

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

Associação de Fármacos na Terapêutica Experimental
da Esquistossomose mansoni

por

Neusa Araújo

Belo Horizonte

Fevereiro/2010

TESE

DDIP-CPqRR

N. ARAÚJO

2010

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

Associação de Fármacos na Terapêutica Experimental
da Esquistossomose mansoni

por

Neusa Araújo

Tese apresentada com vistas à obtenção do Título
de Doutor em Ciências na área de concentração
Doenças Infecciosas e Parasitárias.

Orientação: Dr. Naftale Katz

Belo Horizonte

Fevereiro/2010

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

A658

2010

Araújo, Neusa.

Associação de Fármacos na Terapêutica Experimental da Esquistossomose mansoni / Neusa Araújo. – Belo Horizonte, 2010.

XVI, 128 f: il.; 210 x 297mm.

Bibliografia: f. 118 - 144

Tese (doutorado) – Tese para obtenção do título de Doutor em Ciências pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisas René Rachou. Área de concentração: Doenças Infecciosas e Parasitárias.

1. Esquistossomose mansoni/quimioterapia
2. *Schistosoma mansoni*/efeitos de drogas
3. *Schistosoma mansoni*/crescimento & desenvolvimento
4. Esquistossomicidas/uso terapêutico I. Título. II. Katz, Naftale. (Orientação).

CDD – 22. ed. – 616.963

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

**Associação de Fármacos na Terapêutica Experimental
da Esquistossomose mansoni**

por

Neusa Araújo

Foi avaliada pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Dr. Naftale Katz (Presidente)

Prof. Dr. Marcos Pezzi Guimarães

Profa. Dra. Silvane Maria Fonseca Murta

Prof. Dr. Stephan Michael Geiger

Suplente: Prof. Dr. Paulo Marcos Zech Coelho

Tese defendida e aprovada em: 26/02/2010

“A single drug, praziquantel (PZQ), is currently available for the treatment of infections due to Schistosoma haematobium (the most frequent species), S. japonicum, S. mekongi, S. intercalatum and the so-called minor schistosomes. For S. mansoni infections, oxfamiquine is still commercially available but its price discourages use and procurement is often difficult. Thus, PZQ is practically the only drug available for infection that concerns 200 million people. It is clear that we are living dangerously, since theory and experience strongly suggest that drug resistance is a virtually unavoidable phenomenon for any antinfective compound: if resistance were to undermine the usefulness of PZQ, it could take several years to develop adequate substitute. In view of the fact that several million PZQ doses are administered every year and the number is going to rise in the immediate future – increasing the risk of development of resistance – it should be apparent that is now time to start looking for new drugs against schistosomiasis.”

Donato Cioli

Report of the Scientific Working Group on Schistosomiasis, 2006

TDR/SWG/07 Pages 72-75

O Dr. José Pellegrino, professor amigo em algumas ocasiões e amigo professor em outras, me presenteou com um exemplar do livro ENCONTRO, de sua autoria com a seguinte dedicatória:

Signe os papulos do
Dr. Nappole que vive
friealmente, longe, mas long
mua
C. Pellegrino
Out 79

A Ele, *in memoriam*, eu dedico este trabalho.

Agradecimento Especial

*A importância da vida não é ser importante. O importante é ser especial. E
você, Naftale, além de especial é também muito importante.
Obrigada por tudo.*

Neusa

AGRADECIMENTOS

A FIOCRUZ, instituição à qual tenho orgulho de pertencer, cujo apoio financeiro foi essencial em todas as etapas desse trabalho.

Ao Centro de Pesquisa René Rachou, que tornou possível a realização deste trabalho.

A FAPEMIG, pelo suporte financeiro.

Ao Curso de Pós-Graduação em Ciências da Saúde.

Aos meus pais pela oportunidade de estudo que me deram.

À minha mãe, minha referência, pela lição constante de fé, força, coragem e sabedoria.

À minha família pela união, carinho, solidariedade e torcida. Eu amo vocês.

Ao Guto, meu marido e ao Lu, Dani e Nanda, meus filhos, meu porto seguro.

A Maria Fernanda, Du e Marlon pela felicidade dos meus filhos.

Ao Dr. Emmanuel Pinto Dias (*in memoriam*), que me recebeu no Laboratório de Esquistossomose, e com toda disponibilidade me repassou todos os seus conhecimentos teóricos e práticos sobre a esquistossomose. Emmanuel, Saudades!

Ao Dr. Roberto Sena Rocha, que sempre me incentivou a buscar novos caminhos.

Ao Dr. Álvaro José Romanha, colega desde os tempos da faculdade, pela amizade e carinho.

Ao Dr. Paulo Marcos Zech Coelho, Chefe do Laboratório de Esquistossomose, que acompanha a minha trajetória desde o mestrado, pelas valiosas contribuições para o aprimoramento deste trabalho e de toda a minha vida profissional.

A Dra. Symone Fulgêncio. Symone, o tempo de convivência foi curto, mas a amizade é duradoura e recíproca.

Ao Dr. John Kussel, que mesmo distante, sempre atendeu aos meus pedidos de socorro, via e.mail.

Ao Áureo e Vanda, amigos de toda uma vida, pela dedicação, carinho e afeto.

A Ana Carolina, Ana Karine e Andréa pela parceria nos experimentos e pela amizade.

A Vera de Paula Ribeiro pelo carinho e pela tradução dos trabalhos.

A Clarice, Elisandra, Flávia, Fabrícia, Gardênia, Juliano, Jussara, Kika, Martin, Liliane, Ludmila, Rafaella, Raquel, Suedali, Tatiana, Vanessa, Watson pelos conselhos preciosos, sugestões inestimáveis, ajuda e amizade, estímulos decisivos para a produção desse trabalho.

A Deborah e Patrícia, minhas queridas orientandas do PROVOC, pela ajuda na parte experimental e pela amizade.

A Sueleny, Dílcia, Delza Liana e Roberta, não só pela ajuda técnica, mas principalmente pela força e torcida.

A Inês, secretária do Laboratório de Triatomíneos, que também me secretariou vez por outra, sempre com muito carinho.

A Conceição, secretária da ASFOC, meu braço direito em todos os assuntos profissionais ou particulares.

Ao Segemar (meu amigo Segê) pela amizade, apoio e contribuição para que esse trabalho fosse publicado dentro das normas acadêmicas vigentes.

Ao Jaci, Douglas, Kátia, Marcílio, Wanderley, Vera e Thiago, do Biotério, pela ajuda imprescindível na parte experimental deste trabalho.

Ao Renato Delfino Guimarães que, sempre com um sorriso nos lábios, mostrou toda disponibilidade e boa vontade ao me ajudar com as figuras para publicação.

Aos professores do Curso de Pós-Graduação pela possibilidade de um aprendizado constante.

A Neide (*in memoriam*), Cristiane e Andréa, da Secretaria Acadêmica pela ajuda em todos os assuntos burocráticos.

Aos meninos da Informática sempre prontos para ajudar a resolver as “pegadinhas” do computador.

Aos colegas da Pós-Graduação pelo convívio fraterno.

A Andrea Cândido, meu “Anjo Salvador” nos designers gráficos.

A Dra Andréa Teixeira de Carvalho e Dr. Marcos Pezzi Guimarães pela revisão cuidadosa e sugestões na qualificação do projeto.

À Biblioteca de Ciências da Saúde Prof. Zigman Brener, representada por seus funcionários, pela disposição em ajudar na execução desse trabalho.

A toda a comunidade do CPqRR pelo convívio e amizade.

A Dra. Silvane Maria Fonseca Murta, Dr. Marcos Pezzi Guimarães, Dr. Stephan Michael Geiger e Dr. Paulo Marcos Zech Coelho, membros da banca examinadora, pelo cuidado na leitura desse trabalho e pelas sugestões valiosas.

À alegria maior dos últimos tempos, Isadora, minha netinha que está para chegar.

A Deus que pôs em meu caminho todas essas pessoas maravilhosas e por Sua presença em todos os momentos da minha vida, principalmente nos mais difíceis.

A todos, meus sinceros agradecimentos.

SUMÁRIO

RESUMO.....	XII
ABSTRACT.....	XIV
1 INTRODUÇÃO	18
2 OBJETIVOS.....	23
2.1 OBJETIVO GERAL	23
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23
3 REVISÃO DA LITERATURA.....	25
3.1 CONTROLE.....	25
3.2 CONTROLE ATRAVÉS DO TRATAMENTO.....	29
3.3 TRATAMENTO	32
3.4 OXAMNIQUINA	34
3.5 PRAZIQUANTEL.....	37
3.6 RESISTÊNCIA AOS ESQUISTOSSOMICIDAS	42
3.7 ASSOCIAÇÃO DE FÁRMACOS.....	52
3.8 AVALIAÇÃO DA ASSOCIAÇÃO DE FÁRMACOS.....	57
3.8.1 Isoblograma.....	57
3.8.2 Índice de Combinação	58
3.9 FÁRMACOS ALTERNATIVOS	59
3.10 EXPERIMENTOS <i>IN VITRO</i> E <i>IN VIVO</i>	65
3.11 SONDA HOECHST 33258.....	66
4 METODOLOGIA	69
4.1 ANIMAIS E PARASITAS	69
4.2 TRATAMENTO DOS ANIMAIS	69
4.3 FÁRMACOS E DOSES UTILIZADAS.....	69
4.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE TERAPÊUTICA.....	69
4.5 INTERPRETAÇÃO E ANÁLISE DOS RESULTADOS	70
4.6 ENSAIOS <i>IN VITRO</i>	71
4.7 ANÁLISE DE VIABILIDADE DOS OVOS.....	72
4.8 ÍNDICE DE COMBINAÇÃO.....	72
4.9 CONSTRUÇÃO DE CURVA DE RESPOSTA E ISOBOLOGRAMA.....	72
5 RESULTADOS	74
5.1 ARTIGO 1	74
5.2 ARTIGO 2	80
5.3 ARTIGO 3.....	86
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	105
6.1 OBJETIVOS - RESULTADOS E ANÁLISE.....	106
6.2 PERSPECTIVAS.....	112
7 ANEXOS	114
7.1 ANEXO 1 - CICLO DE VIDA DO <i>SCHISTOSOMA MANSONI</i>	114
7.2 ANEXO 2 – CERTIFICADO DA LICENÇA CEUA.....	115

7.3 ANEXO 3 – EXAME DE QUALIFICAÇÃO	116
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	118

Resumo

A quimioterapia é a medida principal utilizada para o controle de morbidade da esquistossomose nas regiões endêmicas. Os fármacos esquistossomicidas usados – oxamniquina e praziquantel – apresentam poucos efeitos colaterais e atividade esquistossomicida alta, contribuindo para o tratamento da infecção reduzindo a morbidade, entretanto deixam a desejar no que se refere à erradicação da doença, uma vez que não são capazes de sozinhos, interromper a transmissão. Atualmente o tratamento da esquistossomose é feito quase que exclusivamente pelo praziquantel. Tendo em vista a notificação cada vez mais freqüente de casos de resistência ao praziquantel em diversas regiões principalmente da África, e considerando a possibilidade do aparecimento de resistência do verme ao fármaco, falhas terapêuticas e intolerância do paciente ao tratamento, fica claro o risco de se ter somente um fármaco para o tratamento da esquistossomose. Vários autores têm chamado a atenção para esse fato e a Organização Mundial da Saúde recomenda a busca de novos fármacos para o tratamento da doença. Entretanto, o desenvolvimento de novos medicamentos é um processo demorado e dispendioso. Nesse contexto, a abordagem principal desse trabalho é a de se usar medicamentos já caracterizados do ponto de vista farmacológico, conhecidos em seus princípios ativos e com efeitos colaterais definidos, visando abreviar esse tempo. No presente trabalho, são apresentados dois artigos publicados e um terceiro submetido à publicação. No primeiro artigo foi estudada a associação da lovastatina com oxamniquina ou com o praziquantel. Nos experimentos *in vivo*, a associação da lovastatina com oxamniquina ou com o praziquantel não apresentou efeito aditivo, mas houve alteração significativa do oograma quando a lovastatina foi associada com a oxamniquina. Os experimentos *in vitro* mostraram que a maturação dos ovos não se completa quando os vermes foram expostos à lovastatina ao contrário daqueles do grupo controle, que passam por todos os estágios, chegando até a eclosão dos miracídios. O processo completo de maturação dos ovos também foi observado quando vermes tratados *in vivo* foram cultivados *in vitro* em meio de cultura sem adição de lovastatina demonstrando que a exposição dos vermes a lovastatina *in vitro* é responsável pelo bloqueio do desenvolvimento dos ovos. No segundo artigo foi avaliada a ação do clonazepam sobre o verme adulto de *S. mansoni in vitro*, causando paralisia total dos vermes machos e

fêmeas, entretanto a associação desse fármaco com oxamniquina ou praziquantel *in vivo* não mostrou ação aditiva ou sinérgica. No terceiro artigo foi estudada a atividade esquistossomicida da associação entre a oxamniquina e o praziquantel. Esse esquema terapêutico mostrou atividade sinérgica entre os dois fármacos. A associação da oxamniquina com praziquantel se mostrou benéfica quando os dois fármacos foram administrados simultaneamente ou quando o praziquantel foi administrado 4 horas, um ou cinco dias após a oxamniquina. Os resultados desses estudos indicam que se deve dar prosseguimento a essa linha de pesquisa, uma vez que a associação de fármacos que apresente efeito sinérgico é, no momento, a estratégia ideal para o tratamento da doença, ao considerar-se a inércia atual na busca de novos fármacos ativos e o aparecimento de resistência ao esquistossomicida usado.

Abstract

Chemotherapy is the major tool for controlling schistosomiasis morbidity in endemic areas. The main antischistosomal drugs used - oxamniquine and praziquantel – present few side effects and high schistosomicidal activity, contributing for the treatment of the infection in regard to reduction of morbidity, but not achieving eradication of the disease, since they are not able to interrupt the transmission. Currently, the treatment of schistosomiasis is almost exclusively administered using praziquantel. In view of the reports which have increased in frequency over recent years about cases of resistance to praziquantel in different regions, mainly in Africa, and taking into account the possibility of appearance of drug resistance, therapeutic failure, and patient's intolerance to treatment, it is easy to note the risk of having only one drug left for schistosomiasis treatment. Various authors have warned about this fact, and the World Health Organization recommends the search for new drugs for treatment of the disease. However, the development of new drugs is an expensive and time-consuming process.

