

Coles GC. Drug resistance or tolerance in schistosomes? *Trends Parasitol.* News & Comment. 2002 Jul;18(7):294

Daneshmend TK, Homeida MA. Oxamniquine pharmacokinetics in hepatosplenic schistosomiasis in the Sudan. *J Antimicrob. Chemother.* 1987 Jan; 19(1):87-93.

De Clercq D, Vercruyse J, Verlé P, Kongs A, Diop M. What is the effect of combining artesunate and praziquantel in the treatment of *Schistosoma mansoni* infections? *Trop. Med. Inter. Health.* 2000 Out; 5(1):744-6

Diaz-Rivera AS, Ramos-Morales F, Kopisch E, Garcia-Palmieri MR, Cintron-Rivera AA, Marchand EJ et al. Acute manson's Schistosomiasis. *Am. J. Med.* 1956; 21: 918-43.

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

Doenhoff MJ, Sabah AA, Fletcher C, Webbe G, Bain J. Evidence for an immune-dependence reaction of Praziquantel on *Schistosoma mansoni* in mice. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 1987; 81, 947-51

Doenhoff MJ, Modha J, Lambertucci JR. Anti-schistosome chemotherapy enhanced by antibodies specific for a parasite esterase. *Immunology.* 1988 Dez;65(4):507-10.

El-Bassiouni EA, Helmy MH, Saad EI, El-Nabi Kamel MA, Abdel-Meguid E, Hussein HS. Modulation of the antioxidant defence in different developmental stages of *Schistosoma mansoni* by PZQ and artemether. *Br. J. Biomed. Sci.* 2007; 64(4):168-74.

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: 139-46

Enk MJ, Caldeira RL, Carvalho OS, Schall VT. Rural tourism as risk factor for the transmission of schistosomiasis in Minas Gerais, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 2004; 99- 5 Suppl 1:105-8.

Enk MJ, Katz N, Coelho PMZ. A case of *Schistosoma mansoni* infection treated during the prepatent period. *Natur. Clin. Prac.* 2008 fev; 5(2): 112-5

Fallon PG, Cooper RO, Probert AJ, Doenhoff MJ. Immune-dependent chemotherapy of schistosomiasis. *Parasitology.* 1992; 105:S41-S48

Fallon PG & Doenhoff MJ. Drug-resistant schistosomiasis: resistance to PZQ and Oxamniquine induced in *Schistosoma mansoni* in mice is drug specific. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1994; 51:83-8.

Faust EC, Jones CA, Hoffmam WA. Studies on schistosomiasis mansoni in Puerto Rico . III- Biological studies. 2. The mammalian phase of the life cycle. *Puerto Rico Journ Publ Healt Trop Med.* 1934; 10: 133-96.

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

Ferreira H, Oliveira CA, Bittencourt D, Katz N, Carneiro LFC, Grinbaum E, et al. A fase aguda da esquistossomose mansoni. Considerações sobre 25 casos observados em Belo Horizonte. *J. Bras. Med.* 1966; 11: 54-67

Foster R, Mesmer ET, Chetham BL, King DF. The control of immature *Schistosoma mansoni* in mice by UK 3883, a novel 2- aminomethyltetrahydroquinoline derivate. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 1971; 65:221-32

Foster R, Mesmer ET, King DF. Studies with the schistosomicide Oxaminiquine (UK 4271). I activity in rodents and in vitro. *Trans.R.Trop.Med.Hyg.*1973; 67:674-84.

Frohberg H, Schulze Schencking M. Toxicological profile of PZQ, a new drug against cestode and schistosome infections, as compared to some other schistosomicides. *Arzneimittelforschung.* 1981;31(3a):555-65.

García Goyco C, Nazario-López H, Ruiz-Tiben E, Vázquez G, Borges T, Nash TE. The efficacy of oxamniquine in acute schistosomiasis: a clinical analysis of 28 treated patients. *Bol. Asoc. Med. P. R.*1997 Apr-Jun;89(4-6):63-9

Gönnert R & Andrews P. PZQ, a New Broad-spectrum Antischistosomal Agent. *Z. Parasitenk.* 1977; 52, 129-50

Grandière-Pèrez L, Ansart S, Paris L, Faussart A, Jaureguiberry S, Grivois JP, et al Efficacy of PZQ during the incubation and invasive phase of *Schistosoma haematobium* schistosomiasis on 18 travelers. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2006; 74(5) pp. 814–8.