In this context, the main approach of this work is the use of well-known antischistosomal drugs, with active principle and side effects well defined, aiming at abbreviating that process. In the present work, we show two published papers and a third one which is already submitted for publication.

The first article deals with the use of lovastatine and oxamniquine or praziquantel in association. In experiments *in vivo*, lovastatine and oxamniquine or praziquantel in association did not present any additive effect, but a significant oogram change was detected when lovastatine and oxamniquine were used in association. On the other hand, the experiments *in vitro* showed that maturation of eggs was not fully developed when the worms were exposed to lovastatine, whereas the eggs of the control group reached maturation, after passages through all the parasitic stages until eclosion of miracidia. The complete process of egg maturation was also observed when worms treated *in vivo* were cultured *in vitro*, in culture medium without addition of lovastatine, thus demonstrating that the exposure of worms to lovastatine *in vitro* accounts for the blockage of egg development.

In the second article, the activity of clonazepam on *Schistosoma mansoni* adult worms was evaluated *in vitro*, showing that clonazepam causes total paralysis of male and female worms. *In vivo*, this drug did not present any additive or synergistic action.

In the third paper, the schistosomicidal activity of oxamniquine and praziquantel used in association was studied. The therapeutic schedule used showed synergistic activity of these drugs. The use of oxamniquine and praziquantel in association was beneficial, when both drugs were simultaneously administered or when praziquantel was given 4 hours, 1 or 5 days after oxamniquine.

The results of these studies motivate the need to continue working on this promising research line, since the association of two drugs presenting synergistic effect is currently the ideal strategy for the treatment of the disease.

1 Introdução

A esquistossomose é uma das parasitoses humanas mais difundidas no mundo e sua ocorrência está relacionada à ausência ou precariedade de saneamento básico.

A esquistossomose mansoni (EM CID 10 B 659) é decorrente da infecção humana pelo trematódeo parasita *Schistosoma mansoni*. A transmissão do verme depende da presença de espécies suscetíveis de caramujos de água doce pertencentes ao gênero *Biomphalaria*. No Brasil as espécies naturalmente envolvidas na transmissão são: *Biomphalaria glabrata*, *B. tenagophila* e *B. straminea*.

A doença foi originalmente chamada de Bilharzia em homenagem a Theodor Bilharz, o patologista que a descreveu e fez a associação com vermes trematódeos – *Schistosomas* - em 1851 em um hospital do Cairo, Egito (Ross *et al.* 2002, Klos & David 2002).

Embora apresente manifestações graves, na maioria das vezes a esquistossomose é assintomática. A gravidade da infecção depende da carga parasitária adquirida nos contatos com os ambientes hídricos contaminados e da frequência desses contatos. A doença é também conhecida como esquistossomíase, barriga d'água, bilharziose, xistosa, e doença do caramujo (Katz & Almeida 2003).

A esquistossomose humana é uma doença crônica, debilitante ocorrendo nos países tropicais e subtropicais (Gryseels *et al.* 2006), sendo considerada, juntamente com outras doenças que compõem uma lista, como “doença tropical negligenciada” (Hotez *et al.* 2006).

Doença endêmica de importância mundial, a esquistossomose é a segunda de maior impacto em termos sócio-econômicos e de saúde pública, perdendo somente para a malária. Afeta amplas áreas geográficas, com aproximadamente 200 milhões de pessoas infectadas em 74 países por uma das diferentes espécies de *Schistosoma* que atingem o homem, sendo as principais *S. mansoni*, *S. japonicum* e *S. haematobium* e 600 milhões vivendo sob o risco de infecção. Segundo King *et al.* 2006 o número total de perdas DALY (*disability-adjusted life years*), uma medida de desfecho que contempla dados quantitativos (tempo de vida) e qualitativos (qualidade de vida) relacionados à saúde dos pacientes, é estimado em 2-15% ao ano (King *et al.* 2005). A OMS, em seu relatório de 2002, declara que o número anual de mortes causadas pela

esquistossomose pode ser superior a 200.000. A morbidade acentuada da doença torna estes índices preocupantes. Sua evolução pode levar ao desenvolvimento de doenças incapacitantes para homens e mulheres em suas idades mais produtivas, comprometendo a qualidade de vida dos pacientes (Engels *et al.* 2002).

No Brasil, o primeiro artigo científico sobre esquistossomose foi publicado em 1908 por Pirajá da Silva relatando o encontro de ovos com espícula lateral em exames de fezes (Pirajá da Silva 1908a). Outros três trabalhos publicados pelo autor com fotografias dos ovos com espícula lateral, com a ressalva de que os ovos eram encontrados nas fezes e não na urina e descrevendo detalhadamente os vermes recolhidos de necropsias de três pacientes, mostravam não se tratar de *S. haematobium* (Pirajá da Silva 1908b,c 1909, Katz 2008). Ainda hoje, um século após, o Brasil é o país que apresenta a maior prevalência de esquistossomose da América do Sul, estimando-se em oito milhões o número de pessoas infectadas, e cerca de 30 milhões de pessoas vivendo em área de transmissão, sob o risco de contrair a doença (Katz & Peixoto 2000, Chitsulo *et al.* 2000). A esquistossomose apresenta ampla distribuição geográfica no Brasil, com maior intensidade de transmissão na região Nordeste do país e no norte de Minas Gerais. Dezoito estados, mais o Distrito Federal apresentam áreas de transmissão, ainda que alguns deles sejam constituídos de áreas com focos isolados. (Carvalho *et al.* 1998). A ausência de dados epidemiológicos precisos indica a necessidade de um levantamento nacional adequado da prevalência da esquistossomose que continua a ser importante endemia parasitária, justificando esforços maiores para seu controle (Katz & Peixoto 2000).

Em 16 de maio de 2008 a Secretaria de Saúde do Estado de Minas Gerais publicou a Resolução SES nº 1.481 que torna a esquistossomose uma doença de notificação compulsória em todo o Estado de Minas Gerais, colaborando, dessa maneira para a obtenção de dados epidemiológicos mais reais.

O desenvolvimento econômico, a utilização de métodos de controle, o desenvolvimento de fármacos e a melhoria das condições sanitárias são fatores fundamentais para a diminuição da incidência de parasitoses. A esquistossomose, apesar do desenvolvimento de fármacos efetivos, bem tolerados e com poucos efeitos colaterais, continua em plena expansão, principalmente em países da África e no Brasil, ocasionada pela precariedade das condições básicas de saúde da população e

inexistência de condições sanitárias essenciais para a sobrevivência (Katz & Peixoto 2000).

Cerca de 1-10% das pessoas infectadas e não tratadas desenvolvem forma grave da doença – a hepatoesplenomegalia. Em áreas onde a esquistossomose é endêmica observa-se correlação entre a carga de vermes e a gravidade da doença. A quimioterapia tem um valor inquestionável na redução da morbidade nessas áreas (WHO 1993).

Nas últimas duas décadas, após houve redução de cerca de 50% no número de casos de esquistossomose no Brasil, bem como redução da taxa de mortalidade pela doença, que mesmo assim continua representando sério agravo de saúde pública (Silveira *et al* 1997, Andrade 1998, Ferraz *et al.* 2003). Cinco a 8% dos pacientes esquistossomóticos poderão desenvolver a forma hepatoesplênica e desses, aproximadamente 87% poderão apresentar varizes esofagianas (Andrade 1998, Ferraz 2001), com incidência de hemorragia digestiva variando entre 11 a 25% (Kloetzel & Kloetzel 1958, Coura *et al* 1982, Abrantes 1995, Ferraz *et al.* 2001). Dentre os fatores responsáveis pela redução da doença no Brasil podem ser citados: a disponibilidade de fármacos comprovadamente eficazes, administrados em dose única e por via oral e isentos de efeitos colaterais graves; a melhoria das condições do sistema de saneamento básico; a ampliação da oferta de abastecimento e esgotamento sanitário; a maior disponibilidade de assistência médica e implantação de programas de educação em saúde (Brasil, 2004).

A interação entre o parasito e o hospedeiro é a grande responsável pela patologia da esquistossomose (Andrade *et al.* 1962, Andrade *et al.* 1992). Outros fatores como o estágio evolutivo da doença e a carga parasitária também são responsáveis pela gravidade da esquistossomose. Considera-se ainda o hospedeiro, a constituição genômica, o órgão lesado, o hábito alimentar, a etnia, o tratamento específico, as reinfecções e principalmente o estado imunológico do paciente como os fatores mais importantes na definição e na evolução das formas da doença (Farinazzo *et al.* 1997, Lambertucci *et al.* 1998). Conforme Bogliolo (1954), a patogenia da esquistossomose encontra-se na formação do granuloma ocasionado pelo ovo do parasito. Manifestações ectópicas da doença como, por exemplo, a neurológica e a

vasculopulmonar são causadas pela presença de granulomas, principalmente, na medula e nos vasos pulmonares, respectivamente.

O crescimento econômico e os métodos de controle, como o uso de novos medicamentos e a melhoria das condições sanitárias têm sido os grandes responsáveis pela diminuição gradativa da incidência da maioria das parasitoses humanas (Savioli 2000, 2004). A esquistossomose, no entanto, continua se expandindo, principalmente na África e no Brasil, onde a situação político-econômica não atende à melhoria das condições essenciais de saúde da população. Em grande parte, nas áreas endêmicas, ou não existem ou, se existem, são precárias as condições sanitárias básicas e a população se vê obrigada ao contato com águas contaminadas para o exercício da agricultura, trabalho doméstico e/ou lazer. (Katz & Peixoto, 2000). A migração, os grandes projetos de construções de estradas e represas podem contribuir para o aparecimento de novos focos de transmissão (Southgate *et al.* 2001). Em Richard Toll, Senegal, houve uma explosão na prevalência da esquistossomose intestinal de 1,9 para 71% nos dois anos seguintes à detecção dos primeiros casos, período que coincidiu com término da construção da represa Diama (Talla *et al.* 1990). Em 1997 foi detectada pela primeira vez a presença de *Biomphalaria* na região metropolitana de Porto Alegre (Esteio-Rio Grande do Sul), onde mais tarde foi confirmada a primeira infecção humana por *S. mansoni* autóctone na região (Carvalho *et al.* 1998, Graeff-Teixeira & Moraes, 1999). Atualmente há uma baixa prevalência de *S. mansoni* na região. No entanto, as áreas de baixa prevalência não podem ser menosprezadas, pois representam risco com potencial de expansão da esquistossomose (Graeff – Teixeira *et al.* 2004). O estudo da biologia do *Schistosoma* se faz necessário, uma vez que atualmente existe um único fármaco sendo usado no tratamento em massa da esquistossomose (WHO 2002) e, considerando que até o momento, apesar de muitos estudos realizados principalmente nas últimas duas décadas, não há ainda uma vacina que seja efetiva contra o *S. mansoni* (Fonseca *et al.* 2005). Estudos atuais do genoma e transcriptoma do verme contribuem para o conhecimento da biologia do parasito e são extremamente úteis na geração de novas informações que podem ser usadas no desenvolvimento de novos fármacos e vacinas contra a esquistossomose (Katz 2005).

OBJETIVOS

2 Objetivos

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a atividade terapêutica e/ou o potencial profilático de associação de fármacos na esquistossomose mansoni experimental.

2.2 Objetivos Específicos

Investigar a eficácia da lovastatina contra vermes adultos de *S. mansoni*, quando administrada em monoterapia ou associada com oxamniquina ou praziquantel, em experimentos realizados *in vivo* e *in vitro*.

Estudar a viabilidade de ovos de *S. mansoni*, usando a sonda Hoechst 33258.

Avaliar a eficácia da associação do clonazepam usado em monoterapia ou em associação com oxamniquina ou praziquantel no tratamento da esquistossomose mansoni experimental.

Avaliar a ação do clonazepam sobre o verme adulto de *S. mansoni* em estudos *in vitro*.

Avaliar, experimentalmente, a eficácia da associação oxamniquina-praziquantel administrada nos vários estágios da infecção por *S. mansoni*.

REVISÃO DA LITERATURA

3 Revisão da Literatura

3.1 Controle

O controle da transmissão da esquistossomose é essencial para a erradicação da doença, pois visa interromper o ciclo evolutivo do parasito. Entretanto, controlar a transmissão é difícil em áreas endêmicas por diversas razões, dentre as quais se destacam: a ampla disseminação dos hospedeiros intermediários; a inexistência de uma vacina eficaz para a prevenção da doença; o retorno para a educação sanitária só apresentar resultados em longo prazo e, sobretudo, às dificuldades políticas e econômicas relacionadas ao alto custo das obras de engenharia sanitária que possibilitem o aporte adequado de água para as casas e a eliminação apropriada dos dejetos, impedindo, dessa maneira, a contaminação dos recursos hídricos (Carvalho *et al.* 1998, Katz 1999, Coura & Amaral 2006). O controle da morbidade e a redução da mortalidade, no entanto, são possíveis por meio da quimioterapia humana – com oxamniquina ou praziquantel (WHO 1993). Jansen, 1946 sugeriu que com o tratamento em massa da população de áreas endêmicas seria possível se prevenir o aparecimento de formas clínicas graves, letais, da doença, sugestão confirmada por Silva em 1957, Kloetzel em 1967 e Bina em 1981.

Em 1984, após o desenvolvimento da oxamniquina e do praziquantel, a OMS recomendou uma mudança na estratégia nos programas de controle da esquistossomose, tendo a quimioterapia como alvo principal. Como recomendação deveriam ser tratados todos os casos positivos detectáveis pelos exames de rotina e, regularmente, os grupos de alto risco (crianças em idade escolar, por exemplo).

Antes dessa data, o Programa Especial de Controle da Esquistossomose (PECE) - criado, no Brasil, em 1975, visando o controle da esquistossomose baseava-se no tratamento da população humana guiada por inquéritos coproscópicos. Como metodologia, seria examinada uma amostra entre escolares de 7 a 14 anos e, se a prevalência do município, com base nesse inquérito, fosse maior que 20%, seria realizado o tratamento em massa da população (Conselho Nacional de Desenvolvimento 1976).

A mortalidade por esquistossomose ocorre principalmente na fase crônica da doença, em sua forma hepatoesplênica. Nessa forma, as manifestações clínicas são

decorrentes da hipertensão portal e tem como principais complicações a ascite e a formação de varizes gastroesofágicas que, quando rompem, resultam em hemorragias graves, muitas vezes, fatais (Prata 1997). As informações sobre os óbitos por esquistossomose constituem elementos importantes para o monitoramento da doença e, conseqüentemente, do impacto de intervenções e políticas públicas voltadas para a sua redução. Além disso, conhecer quem é vulnerável é imperativo quando se pensa em termos de prevenção. Desse modo, a identificação dos grupos populacionais que estão sujeitos a maior risco de morte por esquistossomose constitui uma tarefa imprescindível (WHO 1993, Resendes *et al* 2005).

Programas de controle para diminuir a morbidade e mortalidade causadas pela esquistossomose foram implantados no Brasil, China, Filipinas e Egito (Engels *et al.* 2002), e em Porto Rico, Venezuela, Arábia Saudita, Tunísia e Marrocos. O objetivo de tais programas foi o controle da morbidade ou a erradicação da doença (WHO 1998), porém, nos países africanos abaixo do Sahara não existia, até recentemente, nenhum programa de controle e a população conta com grande número de pessoas infectadas ou vivendo sob o risco de infecção (Engels *et al.* 2002, Savioli *et al.* 2004). Atualmente existem programas massivos de tratamento nessa área. A redução drástica no custo do praziquantel aliado ao suporte financeiro da Fundação Bill e Melinda Gates possibilitou o uso do medicamento nos países africanos (Hotez & Fenwick 2009). Cabe ressaltar a relevância de iniciativas internacionais como a Schistosomiasis Control Initiative (SCI) em Mali, Nigéria, Burkina Faso, Zâmbia, Tanzânia e Uganda, que torna possível o controle da esquistossomose integrado aos programas de controle de outras doenças como helmintos gastrointestinais e filariose linfática com o objetivo de reduzir custos (Fenwick *et al.* 2006).

Com o aparecimento dos primeiros moluscidas em 1940, a niclosamida, por exemplo, a transmissão da esquistossomose pôde ser controlada em várias regiões endêmicas, mas o emprego desses agentes diminuiu gradativamente e, atualmente é um método abandonado (Sturrock 2001). A aplicação de moluscidas, juntamente com outras medidas de controle, foi introduzida no Egito, em 1940 (sulfato de cobre). Em 1955 o pentaclorofenato foi usado pela primeira vez no Egito. Com o advento da niclosamida (Bayluscide®) esse moluscida passou a ser usado no delta do Nilo – Egito (Projeto Egito-49). Após dois anos de uso, os resultados se mostravam

promissores (Farooq *et al.* 1966). Entretanto, sete anos após, a incidência e a prevalência da esquistossomose continuavam iguais às que eram antes da introdução das medidas de controle. Foi dessa maneira que o Projeto Egito-49 mostrou que a aplicação de moluscicida não é uma medida eficaz para o controle da doença (Gilles *et al.* 1973, Katz, 1980).

No início da década de 70 e, mais no final da mesma década, o desenvolvimento da oxamniquina e do praziquantel, principalmente essa última, com atividade contra as principais espécies de *Schistosoma* que acometem o homem e também por ser de baixo custo, foi essencial para a redução da morbidade e mortalidade da esquistossomose. Entretanto, o tratamento, não impede a reinfeção e, conseqüentemente não consegue interromper a transmissão. Levando-se em conta que reinfeções implicam em tratamentos sucessivos que podem gerar linhagens resistentes ao praziquantel, fica a preocupação de que se não houver integração do tratamento específico com outras medidas de controle, principalmente a eliminação dos caramujos e o saneamento básico, a doença ainda irá persistir por longo tempo. Em 1993, a Organização Mundial de Saúde indicou o estudo do genoma do *Schistosoma* como um método para gerar conhecimentos que possam ser utilizados como ferramentas de controle da doença, como a identificação de novos alvos para vacinas e descobrimento de novos fármacos (WHO 1993). Em 1994, teve início o projeto "*Schistosoma* Genome Network" (LoVerde *et al.* 2004), com a finalidade de codificar as seqüências de genes expressos dos parasitas *S. mansoni* e *S. japonicum*. Em 2009 o projeto foi finalizado com o seqüenciamento de 92% dos 14 mil genes do parasita. O número de genes totalmente conhecidos do *Schistosoma*, devido ao projeto, foi ampliado de 160 para 510, além de apontar 45 deles como alvos potenciais para novas drogas e 28 como alvos para o desenvolvimento de possíveis vacinas (Berriman *et al.* 2009).

Barbosa *et al.* 1993 apresentaram uma proposta alternativa aos programas de controle em um trabalho de pesquisa controlado, com integração interdisciplinar e multi-institucional, envolvendo entidades de pesquisa e de serviços, desenvolvido em uma área rural do município de Afonso Cláudio (Espírito Santo). Esse modelo conta com amplo envolvimento comunitário e com a organização dos serviços locais de saúde

(SUS). Os métodos de controle utilizados são o tratamento médico individualizado e a melhoria das condições de saneamento.

Recentemente a idéia de um esquema de controle da esquistossomose associando-se vacinação e quimioterapia, vem ganhando força.

Até o presente momento o controle da transmissão não foi objeto de nenhum programa especial em larga escala, mas existem exemplos de países que vêm conseguindo controlar a esquistossomose seja através do desenvolvimento sócio-econômico e do uso extenso do abastecimento de água e eliminação adequada de dejetos, por exemplo: Japão e Porto Rico.

Pelo exposto fica clara a preocupação com o controle da morbidade da esquistossomose, entretanto é preciso que haja também o controle da transmissão, com o objetivo de interromper o ciclo evolutivo do parasito evitando assim o aparecimento de novos casos.

Como medidas de controle da transmissão da esquistossomose podem ser usadas as seguintes estratégias:

controle dos portadores da esquistossomose - identificação dos portadores através de exames coprocópicos e quimioterapia específica são as medidas mais diretas e imediatas de controle. Com isso, há a diminuição da morbidade da doença prevenindo, em especial, o aparecimento de formas mais graves através da redução da carga parasitária;

controle dos hospedeiros intermediários - O levantamento malacológico das áreas, a investigação e controle imediato de novos focos para determinar o potencial de transmissão e o tratamento químico dos criadouros de importância epidemiológica são medidas de controle complementares;

modificação permanente das condições de transmissão - aliado a estas medidas as ações de educação em saúde, a mobilização permanente da comunidade e o saneamento ambiental nos focos da doença são etapas importantes para o controle da esquistossomose;

aporte adequado de água para as casas e a eliminação apropriada dos dejetos, de modo que seja impedida a contaminação dos recursos hídricos (Katz 1999).

É importante frisar que a medida mais eficaz para o controle da transmissão seriam as ações de saneamento ambiental incluindo coleta e tratamento de dejetos,

abastecimento de água potável, melhoria das condições sanitárias e eliminação definitiva das coleções hídricas criadoras de moluscos (Katz e Almeida, 2003).

Enk *et al* (2004) citam o aumento do turismo rural em áreas endêmicas como um fator de risco para infecção, em especial para pessoas oriundas de áreas não-endêmicas para esquistossomose, que, não tendo contato prévio com o parasito ficam sujeitas a apresentar as formas mais graves da doença. Esse fato já havia sido observado por Hiatt *et al.* 1979, quando relataram que pessoas que contraem a esquistossomose durante visitas a áreas endêmicas tornam-se mais vulneráveis a adquirir a forma aguda da doença, que nem sempre está relacionada à infecção intensa.

3.2 Controle Através do Tratamento

O controle da esquistossomose através do tratamento, apesar dos índices altos de reinfecção em áreas endêmicas, é eficaz. O tratamento é importante não só pela cura do paciente, mas também para o controle da morbidade e da transmissão (Savioli *et al.* 2004).

No Brasil, os primeiros casos autóctones de esquistossomose em Niterói, bem como o primeiro estudo sobre a avaliação da terapêutica em esquistossomose foram realizados em marinheiros oriundos de áreas endêmicas (Maciel 1929).

O primeiro estudo em comunidade com o objetivo de avaliar o controle da esquistossomose em área endêmica foi realizado por Jansen (1946) em Catende, PE. Com o tratamento específico dos indivíduos infectados pelo *S. mansoni* (com derivados antimoniais), o combate ao *B. straminea* com moluscicida e o saneamento básico (construção de fossas nas residências, latrinas públicas e tanques para lavagem de roupas, e filtros de areia nos reservatórios comunitários de água), o índice de caramujos infectados nos criadouros da área caiu de 18,5 para 7,9% em dois anos e a prevalência da esquistossomose nos moradores, de 53,0 para 12,0%.

Com base nas observações de Madureira Pará (1949) que de um total de 267.107 amostras de fígado, oriundos de todo o país, estudadas através de viscerotomia realizadas entre 1937 e 1946 encontrou 5.953 positivas para *Schistosoma* (2,3% \pm 0,019), Sette (1953) examinou a população de Catende, Pernambuco, onde Jansen (1946) havia tratado cerca de 3.500 pacientes com antimoniais, aplicado

moluscicida e realizado saneamento na comunidade. Dois grupos foram estudados sendo o primeiro formado de 796 pacientes tratados e o segundo por 100 pacientes sem tratamento. A incidência de esplenomegalia após o tratamento foi de 1,7 e 9,9%, respectivamente. Estudos de biópsia de fígado em pessoas falecidas desse mesmo grupo durante os anos de 1937 a 1941 e 1942 a 1951 revelaram que a porcentagem de “cirrose” era de 32,6 e 11,1, respectivamente sendo essa a primeira evidência de que após o tratamento há um decréscimo no número de casos de hepatoesplenomegalia (Pará 1949, Sette 1953).

Em Gameleira, Pernambuco, Kloetzel (1962) observou que 50% das crianças com esplenomegalia após quatro anos do tratamento com Astiban® apresentavam o baço em tamanho normal, 83,0% dos pacientes tratados que continuaram residindo na área haviam sido reinfetados, sendo que a mediana do número de ovos de 915, antes do tratamento, diminuiu para 135, e que nenhuma das crianças tratadas desenvolveu a hepatoesplenomegalia. No trabalho, o autor sugere, em decorrência dos resultados observados, que os pacientes deveriam receber tratamento específico, mesmo levando-se em conta a possibilidade de reinfecção (Kloetzel 1962).

Bina (1977) demonstrou que crianças residentes em zona endêmica de *S. mansoni* com tendência a adquirir a forma hepatoesplênica com o passar dos anos, poderiam ter essa tendência controlada, através do tratamento. De fato, pacientes com idade variando entre cinco e 17 anos, tratados com hycanthone, apresentaram 71,4% de regressão da forma hepatoesplênica na avaliação clínica e parasitológica realizadas 2, 5 e seis anos pós-tratamento, enquanto no grupo controle (não tratado) 28,7% evoluíram para a forma hepatoesplênica. Observou ainda que os pacientes tratados continuavam apresentando ovos de *S. mansoni* nas fezes após cinco anos do tratamento, devido à reinfecção(ões) e que não houve diferença significativa na intensidade da infecção entre os grupos tratados e não tratados.

Em Comercinho, Minas Gerais, foi realizado, em 1974, um estudo clínico-epidemiológico incluindo censo, mapeamento da cidade, exame parasitológico de fezes da população pelo método de Kato-Katz, exame clínico nos pacientes com diagnóstico positivo para *S. mansoni*, entretanto não foi realizado tratamento específico porque o fármaco usado à época (hycanthone) começava a apresentar efeitos colaterais graves, inclusive casos fatais (Katz 1974). Na mesma área, em 1981, foi realizada uma nova

intervenção com identificação do hospedeiro intermediário, avaliação da estabilidade da contagem de ovos nas fezes, levantamento sócio-econômico, pesquisa de contato com a água, intradermoreação nos pacientes positivos para *S. mansoni* através do exame de fezes e tratamento em larga escala com oxamniquina (Costa 1983). Cury *et al.* (1988) reavaliaram a população de Comercinho usando metodologia semelhante àquela usada em 1983 por Costa *et al.*, encontrando um índice de infecção de 40% e média geométrica de 105 ovos por grama de fezes, constatando uma diminuição acentuada da forma clínica hepatoesplenomegalica. Rocha (1995) nesta mesma localidade verificaram que houve o aumento do número de residências com água potável intradomiciliar chegando a 86,9% das residências e que aliado a cinco tratamentos específicos dos infectados pelo *S. mansoni* durante dez anos produziram redução significativa da prevalência da esquistossomose de 70,4 para 13,1% e na média geométrica do número de ovos por grama de fezes de 334 para 120 ovos, com regressão da forma hepatoesplênica de 6,8 para 3,3%. Um estudo mais recente nesta mesma área, constando de identificação do hospedeiro intermediário, levantamento sócio-econômico da população, exame de fezes da mesma população estudada em 1981 e exame clínico dos pacientes positivos foi realizado por Sarvel *et al.* 2009. Os 181 moluscos coletados, identificados como *B. glabrata*, não estavam infectados por *S. mansoni*. Das residências visitadas 96% contavam com abastecimento de água da rede pública e 97,6% possuíam fossa/vaso sanitário para destino dos dejetos. As casas Tipo A - consideradas de melhor qualidade – somavam 97,6% das moradias; do tipo B 1,6% e 0,8% do tipo C. A taxa de infecção para *S. mansoni* foi de 1,4% e a média geométrica de ovos por grama de fezes foi de 172. Nenhum novo caso de forma hepatoesplênica foi detectado. Os estudos realizados na Cidade de Comercinho ao longo de 35 anos, mostram que a transmissão da esquistossomose foi quase interrompida no local e dão a noção exata do benefício gerado para a população quando são aliados tratamento específico, aporte de água encanada, eliminação adequada dos dejetos e melhoria das condições sócio-econômicas (Sarvel 2009).