Gryseels B, Stelma FF, Talla I, van Dam GJ, Polman K, Sow S, et al. Epidemiology, immunology and chemotherapy of *Schistosoma mansoni* infections in a recently exposed community in Senegal. *Trop Geogr Med.*1994 ; 46(4 Spec No):209-19.

Gryseels B, Mbaye A, de Vlas SJ, Stelma FF, Guissé F, Van Lieshout L, et al. Are poor responses to praziquantel for the treatment of *Schistosoma mansoni* infections

in Senegal due to resistance? An overview of the evidence. *Trop Med Inter Health*. 2001 Nov; 6: 864-73.

Harnett W & Kusel JR. Increased exposure of parasite antigens at the surface of adulte male *Schistosoma mansoni* exposed to praziquantel in vitro. *Parasitology*. 1986; 93: 401-5.

Hiatt AS, Sotomayor R, Sanchez G, Zambrana M, Knight WB. Factors in the patogenesis of acute schistosomiasis mansoni. *J. Infect. Dis.* 1979; 139: 659-66.

Inyang-Etoh PC, Ejezie GC, Useh MF, Inyang Etoh EC. Efficacy of a combination of praziquantel and artesunate in the treatment of urinary schistosomiasis in Nigeria. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 2008; 103: 38-44

Ismail MM, Farghaly AM, Dyab AK, Afify HA, El-Shafei MA. Resistance to PZQ, effect of drug pressure and stability test. *J. Egypt. Soc. Parasitol.* 2002 Ago; 32(2):589-00

Jaoko WG, Muchemi G, Oguya FO. PZQ side effects during treatment of *Schistosoma mansoni* infected pupils in Kibwezi, Kenya. *East Afr. Med. J.* 1996 Ago; 73(8):499-01

Jiraungkoorskul W, Sahaphong S, Sobhon P, Riengrojpitak S Kangwanransan N. *Schistosoma mekongi*: The in vitro effect of praziquantel and artesunate on the adult fluke *Exp. Parasitol.* 2006 mai;113(1)16-23

Katz N, Chaves A, Pellegrino J. A simple device for quantitative stool thick-smear technique in schistosomiasis mansoni. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo.* 1972; (14): 397-00.

b- Katz N, Grinbaum E, Chaves A, Zicker F, Pellegrino J. Clinical trials with oxamniquine, by oral route, in schistosomiasis mansoni. 1976. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo.* 1976 Sep-Oct; 18(5):371-7.



Katz N, Zicker F, Pereira JP. Field trials with oxamniquine in a Schistosomiasis mansoni-endemic area. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1977 Mar; 26(2):234-7

KATZ, N. Terapêutica Experimental e Clínica na Esquistossomose mansoni. 2005. xix, 79 f. Tese (doutorado) - Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas René Rachou, Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, Área de Concentração: Doenças Infecciosas e Parasitárias, Belo Horizonte, 2005, il. Biblioteca de Ciências da Saúde Prof. Zigman Brener

Kokwaro GO, Taylor G. Oxamniquine pharmacokinetics in healthy Kenyan African volunteers. *East. Afr. Med. J.* 1991 Mai; 68(5):359-64.

Kohn AB, Anderson PA, Roberts-Misterly JM, Greenberg RM. Schistosome calcium channel beta subunits. Unusual modulatory effects and potential role in the action of the antischistosomal drug praziquantel. *J. Biol. Chem.* 2001 Out; 276(40):36873-6.

Lage, RCG. O efeito da pressão seletiva com praziquantel na diversidade genética da cepa LE de *Schistosoma mansoni*. 2005. Dissertação (mestrado) Universidade Federal de Ouro Preto. Programa de Pós-Graduação do Departamento de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto. Área de Concentração: Biologia Molecular. Ouro Preto, 2005 il.