No Brasil, com o Programa Especial de Controle da Esquistossomose (PECE) instituído em 1976, mais de 13 milhões de pacientes foram tratados com oxamniquina ou praziquantel. Nas últimas décadas, no Brasil, a prevalência da forma

hepatoesplênica diminuiu significativamente, bem como as internações hospitalares por esquistossomose (Amaral 2006).

3.3 Tratamento

Nos últimos anos os fármacos esquistossomicidas evoluíram de agentes altamente tóxicos (antimoniais, lucanthone, niridazol, hycanthone) e de administração incômoda para agentes apresentando toxicidade baixa e administrados oralmente. No Brasil, assim como na maioria dos países afetados, o esquistossomicida de escolha é o praziquantel (Katz & Almeida 2003). Este fármaco é altamente efetivo contra todas as espécies de *Schistosoma* patogênicos ao homem (Matsumoto 2002, Gryseels *et al.* 2006). Nenhum caso fatal foi diretamente atribuído ao uso de praziquantel, embora mais de 53 milhões de tratamento já tenham sido feitos (Fenwick *et al.* 2003).

O primeiro medicamento empregado no tratamento da esquistossomose foi o tártaro emético (tartarato de antimônio e potássio), administrado por via endovenosa, durante um mês (Christopherson 1918). Efeitos colaterais como náuseas, vômitos, diarreia, anorexia, alterações cardíacas e hepáticas e distúrbios dermatológicos foram observados durante o período do tratamento. Foram relatados episódios letais devidos à síncope cardíaca ou choque anafilático com a administração do fármaco. Em muitos casos o tratamento foi interrompido pela falta de adesão dos pacientes, o que levou à pesquisa de outros fármacos ativos, livres de metal e, preferencialmente, administrados por via oral. Surgiram então novos medicamentos como tartarato de antimônio e sódio, disulfonato-bis-pirocatecol de sódio e antimônio (Stibofen®), tiomalato de antimônio e sódio (Anthiomaline®) e gluconato de antimônio e sódio (Tiofam®) que ainda eram administrados por via intravenosa ou intramuscular. Os efeitos colaterais e tóxicos provocados por estes medicamentos continuavam intensos e graves, causando, inclusive a morte de alguns pacientes (Dias 1949). Em 1932 surge o lucanthone (miracil D) atuando contra o *S. mansoni* e o *S. haematobium* e o primeiro esquistossomicida conhecido de uso oral. Entretanto, esse fármaco continuava apresentando efeitos colaterais sérios nos sistemas nervoso central e cardiovascular.

Em 1964, começou a ser usado o niridazol (Ambilhar®), de administração oral, porém o tratamento era feito durante sete dias consecutivos. Os pacientes apresentavam pouca tolerância ao medicamento que também apresentava efeitos colaterais graves: toxicidade renal, convulsão, alucinação, além de ser um fármaco com propriedades de mutagenicidade, carcinogenicidade e imunossupressivo.

Em 1965, da hidroximetilação do lucanthone surgiu o hycanthone, ativo em dose única, podendo ser usado tanto por via intramuscular como oral (Archer & Yarinsky 1972). Os efeitos colaterais apresentados após a administração desse fármaco foram graves, inclusive com necrose hepática letal (Andrade *et al.* 1974), o que forçou a volta do tratamento da doença com o niridazol.

Em 1969, Richards e Foster desenvolveram a oxamniquina (Pfizer, Inglaterra), que era administrada em dose única, por via oral, bem tolerada pelos pacientes, com percentual de cura alto e ausência de efeitos colaterais graves, embora alguns pacientes ainda relatassem desconforto gástrico, vertigem e dores de cabeça. A restrição ao tratamento eram os casos de epilepsia (Cioli *et al.* 1995).

Em 1977, Thomas e Gönnert descreveram a atividade do praziquantel contra cestódeos e trematódeos. Em dose única e por via oral o praziquantel é bem tolerado pelos pacientes e apresenta atividade esquistossomicida alta. Não apresenta efeitos colaterais graves, podendo ocorrer dor de cabeça leve, vertigem, náuseas, diarreia, dor abdominal e anorexia, sintomas esses leves e passageiros. Apresenta atividade contra todas as espécies de *Schistosoma* que parasitam o homem (Cioli *et al.* 1995).

Atualmente a oxamniquina e o praziquantel são os fármacos escolhidos para o tratamento da esquistossomose, sendo o primeiro ativo somente para a esquistossomose mansoni. Entretanto, os dois fármacos apresentam limitações como atividade baixa sobre os vermes imaturos do *S. mansoni* e falha em tratamentos devido à ocorrência de resistência ou tolerância (Wilkins 1989, Giboda et al 1994 Frézard & Melo 1997, Cioli 1998).

Para maiores detalhes sobre fármacos utilizados no tratamento da esquistossomose pode-se consultar (Ribeiro-dos-Santos 2006, Katz 2008, Abdul-Ghani 2009).

3.4 Oxamniquina

A oxamniquina é uma tetrahydroquinolina semi-sintética (Richard & Foster 1969). Inicialmente sua administração era feita pela via intramuscular na dose única de 7,5 mg, mas os pacientes relatavam dor intensa e prolongada no local da aplicação. “Na primeira vez que o fármaco foi usado no Brasil todos os pacientes tratados apresentaram cura parasitológica, entretanto queixavam-se da forte dor provocada pela injeção” (Katz *et al.* 1973a). Diante disso foi fabricada a oxamniquina para administração oral e após estudos realizados foi fixada a dose a ser usada – 20mg/kg para crianças e 15mg/kg para adultos – doses consideradas de boa tolerância, ausência de efeitos colaterais e tóxicos e apresentando 80 a 90% de cura em adultos e 65 a 90% em crianças (Silva *et al.* 1974, Katz *et al.* 1976, 1977).

A meia vida da oxamniquina gira em torno de 1,5 a 2 horas com a concentração máxima no soro de 1 a 4 horas após a administração de uma dose de 15mg/kg (Kokwaro & Taylor 1991). Metabolizada por processos oxidativos é excretada em forma de metabolitos inativos pela urina (Cioli *et al.* 1995). O descobrimento da oxamniquina data do início da década de 70, e ela foi bastante usada para o tratamento em massa da esquistossomose na década de 80 (Katz 1980). O principal mecanismo de ação desse fármaco relaciona-se com a sua capacidade de inibir a síntese de ácidos nucleicos. A esterificação do fármaco pela enzima sulfotransferase produz compostos eletrofílicos capazes de alquilar o DNA e outras moléculas do parasito (Cioli 1993). É um fármaco que apresenta boa eficácia esquistossomicida contra o *S. mansoni*, porém não apresenta atividade contra as outras espécies de *Schistosoma* que acometem o homem (Foster 1987) e apresenta a desvantagem de ser de alto custo. A oxamniquina é eficaz para o tratamento da esquistossomose mansoni sendo os vermes machos mais vulneráveis à ação do fármaco do que as fêmeas (Cioli *et al.* 1995).

Testes realizados com oxamniquina usando o modelo animal revelaram que o fármaco atua em quase todos os estágios de infecção pelo *S. mansoni* sendo as fases de cercárias e vermes adultos mais afetados do que os esquistossômulos e vermes imaturos (Foster *et al.* 1971). Na fase imatura a dose única oral de 50 mg/kg causou redução significativa no número de vermes quando administrada 24 horas após a infecção, oito ou 15 dias pós infecção. A terceira semana pós infecção foi a mais crítica em relação à eficácia do tratamento, chegando a mostrar completa ineficácia aos 22

dias de infecção. O fármaco voltou a apresentar atividade quando administrado após 25 e 36 dias (Foster 1973). A ED₉₉ (dose necessária para matar 99% dos vermes) em camundongos foi de 44 e 42mg/kg quando foram usadas as vias oral ou intramuscular, respectivamente (Foster 1973). Em 1973, Pellegrino *et al.* relataram que a oxamniquina apresentou atividade em camundongos, hamsters e macacos *Cebus*. Em camundongos, com a dose única, intramuscular de 100mg/kg apresentou 100% de alteração do oograma. Quando foram usados hamsters, efeito semelhante aos apresentados pelos camundongos foi observado com a dose intramuscular de 50mg/kg. Macacos *Cebus* foram tratados com dose única intramuscular de 20-40 mg/kg e curetagens da mucosa retal feitas em série, antes e após o tratamento, mostraram que houve cura parasitológica dos animais. A perfusão realizada 120 dias após o tratamento mostrou ausência de vermes. Estudos de toxicidade e mutagenicidade realizados em animais não apresentaram evidências de efeitos carcinogênicos e mutagênicos relevantes (Batzinger & Bueding 1977) e anormalidades cromossômicas não foram observadas em animais nem em seres humanos (Ray *et al.* 1975).

Um experimento conduzido com o objetivo de estudar os danos causados nos vermes de *S. mansoni* mostrou que no terceiro dia de tratamento já se observa parada de postura. As alterações morfológicas dos vermes também puderam ser observadas a partir do terceiro dia do tratamento sendo que as mais intensas foram primeiramente observadas no parênquima dos vermes machos. Quinze dias após o tratamento as alterações se tornaram mais intensas, com vacuolização e desaparecimento dos núcleos das células do parênquima (lesão “em bolha”). Nas fêmeas, foram observadas alterações a partir do 7º dia, com redução da quantidade do material vitelínico no ovário e despigmentação acentuada. Os vermes sobreviventes apresentaram diminuição significativa de tamanho. A ovoposição não foi reiniciada até 120 dias após o tratamento quando o experimento foi finalizado (Kohn *et al.* 1979). Camundongos tratados com oxamniquina 24 horas após a infecção não apresentaram vermes no sistema porta quando a perfusão dos animais foi realizada no 35º da infecção (Coelho *et al.* 1993).

Na clínica, os efeitos colaterais mais comumente relatados por pacientes submetidos ao tratamento com oxamniquina foram: náuseas, vertigens, sonolência, dor de cabeça e menos frequentemente desconforto abdominal, vômito e diarreia. Efeitos esses leves e de curta duração. Alucinação ou convulsão foi observada em 0,5% dos

casos tratados. Exames laboratoriais mostraram elevação dos níveis de transaminases plasmáticas, leucopenia, hematúria e/ou proteinúria em alguns pacientes. (Silva *et al.* 1974, Domingues & Coutinho 1975, Bina & Spinola 1976, Katz *et al.* 1976, 1977, Katz 1980). Pode aparecer também febre e eosinofilia em decorrência da destruição do parasito (Cioli *et al.* 1995). A oxamniquina é bem tolerada pelos pacientes e reações adversas graves são esporádicas (Prata *et al.* 1975). No entanto, alguns autores relataram efeitos adversos graves no sistema nervoso central, após a administração do fármaco (Bina & Spinola 1976, Kraiden *et al.* 1983, Carvalho *et al.* 1985). Katz *et al.* (1973) isolaram uma cepa de *S. mansoni* de dois pacientes tratados com hycanthone por duas vezes e com niridazol por uma vez e ainda assim continuavam eliminando ovos viáveis nas fezes. Camundongos infectados com a cepa isolada (denominada WW) foram tratados com esquemas múltiplos de niridazol, hycanthone e oxamniquina, juntamente com a cepa LE, mantida rotineiramente no laboratório e sabidamente suscetível aos três fármacos. Estudos comparativos entre as duas cepas mostraram diferenças na suscetibilidade aos agentes esquistossomicidas usados. Com a administração de hycanthone a diferença de suscetibilidade entre as duas cepas foi altamente significativa, com niridazol e oxamniquina as diferenças não foram tão evidentes, mas ainda assim suficientes para indicar menor suscetibilidade da cepa WW a esses agentes esquistossomicidas. Esta foi a primeira vez na literatura que se mostrou resistência de uma cepa na clínica e a metodologia para seu estudo (Katz *et al.* 1973). Um paciente foi tratado com hycanthone na dose única de 2,5mg/kg, por via intramuscular e não curado. Ao mesmo paciente foi administrada a dose única, oral de 14mg/kg de oxamniquina, que também não foi eficaz, uma vez que o paciente continuou eliminando ovos nas fezes. Experimentalmente, a cepa desse paciente foi isolada (denominada cepa MAP) e os estudos feitos em camundongos mostraram que a primeira e a segunda geração de vermes apresentaram resistência ao hycanthone e à oxamniquina, sendo, porém suscetível ao niridazole. Essa cepa foi usada para diversos estudos de resistência em laboratório (Pedro *et al.* 1980). Enk *et al.* 2008 relataram pela primeira vez a vantagem do tratamento no estágio inicial da infecção. Um técnico de laboratório se acidentou com um aquário contendo *B. glabrata* eliminando cercárias, apresentando poucas horas depois do acidente dermatite cercariana. O tratamento

realizado com oxamniquina 6 horas após o acidente foi considerado eficaz com base no acompanhamento com repetidos exames de fezes apresentando resultado negativo.

Diferenças na suscetibilidade à oxamniquina são inerentes à diversidade geográfica das cepas. Kaye (1978) preconiza a administração de uma dose única, via oral de oxamniquina de 15 a 20mg/kg para o tratamento da esquistossomose na América do Sul, Ilhas do Caribe e Oeste da África, de 30 mg/kg no Leste da África, África Central e Península Arábica e de 60 mg/kg ou mais para o tratamento no Egito, Sul da África e Zimbábwe.

Estima-se que mais de 13 milhões de tratamentos usando-se oxamniquina já foram feitos no Brasil, não havendo relato de óbito relacionado ao uso do medicamento (Katz 2005).

3.5 Praziquantel

O praziquantel foi desenvolvido em estudo conjunto dos pesquisadores dos laboratórios Bayer e Merck na metade da década de 70. Entre aproximadamente 400 compostos pirazinoisoquinolínicos sintetizados o praziquantel foi o antihelmíntico mais promissor contra trematódeos e cestódeos. O medicamento foi desenvolvido primeiramente para uso veterinário e mais tarde para tratamento em humanos. (Andrews *et al* 1983). Ele está incluído na Lista de Medicamentos Essenciais da Organização Mundial de Saúde.

Sua atividade esquistossomicida foi demonstrada, primeiramente contra *S. mansoni* usando camundongo como modelo animal (Gonnert & Andrews 1977). Baseado nos resultados experimentais de toxicidade e eficácia promissores, os ensaios clínicos em voluntários (Fase 1A) tiveram início em 1978. Logo após foram realizadas as fases IIA, IIB e III. A revisão dos primeiros ensaios clínicos realizados com praziquantel foi feita por Dollery (1991). A partir daí foram realizados estudos clínicos de avaliação de atividade do fármaco sobre as espécies principais de *Schistosoma* que acometem o homem. Os estudos na infecção por *S. haematobium* foram realizados em Zâmbia, no *WHO Tropical Diseases Research Centre* (Davis & Wegner 1979); em infecção por *S. mansoni* no Centro de Pesquisas René Rachou – FIOCRUZ - Belo Horizonte, Brasil (Katz *et al.* 1979). No caso da infecção por *S. japonicum* estudos duplo-cego de tolerância foram conduzidos em *Koma-Kyoritsu Hospital*, Japan (Ishizaki

et al. 1979), complementados por estudos clínicos de tolerância e eficácia realizados no *Schistosomiasis Control and Research Philippines* (Davis & Wegner 1979, Santos *et al.* 1979). Esses dados estão disponíveis em documento da Organização Mundial de Saúde (WHO 1998).

Experimentalmente, o praziquantel foi usado em camundongos, hamsters e macacos *Cebus* infectados experimentalmente pela cepa LE de *S. mansoni*. Observou-se que, em camundongos, doses orais de 100 e 50 mg/kg, durante cinco dias, produziram alterações significativas do oograma e deslocamento acentuado dos vermes para o fígado com um índice terapêutico de 153 mg/kg. Em hamsters, os vermes se mostraram mais sensíveis ao fármaco, sendo que a dose de 12,5 mg/kg/dia, administrada durante cinco dias causou alterações somente em 60% dos animais tratados. Foi necessário o dobro dessa dose para provocar 100% de deslocamento dos vermes para o fígado, 89% de mortalidade dos vermes e 100% de alteração do oograma. Em macacos *Cebus* tratados por via oral com doses totais de 30 ou 60mg/kg, divididas em três administrações diárias observou-se redução significativa no número de vermes, mas não houve parada de postura. Outro macaco *Cebus* tratado com dose única oral de 100 mg/kg e submetido à eutanásia 138 dias após o tratamento não apresentou vermes nem ovos no intestino ou reto (Pellegrino *et al.*1977).

O praziquantel é o fármaco eleito pela Organização Mundial de Saúde para o tratamento da esquistossomose, por apresentar atividade contra *S. mansoni*, *S. haematobium*, *S. japonicum*, *S. intercalatum* e *S. mattheei* (Gönnert & Andrews 1977, Andrews *et al.* 1983), apresentar alto percentual de cura, ser de baixa toxicidade, não apresentar risco genotóxico, ser ativo em dose única por administração oral e ser de baixo custo. Esse fármaco é um pó branco, tem gosto amargo e é estável em condições normais de armazenamento. É praticamente insolúvel em água, solúvel em etanol e em outros solventes orgânicos. Sua preparação comercial é uma mistura racêmica composta de partes iguais de *levo R (-)* e *dextro S (+)* isômeros. Ainda que os dois isômeros apresentem o mesmo grau de toxicidade (Liu *et al.* 1986) somente o enantiômero (-) possui atividade esquistossomicida com eficácia reconhecida *in vivo* e *in vitro* (Andrews *et al.* 1983, Xiao & Catto 1989, Wu *et al.* 1991). Como demonstrado por Wu *et al.* (1991) pacientes tratados com 20 mg/kg de peso corporal de *R (-)* praziquantel obtiveram a mesma taxa de cura e menos efeitos colaterais quando

comparados com pacientes tratados com 40 mg/kg de peso da mistura racêmica. Gonnert e Andrews (1977) mostraram que o fármaco apresenta melhor atividade nos estágios de cercária e verme adulto. Andrews (1981) observou que *in vitro* todos os estágios apresentaram suscetibilidade similar. Xiao *et al.* (1985), Sabah *et al.* (1986) e Pica Mattocia e Cioli (2004) confirmaram em estudos realizados *in vivo* e *in vitro* que as cercárias e os vermes adultos são mais suscetíveis à ação do praziquantel.

O praziquantel apresenta um grande espectro de ação, sendo ativo contra cestódeos e trematódeos, mas não contra os nematódeos (King & Mahmoud 1989). O fármaco possui biodisponibilidade de 80% e é rapidamente absorvido após a administração oral, alcançando concentrações séricas máximas de 0,2 a 2µg/ml, dentro de 1 a 2 horas após uma dose terapêutica de 40 mg/kg (Mandour *et al.* 1990). É eliminado através da urina e fezes, sendo que mais de 80% do fármaco é eliminada após 24 h (Steiner *et al.* 1976). Estudos sobre a biodisponibilidade do praziquantel no organismo indicam que o fármaco administrado após as refeições torna-se mais disponível (Massmirembwa & Hasler 1994). Por outro lado, há uma diminuição da biodisponibilidade com a ingestão concomitante com alguns fármacos como cloroquina, antiepiléticos e corticosteróides (Jung 1998). Alguns estudos associam a biodisponibilidade do praziquantel ao estado clínico do paciente. Aqueles que apresentam a forma hepatoesplênica grave, com conseqüente disfunção hepática apresentam menor taxa de metabolização do fármaco quando comparados aos que apresentam função hepática normal (El Guiniady *et al.* 1994). Nota-se também uma grande variação individual das concentrações plasmáticas de praziquantel atribuída a diferenças farmacocinéticas, inerentes ao metabolismo de cada indivíduo (Metwally *et al.* 1995).

A cimetidina, um inibidor de citocromo P450 e antagonista do receptor H2 da histamina, em associação com o praziquantel aumenta a biodisponibilidade desse último (Jung *et al.* 1997 e 1998, Olds *et al.* 1999). O praziquantel é administrado em dose única, por via oral e a dosagem recomendada para o tratamento em massa é de 40 a 60 mg/kg de peso corporal, apresentando, com essas doses, um percentual de cura contra o *S. mansoni* variando entre 60 a 90%, e causando redução de 90 a 95% no número de ovos, dependendo do nível da infecção (Silva & Andrade 1997). O praziquantel é eficaz em pacientes de todas as idades e formas clínicas da

esquistossomose, incluindo hepatoesplenomegalia (Bassily *et al.* 1985). Apresenta pouca atividade contra as formas imaturas do *Schistosoma* (Gryseels *et al.* 2001) como também contra os vermes machos, que são menos sensíveis à ação do fármaco (Pica-Mattocia & Cioli 2004).

Alternativas, como tratamentos realizados usando-se a associação de praziquantel e arteméter, uma vez que esse último apresenta atividade contra as formas imaturas do parasito, ou o tratamento em monoterapia utilizando praziquantel administrado em duas doses com intervalos de três semanas entre elas foram sugeridas como uma forma de contornar a baixa eficácia contra as formas imaturas do verme (De Clercq *et al.* 2000).

Efeitos colaterais provenientes do tratamento com praziquantel são pouco frequentes e passageiros, sendo os mais comuns: náusea, vômito, desconforto abdominal, anorexia e diarreia. Com referência ao sistema nervoso central foram relatados dores de cabeça, tontura, sonolência. Outras reações colaterais também foram relatadas, embora mais raramente, tais como: erupções cutâneas, urticária e algumas vezes febre e fadiga (Katz *et al.* 1979, Davis & Wegner 1979, Ishizaki *et al.* 1979, Santos *et al.* 1979). A freqüência e a severidade dos efeitos colaterais estão diretamente correlacionadas com a intensidade da infecção (Polderman *et al.* 1984). Stelma *et al.* (1995) relataram cólica, vômito, urticária e edema observados em 352 pacientes dentre os 422 tratados com praziquantel em um foco epidêmico. Como a gravidade dos efeitos foi maior nos pacientes com carga de infecção mais alta, os autores sugerem que os efeitos adversos podem estar relacionados à ação do fármaco sobre o parasito provocando reações alérgicas no paciente, e que também a morte dos vermes ou a migração deles do mesentério para o fígado pode causar embolia e cólica intestinal. O praziquantel apresenta pouca toxicidade (Frohberg 1989) e não apresenta riscos mutagênicos, carcinogênicos ou teratogênicos (Frohberg 1984, Kramers *et al.* 1991),

O FDA (*Food and Drug Administration*), agência controladora de medicamentos, localizada nos Estados Unidos classificou o praziquantel como um fármaco presumidamente seguro para ser administrado em gestantes. Baseando-se em estudos experimentais, entretanto é recomendado que mulheres que estejam amamentando, suspendam a amamentação por 48 horas após o tratamento (Olds 2003). A

Organização Mundial de Saúde preconiza o tratamento tanto em mulheres grávidas como em lactantes (WHO 2002).

Os mecanismos moleculares de ação do praziquantel ainda não são bem conhecidos (Cioli 2000). Aumento da atividade muscular, seguido de contração e paralisia do verme com posterior destruição do tegumento, foram relacionados à ação do fármaco. Logo após o contato com o fármaco o verme apresenta contração muscular, e como consequência perde a capacidade de fixação sendo arrastado para o fígado, e a reação inflamatória que ocorre nesse órgão ocasiona a morte do parasito (Pax *et al.* 1978). Observa-se ainda, após o contato do verme com o fármaco a deformação do tegumento, com os machos apresentando vacuolização e presença de bolhas na superfície do tegumento e as fêmeas apresentam danos nas camadas subtegumentares (Melhorn *et al.* 1981). Estudos demonstraram que a eficácia do praziquantel depende do estado imune do hospedeiro (Brindley & Sher 1987. Fallon *et al.* 1992, Ribeiro *et al.* 2004).

Experimentos realizados usando-se camundongos deficientes em células T, mostraram menor atividade do fármaco em comparação ao tratamento realizado em camundongos imuno competentes (Sabah *et al.* 1985). Sinergismo entre o sistema imune do hospedeiro e a eficácia do praziquantel foi observado em experimentos conduzidos em animais depletados de células B, que não responderam ao tratamento com praziquantel. Entretanto, quando foi administrado soro contendo anticorpos anti *S. mansoni* nos mesmos animais houve um aumento na resposta ao tratamento (Brindley e Sher 1987).

Alterações morfológicas provenientes da administração de praziquantel são acompanhadas do aumento da exposição de antígenos do parasito (Harnett & Kusel 1986), alguns dos quais já foram identificados e supostamente estimulam a resposta imune do hospedeiro, que beneficia a ação do fármaco, uma vez que a resposta imune do hospedeiro é condição essencial para a atividade do praziquantel. O início da ação do praziquantel se dá na membrana dos vermes, causando contração muscular e destruição do tegumento aumentando com isso a permeabilidade para certos cátions mono e divalentes, em especial o Ca^{2+} . O influxo de cálcio não se deve ao transporte direto pelo praziquantel, uma vez que o fármaco não atua como ionóforo (Pax *et al.* 1978, Blair *et al.* 1992).

O praziquantel administrado em monoterapia ou associado a corticóides apresentou bons resultados em pacientes apresentando acometimento cerebral (Scrimgeour & Gajdusek 1985, Watt *et al.* 1986). Também na fase aguda da esquistossomose mansoni o praziquantel apresentou bom índice de cura (Katz *et al.* 1980, Farid *et al.* 1987 Lambertucci 1995).

Calcula-se que cerca de 53 milhões de doses de praziquantel já tenham sido administradas no Egito, Brasil, China e Filipinas, sem registros de casos fatais (Fenwick *et al.* 2003).

3.6 Resistência aos Esquistossomicidas

Diferenças de suscetibilidade a fármacos esquistossomicidas aparecem independentemente dos pacientes terem sido tratados anteriormente com quimioterápicos específicos (Katz 2005).

Para tratar do assunto resistência deve-se primeiramente definir alguns conceitos básicos.

A resistência a fármacos se caracteriza pela diminuição permanente ou transitória da sensibilidade dos organismos aos efeitos de fármacos que interferem nas suas funções vitais. A resistência pode aparecer nos descendentes dos parasitos que apresentam resposta quimioterápica diminuída. A tolerância aos fármacos ocorre quando um parasito apresenta diminuição na resposta à terapêutica específica sem nunca ter sido exposto ao contato com o fármaco (Coles *et al.* 1986). As falhas terapêuticas aparecem quando fatores inerentes ao hospedeiro ou ao parasito influenciam a resposta ao tratamento específico. Entre esses fatores podem ser citados: absorção e metabolização do fármaco, idade, sexo e sistema imune do hospedeiro, associações mórbidas, diferença entre cepas e em relação ao parasito, estágio evolutivo, equilíbrio entre vermes machos e fêmeas ou suscetibilidade diferente ao fármaco (Katz 2005).

Os mecanismos de resistência aos fármacos em muitos organismos são semelhantes, e os mais comuns são: diminuição na captação do fármaco pela célula, diminuição ou inativação do fármaco após a administração, alteração da formação do complexo alvo-fármaco, exclusão do fármaco para o exterior da célula e maior eficiência do reparo de DNA. Os mecanismos de ativação do fármaco podem ser suprimidos ou

perdidos. A interação do fármaco com o alvo pode ter menor eficácia devido ao aumento da competição pelo substrato ou pela interação do alvo. O aparecimento de resistência a um determinado fármaco pode gerar consequências graves em longo prazo, principalmente considerando doenças que apresentam somente um fármaco para tratamento, como é o caso da esquistossomose, que vem sendo tratada quase que exclusivamente com o praziquantel. O desenvolvimento de resistência pode ser prevenido com o uso racional de fármacos e com a administração de fármacos em associação (Lage 2005).

Os principais fatores que podem levar ao desenvolvimento de resistência aos fármacos são o tratamento de apenas uma parte da população infectada, tratamentos em intervalos de tempo prolongados, mudanças da dosagem do fármaco utilizada por um programa de controle e o tratamento com doses subcurativas (Silva & Andrade 1997).