Le WJ, You JQ, Mei JY. Chemotherapeutic effect of artesunate in experimental schistosomiasis. *Acta. Pharm. Sin.* 1983 Ago; 18(8):619-21

Lenzi LH, Jurberg AD, Coelho PMZ, Lenzi JA. Migração e desenvolvimento de *Schistosoma mansoni* no hospedeiro definitivo. In: Carvalho OS, Coelho PMZ, Lenzi HL (Orgs.). *Schistosoma mansoni e Esquistossomose: uma visão multidisciplinar*. Rio de Janeiro: Ed. Fiocruz, 2008. p. 85-45.

Leopold G, Ungethüm W, Groll E, Diekmann HW, Nowak H, Wegner DH. Clinical pharmacology in normal volunteers of PZQ, a new drug against schistosomes and cestodes. An example of a complex study covering both tolerance and pharmacokinetics. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 1978 Dez; 14(4):281-91

Lu SH, Yan XL, Li SW, Wu LJ, Shi JF, Liu X, Yan XH, Yang MJ, Lou LJ, Kumagai T, Wen LY, Ohta N. Prophylactic effect of artesunate against experimental infection of *Schistosoma mansoni*. *Chinese Journal of Parasitology & Parasitic Diseases*. 2004 Feb; 22(1):20-3

Mandour ME, el Turabi H, Homeida MM, el Sadig T, Ali HM, Bennett JL, Leahey WJ, Harron DW. Pharmacokinetics of PZQ in healthy volunteers and patients with schistosomiasis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 1990 Mai-Jun; 84(3):389-93.

Medeiros MV, Andrade ZA. The importance of collateral portal veins for resistance to schistosomiasis in mice. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 1986;19(1):85-8.

Mehlhorn H, Becker B, Andrews P, Thomas H, Frenkel JK. In vivo and in vitro experiments on the effects of PZQ on *Schistosoma mansoni*. A light and electron microscopic stud. *Arzneimittelforschung*.1981; 31(3a):544-54.

Na-Bangchang K, Krusood S, Silacamroon U, Molunto P, Tasanor O , Chalermrut K et al. The pharmacokinetics of oral dihydroartemisinin and artesunate in healthy Thai volunteers. *Southeast. Asian. J. Trop. Med. Publ. Health*. 2002 Set; 35(3):575-82

Oliveira, FA. Avaliação do efeito do praziquantel, da oxamniquina e da associação destas drogas sobre o verme adulto de *Schistosoma mansoni*. 2005. Dissertação (mestrado). Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas René Rachou, Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, área de Concentração: Doenças Infecciosas e Parasitárias, Belo Horizonte, 2005, il. Biblioteca de Ciências da Saúde Prof. Zigman Brener.

Pax R, Bennett JL, Fetterer R. A benzodiazepine derivative and PZQ: effects on musculature of *Schistosoma mansoni* and *Schistosoma japonicum*. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 1978 Out ; 304(3):309-15.

Pellegrino J & Siqueira AF. Técnica de perfusão para colheita de *Schistosoma mansoni* em cobaias experimentalmente infectadas. *Rev. Bras. Malariol. Doenças Tropicais*. 1956; 8: 589-97.

Pellegrino J & Katz N. Experimental chemotherapy of *Schistosoma mansoni*. *Adv. Parasitol.* 1968; 6:233-91

Pellegrino J, Katz N, Dias EP. Experimental chemotherapy of schistosomiasis. VII- Laboratory trials with oxamniquine, a new antischistosomal agent. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo.* 1973. 15 supl 1: 10-14

Pica-Mattoccia L, Cioli D. Sex- and stage-related sensitivity of *Schistosoma mansoni* to in vivo and in vitro PZQ treatment.. *Int. J. Parasitol.* 2004; (34)527-33.

Pica-Mattoccia L, Carlini D, Guidi A, Cimica V, Vigorosi F, Cioli D. The schistosome enzyme that activates oxamniquine has the characteristics of a sulfotransferase. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* .2006; 101(1):307-12.

Pica-Mattoccia L, Orsini T, Basso A, Festucci A, Liberti P, Guidi A, et al. *Schistosoma mansoni*: lack of correlation between praziquantel-induced intra-worm calcium influx and parasite death. *Exp. Parasitol.* 2008; 119(3):332-5.