Resistência do *S. mansoni* à oxamniquina já foi relatada por vários autores (Rogers e Bueding 1971, Katz et al 1973, Dias et al. 1978, Pedro et al. 1980, Araújo et al. 1980, Dias et al. 1982, Coles et al. 1987, Dias et al. 1988, Guimarães et al. 1979, Drescher et al. 1993, Fallon & Doenhoff 1994, Araújo et al. 1996, Coelho et al. 1997, Silva & Andrade 1997, Conceição et al. 2000, Bonesso-Sabadini & Dias 2002). Resistência ao praziquantel foi registrada em cepas de *S. mansoni* isoladas na África e no Brasil, (Tsai et al. 2000, Liang et al. 2001a,b, William et al. 2001, Bonesso-Sabadini & Dias 2002).

Outros autores consideram a diminuição da eficiência do praziquantel não como resistência ao fármaco, mas proveniente da intensidade de infecção ou das condições imunológicas inerentes ao hospedeiro (Gryseels et al. 2001, Danso-Appiah & De Vlas 2002). Como já foi dito anteriormente o praziquantel apresenta boa eficácia esquistossomicida, poucos efeitos colaterais e tóxicos, é ativo contra todas as espécies de *Schistosoma* que parasitam o homem, de administração oral e de baixo custo, porém, de encontro a essas vantagens surge o aparecimento de resistência, motivo de preocupação para os órgãos nacionais e internacionais de saúde e para os estudiosos do assunto. O desenvolvimento de resistência ao praziquantel tem sido objeto de estudos experimentais e clínicos e, apesar de ser um assunto controverso é preciso ter

sempre em mente a possibilidade do aparecimento de isolados de *Schistosoma* resistentes a esse fármaco.

Diferenças na resposta ao tratamento específico já foram relatadas por vários autores. Em 1955, Gönnert & Vogel relataram diferença na suscetibilidade de cepas geográficas de *S. mansoni* aos fármacos específicos. Os autores detectaram que a cepa da Libéria foi mais sensível à ação parasiticida do lucanthone que a cepa do Egito. Nesse mesmo trabalho foi testada a ação do miracil D em diferentes cepas de *S. mansoni* e observou-se que o fármaco mostrou diferenças no efeito terapêutico, conforme cada uma das cepas estudadas. Hsu *et al.* (1963) estudaram experimentalmente, usando camundongos albinos, o efeito do “stibofen” e do tártaro emético em 4 cepas de *S. japonicum*. A cepa Japonesa mostrou-se mais resistente ao tratamento com os dois fármacos do que as cepas Chinesa, Formosa e Filipina, ao passo que a suscetibilidade das três últimas cepas tratadas com estes compostos antimoniais não apresentou diferenças estatisticamente significativas. Os autores sugerem que a dosagem dos fármacos a ser usada em esquistossomose japônica nas diferentes áreas endêmicas deve variar de acordo com a suscetibilidade da cepa local do parasita. Thompson *et al.* (1965) notaram variação na suscetibilidade de duas cepas de *S. mansoni*, de regiões geográficas diferentes, ao tratamento com tris-(p-aminofenil) carbonium. Lee *et al.* (1971) encontraram que a cepa NIH de Porto Rico foi mais suscetível ao hycanthone e se mostrou relativamente mais resistente ao “stibofen” do que a cepa da Libéria. Outra cepa originária de Porto Rico foi também testada e se mostrou tão suscetível ao tratamento quanto outras cepas não originárias dessa localidade. A maior suscetibilidade de vermes machos ocorreu quando o tratamento foi feito com hycanthone e lucanthone. Os resultados apresentados indicaram que diferenças na suscetibilidade ao tratamento com fármacos esquistossomicidas ocorrem em *S. mansoni* e que toda resistência aos quimioterápicos encontrada na clínica deve ser avaliada em ensaios experimentais. Rogers & Bueding (1971) usaram ovos de vermes sobreviventes de camundongos e hamsters infectados experimentalmente com uma cepa de *S. mansoni* de Porto Rico tratados com 60mg/kg de hycanthone por via intramuscular e que voltaram a apresentar ovos viáveis um ano após o tratamento, para dar início a uma nova geração de vermes. Os descendentes mostraram-se resistentes ao tratamento com hycanthone. Essa resistência manteve-se pelo menos por três

gerações subseqüentes, quando as observações foram interrompidas. Outros autores seguindo essa mesma linha experimental, não obtiveram sucesso na reprodução dos dados usando outras cepas (Yarinsky *et al.* 1974, Dias & Oliver 1986). Katz *et al.* (1973) isolaram uma cepa de *S. mansoni* de dois pacientes tratados com hycanthone por duas vezes e com niridazol por uma vez e ainda assim continuavam eliminando ovos viáveis nas fezes. Camundongos infectados com a cepa isolada (denominada WW) foram tratados com esquemas múltiplos de niridazol, hycanthone e oxamniquina, juntamente com a cepa LE, mantida rotineiramente no laboratório e sabidamente suscetível aos três fármacos. Estudos comparativos entre as duas cepas mostraram diferenças na suscetibilidade aos agentes esquistossomicidas usados. Com a administração de hycanthone a diferença de suscetibilidade entre as duas cepas foi altamente significativa, com niridazol e oxamniquina as diferenças foram menores, mas mesmo assim suficientes para indicar menor suscetibilidade da cepa WW a estes agentes esquistossomicidas. Esta foi a primeira vez na literatura que se mostrou resistência de uma cepa na clínica e a metodologia para seu estudo (Katz *et al.* 1973). Bueding *et al.* (1973) testaram a atividade do hycanthone em três cepas diferentes isoladas em Porto Rico e que estavam sendo mantidas experimentalmente em diferentes laboratórios há vários anos. Os autores encontraram diferenças significativas na suscetibilidade dessas cepas ao hycanthone. Bruckner (1974) testou a suscetibilidade das cepas da Libéria e de Porto Rico quando tratadas com três fármacos esquistossomicidas – lucanthone, SQ 18.506 e “stibofen”. Grupos de camundongos infectados experimentalmente com cercárias oriundas de cada uma das cepas foram tratados com os fármacos esquistossomicidas. Os animais foram sacrificados 90 dias após a infecção com vistas à observação de três parâmetros: eclosão de miracídios, cura parasitológica e redução no número de vermes. A cepa da Libéria mostrou ser mais sensível ao tratamento com os três fármacos testados do que a cepa de Porto Rico. Jansma *et al.* (1977) conseguiram selecionar resistência ao hycanthone usando o seguinte esquema: camundongos infectados com *S. mansoni* foram tratados aos 28 dias de infecção com hycanthone em dose única de 60 mg/kg, por via intramuscular. Os ovos produzidos pelos vermes tratados, após maturação, geraram esquistossômulos resistentes ao hycanthone até a décima primeira geração. A resistência ao hycanthone foi observada em quatro das cinco cepas de *S. mansoni* testadas. Campos *et al.* (1976) relataram o

aparecimento de resistência em um paciente de 54 anos, que após o tratamento com hycanthono continuou a apresentar ovos viáveis nas fezes. Miracídeos provenientes desses ovos foram usados para infectar caramujos e posteriormente camundongos. Os grupos controles do experimento foram constituídos por camundongos infectados com cercárias liberadas por caramujos infectados com miracídeos provenientes de ovos de outro paciente da mesma localidade, porém não submetido a tratamento específico e de paciente de outra área geográfica. Na avaliação de atividade, os vermes dos dois grupos controle apresentaram parada de postura total quando tratados com hycanthono, enquanto o grupo de camundongos infectados com a cepa do paciente resistente ao hycanthono apresentou vermes com postura normal, inclusive com ovos viáveis. Os autores concluíram que cepas humanas de *S. mansoni* podem apresentar resistência ao hycanthono e que essa resistência pode ser transmitida a animais de laboratório. Jansma *et al.* (1977) conseguiram obter vermes resistentes ao hycanthono em diversas cepas de *S. mansoni*. A resistência foi observada na progênie de vermes cujos hospedeiros haviam sido tratados com hycanthono na fase pré-patente (28 dias após a exposição às cercárias) e na fase patente da infecção (54 a 70 dias após a exposição às cercárias). Os vermes resistentes ao hycanthono mostraram resistência cruzada quando foram usados outros fármacos esquistossomicidas relacionados estruturalmente com o hycanthono, como a oxamniquina e dois derivados cloroindazólicos (IA-3 e IA-4), mas não foi observada resistência quando se usou niridazol ou outros compostos nitroheterocíclicos (SQ 18.506 ou nitrodifenilaminoisotiocianato). Yarinsky (1977) comentando o trabalho publicado por Campos *et al.* (1976) afirma que os dados apresentados pelos autores não são conclusivos de resistência induzida pelo hycanthono. Como explicação ele usa o fato de que como ovos de *S. mansoni* isolados de fezes de paciente não tratado, proveniente da mesma localidade do paciente resistente, deram origem, em camundongos, a esquistossomos que responderam muito bem ao tratamento com hycanthono, pode haver mais de uma cepa na localidade. O autor conclui que o assunto indução de resistência ao hycanthono ainda era muito obscuro, por falta de mais estudos nesse sentido. Dias *et al.* (1978) isolaram uma linhagem de *S. mansoni* proveniente de um paciente tratado com hycanthono (2,5 mg/kg, i.m) e com oxamniquina (14 mg/kg, oral) usando o esquema miracídio – caramujo – cercária – camundongo. Cinquenta dias após a

infecção foram tratados dois grupos de camundongos, um com hycanthone 80mg/kg, im e outro com oxamniquina 100 mg/kg, oral e um terceiro grupo sem tratamento funcionou como o controle. Esse mesmo esquema foi seguido para camundongos infectados com a linhagem BH, mantida rotineiramente no laboratório. Após 10 dias do tratamento os camundongos foram sacrificados para se proceder à perfusão e observação do oograma. Os resultados obtidos mostraram que os camundongos infectados com a linhagem BH e tratados com ambos os fármacos apresentaram 100% de alteração do oograma, enquanto aqueles infectados com a nova linhagem não apresentaram alteração no oograma, evidenciando, dessa maneira a resistência em linhagem de *S. mansoni* proveniente de paciente tratado por hycanthone e oxamniquina. Yarinsky (1978) no intuito de confirmar ou refutar a hipótese de que vermes adultos de *S. mansoni* (e/ou a progênie desses vermes) podem se tornar resistentes ao hycanthone se tratados no 28^o dia de vida, procedeu a um estudo experimental usando a cepa SWR1-PR. Concluiu que, nas condições experimentais conduzidas no laboratório, não ocorreu resistência nem subsequente transmissão genética de resistência ao hycanthone. Seguindo a mesma metodologia usada por Rogers e Bueding (1971) não foi possível induzir resistência ao hycanthone e a oxamniquina usando-se a cepa LE (Araujo 1978). Um paciente tratado com a dose única de 2,5mg/kg hycanthone, por via intramuscular não foi curado. Ao mesmo paciente foi administrada a dose única, oral de 14mg/kg de oxamniquina que também não foi eficaz, uma vez que o paciente continuou eliminando ovos nas fezes. Experimentalmente, a cepa desse paciente foi isolada (denominada cepa MAP) e os estudos conduzidos em camundongos mostraram que as duas primeiras gerações de vermes apresentaram resistência ao hycanthone e oxamniquina, mas não ao niridazol (Pedro *et al.* 1980). Kinotti (1987) sugere que a resistência à oxamniquina é controlada por um único gene autossômico recessivo. Em cepas de *S. mansoni* resistentes à oxamniquina, a inibição da síntese de ácido nucléico no parasita após o tratamento foi reversível, enquanto naquelas suscetíveis a inibição foi irreversível (Pica-Mattoccia *et al.* 1989). A resistência à oxamniquina ficou evidente quando esquistossômulos foram capazes de sobreviver à dose 1000 vezes maior do que a dose eficaz para parasitas suscetíveis (Pica-Mattoccia *et al.* 1993). A ausência da enzima ativadora do fármaco (sulfotransferase) nos vermes resistentes é a responsável pelo aparecimento da resistência à oxamniquina. É possível que a inibição na síntese

de RNA e DNA que ocorre nos parasitos susceptíveis seja irreversível e reversível naqueles resistentes (Cioli *et al.* 1993). O primeiro caso experimental de resistência ao praziquantel foi relatado por Fallon e Doenhoff (1994), que com o objetivo de induzir resistência à oxamniquina e ao praziquantel trabalharam com um “pool” de cercárias provenientes de quatro isolados de *S. mansoni* de regiões geográficas diferentes. Após sete tratamentos com doses subcurativas de praziquantel, que foram sendo aumentadas a cada tratamento e em passagens sucessivas do parasito, em camundongos, obtiveram uma cepa em que 93% dos vermes sobreviveram a três doses de 300 mg/kg de praziquantel, enquanto no grupo controle apenas 10% dos vermes sobreviveram ao mesmo esquema de tratamento. Entretanto, a cepa foi sensível ao tratamento com oxamniquina, demonstrando tratar-se de resistência específica. Não foi observada resistência cruzada entre os dois fármacos. Resistência ao praziquantel também foi observada por Fallon *et al.* 1995, Stelma *et al.* 1995, Araujo *et al.* 1996, Ismail *et al.* 1996, 1999, Bonesso-Sabadini & Dias 2002. Estudos experimentais realizados em camundongos infectados com isolados provenientes de Richard Tool e posteriormente tratados com praziquantel apresentaram resposta terapêutica baixa quando os resultados foram comparados com uma cepa de *S. mansoni* mantida no laboratório (Fallon *et al.* 1995).

No Egito, onde o praziquantel é bastante usado para tratamentos individuais e em massa, os estudos mostraram que um pequeno percentual de pacientes (1 a 2,4%) pode estar infectado com parasitas que não respondem à terapêutica específica com praziquantel, mesmo após tratamentos sucessivos usando doses altas do fármaco. Camundongos infectados com isolados dos pacientes, da referida localidade, não curados e tratados com praziquantel apresentaram resposta inferior àquela esperada (Ismail *et al.* 1996). Experimentos *in vitro* com vermes provenientes desses isolados em contato com o praziquantel confirmaram os resultados obtidos *in vivo* (William *et al.* 2001). Entretanto, se esse percentual baixo de cura é devido à resistência determinada geneticamente ou a tolerância dos vermes ao praziquantel, no Senegal e no Egito, ainda não está totalmente esclarecido por causa da insuficiência de dados. A baixa atividade do praziquantel nessas áreas pode ser atribuída a vários fatores, dentre os quais, um percentual baixo de maturação dos vermes, área de transmissão intensa,

reinfecções rápidas e/ou ausência de resposta imune da população devido à exposição ser recente (Fallon *et al.* 1996).

Na busca de marcadores bioquímicos e genômicos para resistência vários experimentos têm sido conduzidos. Cioli *et al.* (1992) mostraram que a oxamniquina funciona como substrato para a sulfotransferase, presente nos vermes susceptíveis, mas não naqueles resistentes, que apresentam deleção do gene. Estudos sugerem que o mecanismo de ação da oxamniquina está relacionado com a capacidade de inibição irreversível da síntese dos ácidos nucléicos nos vermes. Porém, observou-se que enquanto nos vermes sensíveis ao medicamento a capacidade de inibição é irreversível, naqueles resistentes a inibição é reversível, pois esses vermes voltam a sintetizar os ácidos nucléicos assim que o medicamento é eliminado (Cioli *et al.* 1995).

Um estudo realizado em camundongos infectados com isolados de *S. mansoni* provenientes de ovos eliminados por pacientes egípcios com histórico de dois tratamentos com 40 mg/kg de praziquantel, e um terceiro tratamento com 60mg/kg do mesmo fármaco, mostrou menor suscetibilidade ao tratamento experimental com praziquantel quando comparado a outro isolado proveniente de ovos de um paciente não tratado anteriormente e que, tratado após o isolamento da cepa, apresentou cura parasitológica com a dose única, oral de 40mg/kg de praziquantel (Ismail *et al.* 1996). O mecanismo de resistência ao praziquantel ainda não é conhecido. Não foram observadas diferenças significativas no DNA genômico entre cepas suscetíveis aos fármacos e aquelas selecionadas experimentalmente como sendo resistentes, ainda que a atividade enzimática do citocromo-c oxidase mitocondrial mostrasse redução de até 4 vezes nas cepas resistentes aos fármacos quando comparada com as cepas sensíveis, sem que a correlação entre essas duas observações pudesse ser esclarecida (Pereira *et al.* 1998). Valle e colaboradores (2003) após sequenciarem o cDNA que codifica as subunidades SmCavb1 e SmCavb2 mostraram não ter diferença entre elas quando foram comparadas cepas sensíveis e resistentes. Mutações na subunidade b dos canais de cálcio ou diferenças na expressão de genes que codificam estes canais parecem estar relacionadas com pelo menos um dos mecanismos de resistência ao praziquantel. O nível de mRNA codificador para as subunidades SmCavb1 e SmCavb2 de várias cepas em diferentes estágios de desenvolvimento foi analisado por *northern blot* e não foram observadas diferenças na expressão destas

subunidades. A ausência dos sítios de fosforilação PKC nas subunidades b e a presença destes sítios em outras subunidades que não estão correlacionadas com a sensibilidade ao praziquantel, em sistemas heterólogos (Kohn *et al.* 2003), mostra a necessidade de se estudar mais o envolvimento desta subunidade dos canais de cálcio nos mecanismos de resistência ao praziquantel. (Greenberg 2005).

Coelho *et al.* 1998 relataram que uma cepa proveniente de um paciente tratado com oxamniquina e praziquantel e não curado (cepa R1) apresentou a mesma suscetibilidade à oxamniquina que a cepa LE, mantida rotineiramente no laboratório e de comportamento conhecido frente aos agentes esquistossomicidas, ao ser tratada no primeiro ou no sexto dia da infecção. Entretanto quando o tratamento foi realizado 25 dias após a infecção, com o mesmo fármaco, houve resistência.

Quando isolados obtidos de pacientes tratados e não curados foram examinados usando-se camundongos como modelo animal, o valor da DE_{50} de praziquantel se mostrou de 2 a 5 vezes mais alta do que aquela apresentada pelo isolado controle (Ismail *et al.* 1999). Quando ovos de *S. mansoni* de isolados resistentes ao praziquantel obtidos de pacientes egípcios foram usados para infectar camundongos observou-se que fatores inerentes aos vermes foram mais responsáveis pela redução da suscetibilidade ao fármaco do que aqueles inerentes ao hospedeiro, numa análise de correlação realizada entre a atividade do fármaco em estudos *in vitro* e *in vivo* (Ismail *et al.* 1999).

Experimentos baseados na dose efetiva de praziquantel para matar 50% dos vermes (ED_{50}) têm sido usados para avaliar a resistência ao fármaco em cepas de campo. Uma cepa brasileira de *S. mansoni* (denominada Ouh) apresentou ED_{50} maior do que aquela apresentada por outras cepas caracterizando, possivelmente, resistência. (Bonesso-Sabadini & Dias 2002). Doenhoff *et al.* (2002) aventam a hipótese de que a diminuição da atividade do praziquantel em áreas endêmicas pode ser explicada pela carga alta de vermes, taxas altas de infecção e reinfecção responsáveis pela presença concomitante de vermes imaturos e maduros, considerando-se que o fármaco não afeta os vermes imaturos. Cioli *et al.* (2004) trabalharam com nove isolados diferentes de *S. mansoni* usando camundongos infectados experimentalmente e tratados com praziquantel. Dos nove isolados, quatro não tiveram contato prévio com o fármaco, e cinco já haviam apresentado resistência

ao praziquantel, através de indução em tratamentos repetidos dos animais ou seleção através de isolados de pacientes tratados e não curados. Os camundongos foram tratados, aos 49 dias de infecção, com praziquantel nas doses totais de 125, 250, 500 e 1000 mg/kg, divididas em cinco administrações diárias, durante cinco dias consecutivos. Os animais foram sacrificados duas semanas após o término do tratamento e o parâmetro utilizado para caracterização da resistência foi a ED₅₀. As cepas consideradas susceptíveis mostraram uma ED₅₀ inferior a 100 mg/kg (média de 70), enquanto nas resistentes essa dose foi superior a 100 mg/kg (média de 209), diferença estatisticamente significativa.

Na clínica, foi observado redução no percentual de cura e falhas terapêuticas relacionadas ao tratamento com praziquantel em pacientes do Senegal (Stelma *et al.* 1995, Picquet *et al.* 1998, Gryseels *et al.* 2001) e do Egito (Ismail *et al.* 1996,1999). No Brasil um grupo de 90 crianças foi tratado com oxamniquina 20mg/kg, dose única, via oral e outro grupo de 110 crianças foi tratado com praziquantel 60mg/kg dose única, via oral. O percentual de cura foi semelhante nos dois grupos, situando-se em aproximadamente 85%. Os doze pacientes que não se curaram foram tratados novamente com a medicação inversa ao primeiro tratamento. Desses, somente um continuou eliminando ovos de *S. mansoni* nas fezes, mostrando que os pacientes não curados com oxamniquina foram curados com praziquantel e vice-versa. (Katz *et al.* 1991). O primeiro relato alarmante de possível resistência ao praziquantel veio de um foco de esquistossomose situado no Senegal, onde o tratamento com o fármaco mostrou um percentual de cura muito baixo (18-39%) (Gryseels *et al.* 1994; Stelma *et al.* 1995). Em Richard Toll (Ndombo) foram tratados 138 pacientes, com a idade variando entre 5 e 75 anos, com oxamniquina, na dose única de 20mg/kg ou praziquantel também em dose única de 40mg/kg. Avaliação dos pacientes realizada seis semanas após o tratamento mostrou que 79% dos pacientes tratados com oxamniquina estavam curados enquanto o grupo tratado com praziquantel apresentou somente 36% de cura (Stelma *et al.* 1997). Tentativas de explicação para esses resultados é que eles são devidos, principalmente, a situações epidemiológicas peculiares ao foco, isto é, pacientes com cargas altas de vermes, taxas altas de transmissão e reinfecções, com a probabilidade da presença concomitante de vermes maduros e imaturos, ausência de resposta imune dos hospedeiros por se tratar de um

foco de transmissão recente, fármaco usado com qualidade baixa ou resistência das cepas locais (Cioli 2000; Gryseels *et al.* 2001).

Tendo em vista tantos relatos de indução de resistência ao praziquantel e a oxamniquina em laboratório, e diferenças de suscetibilidade aos quimioterápicos apresentadas na clínica fica clara a necessidade da busca de métodos alternativos para o tratamento da esquistossomose.

3.7 Associação de Fármacos

O conceito de associação terapêutica baseia-se no potencial sinérgico ou aditivo de dois ou mais medicamentos para melhorar a eficácia terapêutica e também impedir o desenvolvimento de resistência aos componentes individuais da associação (WHO 2001).

Os critérios a serem considerados para escolha de associações de medicamentos são os seguintes:

- 1 - Eficácia terapêutica da associação, independentemente da eficácia dos componentes individuais;
- 2 - Segurança dos medicamentos em associação, especialmente para grupos de grande risco;
- 3 - Potencial para uso generalizado da associação a todos os níveis do sistema de cuidados de saúde, incluindo o seu uso em tratamento domiciliário;
- 4 - Potencial de conformidade do consumidor com o tratamento;
- 5 - Custo-eficácia;
- 6 - Potencial para retardar ou evitar desenvolvimento de resistência;
- 7 - Outros fatores incluindo disponibilidade do produto, capacidade de produção e potencial para uso generalizado a um nível sub-regional. (WHO 2001).

A associação de diferentes medicamentos, usando dosagens menores do que aquela considerada curativa para cada um deles é uma alternativa para o aumento da eficácia terapêutica dos fármacos em várias doenças. Esse recurso é eficaz para retardar, minimizar ou evitar o aparecimento de resistência e diminuir os efeitos colaterais e tóxicos (Delgado *et al.* 1992).

Por possuírem diferentes mecanismos de ação, espera-se que a associação de praziquantel com oxamniquina apresente um efeito complementar (Delgado *et al.* 1992).

A associação oxamniquina e praziquantel foi testada tanto experimentalmente quanto na clínica (Shaw & Brammer 1983, Pugh & Teesdale 1983, Campos *et al.* 1985, Creasey *et al.* 1986, Dietze & Prata 1986, Campos *et al.* 1987, Zwingenberger *et al.* 1987, Botros *et al.* 1989, Campos *et al.* 1989, Farid *et al.* 1990, Delgado *et al.* 1992, Gryscheck *et al.* 2004). Entretanto os resultados dessa associação são conflitantes necessitando mais estudos utilizando outros critérios de avaliação.

O primeiro estudo experimental realizado usando oxamniquina e praziquantel em associação em camundongos infectados com *S. mansoni* mostrou o benefício da combinação em detrimento dos dois fármacos usados em monoterapia, revelando efeito sinérgico entre os dois fármacos. Os autores observaram o efeito sinérgico da associação oxamniquina-praziquantel no tratamento da esquistossomose mansoni experimental no período patente da infecção. Camundongos infectados com aproximadamente vinte pares de vermes foram tratados após sete a oito semanas da infecção, por via oral e em dose única com doses crescentes dos fármacos em associação ou em monoterapia. Os animais foram sacrificados 14 dias após o tratamento para se proceder à avaliação da atividade. O valor de ED₉₉, definido como a dose total de fármaco necessária para matar 99% dos vermes machos, foi calculado. Os dados, avaliados através de análise de regressão, mostraram o efeito sinérgico entre os dois fármacos (Shaw & Brammer 1993).

Campos *et al.* 1985, utilizando a associação praziquantel (15 mg/kg) e oxamniquina (7,5 mg/kg) concluíram pelo benefício da associação. Estes resultados não foram confirmados por outros pesquisadores que concluíram pela falta de ação sinérgica com essa associação em seus estudos (Dietze & Prata 1986, Zwingenberger *et al.* 1987, Gryscheck *et al.* 2004).

Campos *et al.* (1987) estudaram, experimentalmente, a ação esquistossomicida da associação oxamniquina-praziquantel no período pré-patente (pré-postural) da infecção. Pesquisa de ovos nas fezes dos animais e recuperação de vermes mostraram ovos imaturos nas fezes e presença de vermes vivos concluindo que com as dosagens utilizadas e os critérios de cura estabelecidos a eficácia da associação foi nula. Na fase patente da infecção foi verificada a ação sinérgica da associação oxamniquina-praziquantel em camundongos infectados e tratados com as mesmas doses de oxamniquina e praziquantel utilizadas no experimento anterior (fase pré-patente). Com

a associação dos dois medicamentos foi possível zera a carga parasitária em 19 dos 20 camundongos tratados (Campos *et al.* 1989). A eficácia da combinação de oxamniquina com praziquantel nos diferentes estágios da infecção foi estudada por Botros *et al.* (1989). Experimentos em camundongos resultaram em 96% de redução na carga de vermes e ausência de ovos no fígado e intestino dos animais quando o tratamento foi realizado com a associação 4 horas após a infecção. Delgado *et al.* 1992 estudaram, experimentalmente, a suscetibilidade de cepas de *S. mansoni* à ação da oxamniquina, praziquantel ou à associação dos dois fármacos. O esquema terapêutico usando as doses subcurativas de oxamniquina e praziquantel em associação ocasionou redução significativa no número de vermes adultos. Esses resultados mostraram a ação sinérgica da associação, uma vez que, para se obter a mesma taxa de redução de vermes, foram necessárias doses muito mais altas de cada um dos fármacos usadas em monoterapia.

Resultados relativos ao tratamento da esquistossomose experimental com diferentes combinações de oxamniquina e praziquantel mostraram que o tratamento com 50 mg/kg de oxamniquina em monoterapia não apresentou atividade terapêutica e que a combinação dos dois fármacos apresentou resultados melhores do que o tratamento com 400 mg/kg de praziquantel, fármaco considerado, atualmente, como primeira escolha no tratamento da esquistossomose (Doenhoff 2002). A associação oxamniquina e praziquantel causou danos mais intensos na membrana tegumentar do verme adulto de *S. mansoni* do que aqueles provocados pelo uso dos fármacos testados isoladamente em experimentos *in vitro* (Oliveira 2005).