Rabello A, Pontes LA, Enk MJ, Montenegro SML, Morais CNL. Diagnóstico Parasitológico, Imunológico e Molecular da Esquistossomose Mansonii. In: Carvalho OS, Coelho PMZ, Lenzi HL (Orgs.). *Schistosoma mansoni e Esquistossomose: uma visão multidisciplinar*. Rio de Janeiro: Ed. Fiocruz, 2008. p. 895-25

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

Ribeiro, F Mello RT, Tavares CA, Kusel JR, Coelho PM. 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, 231-3.

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

Sabah, A.A., Fletcher, C., Webbe, G., Doenhoff, MJ. *Schistosoma mansoni*: chemotherapy of infections of different ages. *Exp. Parasitol.* 1986; 61, 294-03.

Shaohong L, Kumagai T, Qinghua A, Xiaolan Y, Ohmae H, Yabu Y, et al. Evaluation of the anthelmintic effects of artesunate against experimental *Schistosoma mansoni* infection in mice using different treatment protocols. *Parasitol. Int.* 2006 Mar; 55(1):63-8.

Silva LC, Sette HJ, Chamone DAF, Saez-Alquezar A, Punksas JA, Raia S. Clinical trials with oral oxamniquine (UK 4271) for the treatment of mansonian schistosomiasis. *Rev. Med. Trop. São Paulo.* 1974 Mar-Abr; 16(2): 103-9

Silva LM, Menezes RMC, Oliveira SA, Andrade ZA. Chemotherapeutic effects on larval stages of *Schistosoma mansoni* during infection and re-infection of mice. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 2003 Mai-Jun; 36(3): 335-41

Smithers SR, Terry RJ The infection of laboratory hosts with cercariae of *Schistosoma mansoni* and the recovery of adults worms. *Parasitology* 1965; 55: 695-00.

Steiner K, Garbe A, Diekmann HW, Novak H. The fate of PZQ in organism.I:Pharmacokinetics in animals. *Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet.* 1976; (1): 85-95.

Stelma FF, Talla A, Sow S, Kongs A, Nang M, Polmam K, et al Efficacy and side effects of praziquantel in an epidemic focus of *Schistosoma mansoni*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1995. 53(2): 167-70.

Stelma FF, Sall S, Daff B, Sow S, Niang M, Gryseels B. Oxamniquine cures *Schistosoma mansoni* infection in a focus in which cure rates with praziquantel are unusually low. *J. Infect. Dis.* 1997 Jul; 176(1): 304-7

Utzinger J, Chollet J, You J, Mei J, Tanner M, Xiao S Effect of combined treatment with praziquantel and artemether on *Schistosoma japonicum* and *Schistosoma mansoni* in experimentally infected animals. *Acta Trop.* 2001; 80: 9-18

Tanaka M, Ohmae H, Utsunomiya H, Nara T, Irie Y, Yasuraoka K. A comparison of the antischistosomal effect of levo- and dextro-PZQ on *Schistosoma japonicum* and *S. mansoni* in mice. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1989 Ago; 41(2):198-03.

Utzinger J, N'goran EK, N'dri A, Lengeler C, Tanner M. Efficacy of PZQ against *Schistosoma mansoni* with particular consideration for intensity of infection. *Trop. Med. Int. Health.* 2000 Nov.; 5 (11): 771-8.

Utzinger J, Chollet J, Tu Z, Xiao S, Tanner M. Comparative study of the effects of artemether and artesunate on juvenile and adult *Schistosoma mansoni* in experimentally infected mice. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 2002 Mai-Jun; 96(3):318-23

Utzinger J, Keiser J, Shuahua X, Tanner M, Singer BH. Minireview. Combination Chemotherapy of Schistosomiasis in Laboratory Studies and Clinical Trials. *Antimicrob. Agents. and Chemother.* 2003 Mai; p. 1487-95.

Valle C, Troiani AR, Festucci A, Pica-Mattocchia L, Liberti P, Wolstenholme A, et al. Sequence and level of endogenous expression of calcium channel beta subunits in *Schistosoma mansoni* displaying different susceptibilities to PZQ. *Mol. Biochem. Parasitol.* 2003 Ago; 31-130(2):111-5

Xiao SH, Catto BA, Webster LT Jr. Effects of PZQ on different developmental stages of *Schistosoma mansoni* in vitro and in vivo. *J Infect Dis.* 1985 Jun; 151(6):1130-7.

Xiao SH, Yue WJ, Yang YQ, You JQ. Susceptibility of *Schistosoma japonicum* to different developmental stages to PZQ. *Chin. Med. J. (Engl).* 1987 Set; 100(9):759-68.

Xiao SH, Yin JW, Mei JY, You JQ, Li Y, Jiang HJ. Effect of arteether on *Schistosoma japonicum*. *Acta Pharmac. Sin.* 1992; 27(3):161-5.

Xiao SH, You JQ, Mei JY, Guo HF, Jiao PY, Sun HL, et al. Effect of artemether on glucose uptake and glycogen content in *Schistosoma japonicum*. *Acta Pharmacol.* 1997 Jul;18(4):363-7.

Xiao SH, You JQ, Mei JY, Guo HF, Li Y, Jiao PY, Tanner M. Effect of praziquantel together with artemether on *Schistosoma japonicum* parasites of different ages in rabbits. *Parasitol. Int.* 2000; 49: 25-30

Xiao SH, Tanner M, N'Goran EK, Utzinger J, Chollet J, Bergquist R. Recent investigations of artemether, a novel agent for the prevention of schistosomiasis japonica, mansoni and haematobia. *Acta Trop.* 2002; 82:175-81

a- Xiao SH, Shen B, Utzinger J, Chollet J, Tanner M. Transmission electron microscopic observations on ultrastructural damage in juvenile *Schistosoma mansoni* caused by artemether. *Acta Trop.* Jan 2002; 81 (1): 53-61.

b- Xiao SH, Shen B, Utzinger J, Chollet J, Tanner M. Ultrastructural Alterations in Adult *Schistosoma mansoni* Caused by Artemether *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* . 2002 Jul; 97(5): 717-24

Xiao SH, Guo J, Chollet J, Wu JT, Tanner M, Utzinger J. Effect of artemether on *Schistosoma mansoni*: dose-efficacy relationship, and changes in worm morphology and histopathology. *Chinese journal of parasitology and parasitic disease.* 2004 Jun; 22(3):148-53

Xiao SH. Development of antischistosomal drugs in China, with particular consideration to PZQ and artemisinins. *Acta Trop.* 2005; (96). 153-67.

Warren KS. Pathophysiology and pathogenesis of hepatosplenic schistosomiasis mansoni. *Bull N Y Acad Med.* 1968 Mar; 44(3):280-94

World Health Organization 2006 – Preventive Chemotherapy in Human Helminthiasis. Coordinated use of anthelmintic drugs in control interventions: a manual for health professionals and programme managers. Disponível em: <[http://whqlibdoc.who.int/publications/2006/9241547103\\_eng.pdf](http://whqlibdoc.who.int/publications/2006/9241547103_eng.pdf)> Acesso: 15 Jul. 2008

World Health Organization 2007. Control of Neglected Tropical diseases. Programmes and projects. PCT Databank. Schistosomiasis. Countries x indicators. 2007. Disponível em: <[http://www.who.int/neglected\\_diseases/preventive\\_chemotherapy/sch/en/](http://www.who.int/neglected_diseases/preventive_chemotherapy/sch/en/)> Acesso em: 22 Jan. 2009.

World Health Organization 2008. Technical Documents. 10 facts on neglected tropical diseases. Disponível em : <[http://www.who.int/features/factfiles/neglected\\_tropical\\_diseases/ntd\\_facts/en/index.html](http://www.who.int/features/factfiles/neglected_tropical_diseases/ntd_facts/en/index.html)>. Acesso em: 31 Jul.2008

William S, Botros S, Ismail M, Farghally A, Day TA, Bennett J Liquantel-induced tegumental damage in vitro is diminished in schistosomes derived from PZQ-resistant infections. *Parasitology.* 2001 Jan; 122 (1):63-6

Wu MH, Wei CC, Xu ZY, Yuan HC, Lian WN, Yang QJ, et al. Comparison of the therapeutic efficacy and side effects of a single dose of levo-PZQ with mixed isomer PZQ in 278 cases of schistosomiasis japonica. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1991 Set; 45(3):345-9.