Pugh & Teesdale (1983) em estudos clínicos realizados na África em uma população de escolares apresentando infecção mista (*S. mansoni* e *S. haematobium*) avaliaram a eficácia da associação oxamniquina-praziquantel. Os autores concluíram que os dois fármacos apresentaram alta eficácia quando administradas simultaneamente nas doses únicas de 7,5 e 15mg/kg, respectivamente. O tratamento usando a associação apresentou menos efeitos colaterais do que aqueles realizados com os fármacos em monoterapia. O fato relevante nesse estudo foi a cura dos indivíduos infectados pelo *S. haematobium*, considerando-se que a oxamniquina tem pouco valor clínico nas infecções por esta espécie do parasito. Campos *et al.* (1985) trataram 35 pacientes adultos portadores da forma intestinal da esquistossomose,

utilizando a associação de oxamniquina e praziquantel. O tratamento foi realizado com a metade da dose recomendada para oxamniquina (7,5mg/kg) e um quarto daquela recomendada para o praziquantel (15mg/kg). Efeitos colaterais como tontura, náusea, cefaléia, vômito, prurido e dor abdominal foram relatados por 13 dos 35 pacientes, porém foram efeitos leves e passageiros. Dos 35 pacientes tratados, 30 concluíram o estudo e foram encontrados ovos nas fezes de apenas um paciente no terceiro mês pós-tratamento. Esses resultados não foram confirmados por outros pesquisadores que concluíram pela falta de ação sinérgica com essa associação na clínica (Dietze & Prata 1986, Zwingenberger *et al.* 1987, Gryscheck *et al.* 2004). Dietze e Prata (1986) relataram um percentual de cura baixo (39,6%) mostrando ausência de sinergismo entre oxamniquina e praziquantel administrados em associação em um estudo clínico realizado em uma área endêmica brasileira (Caatinga do Moura – AL). Creasey *et al.* (1986) avaliaram a eficácia da associação oxamniquina-praziquantel usando dosagens diferentes dos dois fármacos no tratamento de 58 escolares de 7 a 16 anos de idade, infectados concomitantemente com *S. mansoni* e *S. haematobium* em Zimbábue. Com as doses de 10mg/kg de oxamniquina + 20mg /kg de praziquantel a associação se mostrou efetiva. Desconforto abdominal foi relatado por 70% das crianças. O efeito sinérgico entre os dois fármacos foi observado somente para o tratamento da infecção por *S. mansoni*, resultados que contrariam aqueles relatados por Pugh e Teesdale em 1983. Zwingenberger *et al.* (1987) compararam a eficácia da associação de doses baixas de oxamniquina (7,5 mg/kg) e praziquantel (20 mg/kg) com os fármacos empregados isoladamente 18 e 40 mg/kg, respectivamente, no tratamento da esquistossomose mansoni, em uma área endêmica do nordeste brasileiro (Crato-CE). Os pacientes foram tratados com oxamniquina, praziquantel ou com os dois fármacos em associação. Exames de fezes realizados 3, 6 e 12 meses após o tratamento apresentaram resultados semelhantes entre a associação e as drogas empregadas em monoterapia. O tratamento com a associação foi bem tolerado por todos os pacientes. Farid *et al.* (1990) usando 10mg/kg de oxamniquina associada a 20mg/kg de praziquantel em 20 pacientes relataram percentual de cura baixo, concluindo pela falta de sinergismo da associação. Gryscheck *et al.* (2004) trabalharam com 131 pacientes que foram tratados em dose única com 12,5mg/kg de cada um dos fármacos (61 pacientes) ou 7,5 mg/kg de oxamniquina e 15mg/kg de praziquantel (70 pacientes).

Efeitos colaterais como tontura, sonolência, náuseas, vômitos e dor abdominal foram relatados pelos pacientes. Houve cura parasitológica em 59% dos pacientes tratados com os fármacos em monoterapia e de 41% para aqueles tratados com os fármacos em associação.

Um estudo realizado na África contou com 296 crianças infectadas pelo *S. haematobium*. Os pacientes foram tratados com praziquantel e placebo ou praziquantel associado ao artesunato (40 mg/kg de praziquantel mais 12mg/kg de artesunato – dose total dividida em 5 administrações diárias durante 5 dias consecutivos. O percentual de cura encontrado não apresentou diferença estatisticamente significativa - 73% para o praziquantel e 81% para a associação (Borrmann *et al.* 2001).

Desde que praziquantel e arteméter apresentam eficácia em diferentes estágios de desenvolvimento do *Schistosoma* a utilização desses dois fármacos em associação pode apresentar maior eficácia do que cada um deles administrado separadamente. Hamsters com infecção mista de vermes maduros e imaturos de *S. mansoni* foram tratados simultaneamente com praziquantel e arteméter. A redução da carga de vermes apresentada pelo regime de associação dos fármacos foi significativamente maior do que aquela apresentada pelo praziquantel em monoterapia, mas não foi significativamente diferente da apresentada pelo arteméter administrado isoladamente (Utzinger *et al.* 2001).

A associação do praziquantel com o arteméter pode representar uma alternativa para o tratamento da esquistossomose em áreas endêmicas, onde, devido às altas taxas de reinfecções existe concomitância de vermes imaturos e maduros. Como cada um dos dois fármacos age no período patente (praziquantel) ou pré-patente (arteméter) da infecção, a associação dos dois traria o benefício do extermínio de todos os parasitas (Xiao *et al.* 2002).

A administração da cimetidina simultaneamente ao praziquantel bloqueou o metabolismo do praziquantel em ratos aumentando significativamente a concentração do esquistossomicida no soro dos animais (Diekmann *et al.* 1989). O mesmo efeito sobre o metabolismo do praziquantel foi observado quando o mesmo foi administrado concomitantemente com cetoconazol e miconazol (Diekmann *et al.* 1989). Administração conjugada de praziquantel (200 mg/kg/dia durante 2 dias consecutivos) e cimetidina na mesma dosagem provocou 100% de mortalidade dos vermes (Ebeid *et al.*

1994). Estudos de associação de praziquantel com a cimetidina, um inibidor de citocromo P450 e antagonista do receptor H₂ da histamina, demonstraram que a cimetidina aumenta em até duas vezes e meia a concentração do praziquantel no plasma e, como consequência aumenta a biodisponibilidade desse medicamento no organismo (Jung *et al.* 1997, 1998, Olds *et al.* 1999). A administração de miconazol associado ao praziquantel, aumentou em até 5 vezes a concentração do praziquantel no plasma em estudos experimentais realizados em ratos (Diekmann *et al.* 1989). Por outro lado, o uso concomitante de corticosteróides e praziquantel diminui a biodisponibilidade do praziquantel no organismo (Vasquez *et al.* 1987).

3.8 Avaliação da Associação de Fármacos

3.8.1 Isoblograma

Dois ou mais medicamentos podem ser administrados em associação visando principalmente aumentar a eficácia, reduzir as dosagens individuais e os possíveis efeitos colaterais de cada um. A interação entre os medicamentos podem resultar em efeitos aditivos, sinérgicos ou antagônicos. Sinergismo é um tipo de resposta farmacológica obtida a partir da associação de dois ou mais medicamentos, cuja resultante é maior do que a simples soma dos efeitos isolados de cada um deles. O sinergismo pode ocorrer com medicamentos que possuem os mesmos mecanismos de ação (aditivo); que agem por diferentes modos (somação) ou com aqueles que atuam em diferentes receptores farmacológicos (potencialização). No antagonismo a resposta farmacológica de um medicamento é suprimida ou reduzida na presença de outro, muitas vezes pela competição destes pelo mesmo sítio receptor (Nies & Spielberg 1996).

O isoblograma é bastante empregado no estudo de associações de herbicidas e inseticidas como também na comprovação de resistência de plantas a herbicidas e na influência de fatores ambientais no seu desempenho.

Essa curva consiste em descrever a resposta biológica de uma associação às doses crescentes de medicamentos ou agentes químicos administrados de forma isolada e combinados entre si, de forma a se obter doses equidistantes em escala logarítmica. Via de regra obtém-se uma curva simétrica em formato sigmoidal, que pode

ser ajustada pelo modelo logístico. Os dados são tratados por análise de regressão linear. Desse ajuste obtém-se a estimativa da dose que provoca 50% (ou outro percentual estipulado) do efeito total possível na variável resposta analisada (Chism *et al.*1992). A representação gráfica das doses isoladas e em associação que causam o mesmo percentual estipulado de efeito é denominada isobograma.

Em 1983, o isobograma foi usado por Shaw e Brammer para demonstrar ocorrência de sinergismo entre oxamniquina e praziquantel em associação.

Na construção do isobograma as doses que causam o percentual especificado de danos de cada um dos produtos isoladamente são lançadas nas coordenadas X e Y e unidas formam a curva de resposta ou isobole de aditividade. As demais doses obtidas da associação em diferentes proporções ou doses dos produtos podem então ser analisados em relação à sua posição diante da isobole de aditividade. Se os pontos se posicionarem em torno da isobole de aditividade, a ação é aditiva; se se colocarem abaixo, a ação é sinérgica e se estiverem acima da isobole de aditividade a ação é antagônica (Tammes 1964).

3.8.2 Índice de Combinação

Outra forma de analisar o efeito para produtos aplicados isoladamente ou em associação é a do cálculo do índice de combinação (I_{comb}). Este índice segue o princípio de aditividade de Loewe, relacionando as doses capazes de causar 50% de mortalidade quando os fármacos são administrados em associação com as doses capazes de causar 50% de mortalidade quando os fármacos são administrados em monoterapia. O índice equivalente à unidade indica aditividade, menor que a unidade indica sinergismo e maior, antagonismo.

O cálculo do I_{comb} é dado pela seguinte expressão:

$$I_{Comb} = I_{50ab1}/I_{50a} + I_{50ab2}/I_{50b}$$

Onde I_{50ab1} e I_{50ab2} são as doses capazes de causar 50% de dano quando os fármacos são administrados em associação e I_{50a} e I_{50b} as doses capazes de causar 50% de dano quando os fármacos são administrados em monoterapia (Ramakrishnan & Jusko 2001).

3.9 Fármacos Alternativos

A revisão da literatura aponta relatos de drogas que causam a interrupção da postura de ovos pela fêmea de *S. mansoni*: nicarbazin (Campbell & Cuckler 1967, Pellegrino & Katz 1969), mevinolina (Vandewaa *et al.* 1989, Chen *et al.* 1990), tiosinamina (Pellegrino *et al.* 1972), diaminofenilsulfona (DDS) (Pellegrino & Katz 1975) e lovastatina (Araújo *et al.* 2002).

De fato, Campbell e Cuckler (1967) mostraram que a adição de nicarbazin à dieta de camundongos, na concentração de 0,2%, não apresentou ação esquistossomicida, porém, interrompeu a ovoposição, já no 2º dia da dieta. Embora esse efeito fosse reversível (retirado o nicarbazin da dieta reiniciava-se a ovoposição) foi um fato digno de ser registrado e foram dados confirmados posteriormente, em camundongos e macacos *Cebus*, por Pellegrino e Katz (1969). A tiosinamina e a sulfona-mãe (diaminodifenilsulfona – DDS) mostraram o mesmo efeito apresentado pelo nicarbazin - interrupção reversível da postura (Pellegrino *et al.* 1972, Pellegrino & Katz 1975).

Agentes esterilizantes de roedores machos, bem como substâncias antifertilizantes, também apresentaram atividade supressora (Davies & Jackson 1970).

A mevinolina, agente inibidor da síntese de colesterol, quando administrada oralmente a camundongos ou incorporado na dieta dos animais bloqueou a produção de ovos de *S. mansoni*. Nesse mesmo trabalho os autores apresentaram resultados de experimentos realizados com mevinolato, farnesol, e mevinolina *in vivo* e *in vitro*, e sugeriram que a produção de ovos na esquistossomose está associada com a atividade da enzima 3-hidroxi 3- metilglutaril Coenzima A (HMG-CoA) redutase e que lípidos não esteróis, produzidos no metabolismo bioquímico, regulados por esta enzima estimulam a produção de ovos (Vandewaa *et al.* 1989).

Chen *et al.* (1990) trabalhando com camundongos infectados com *S. mansoni* e tratados com baixas doses de mevinolina, observaram a parada de postura pelo parasito e o bloqueio da patologia associada à infecção. A administração de 0,2% de mevinolina na dieta de camundongos infectados por 14 dias resultou em 96% de eliminação dos parasitos. A mesma dose administrada por dois dias antes e 15 dias após a infecção resultou em 93-95% de redução do número de parasitos adultos. A administração de mevinolina com 0,5% de mevalonato bloqueou a atividade anti-esquistossomicida da mevinolina, sugerindo que mevalonato e/ou metabolitos não

somente são de vital importância para a produção de ovos em *S. mansoni*, como também para a sobrevivência do parasito.

A lovastatina, uma lactona (a forma inativa do ácido hidroxílico aberto), é também um potente inibidor da síntese endógena do colesterol. Após a absorção gastrointestinal o fármaco é rapidamente hidrolisado para o hidroxiácido aberto, um inibidor competitivo da 3- hidroxil-3- metilglutaril Coenzima A (HMG-CoA) redutase, enzima que catalisa uma etapa precoce e limitante na biossíntese do colesterol. Em estudos clínicos a lovastatina reduziu as concentrações de colesterol plasmático total e lipoproteína de baixa densidade (LDL) e a lipoproteína de densidade muito baixa (VLDL) ligadas ao colesterol (Araújo *et al.* 2002).

A lovastatina, administrada, por via oral, a camundongos infectados pelo *S. mansoni*, 30 dias após infecção, mostrou alteração do oograma em 20 e 43% dos animais tratados e 15 e 22% de mortalidade dos vermes quando foram utilizadas, a dose única de 400mg/kg ou essa mesma dose administrada durante 5 dias consecutivos, respectivamente (Araújo *et al.* 2002). Em um experimento de observações seriadas, camundongos foram tratados, por via oral, com a dose de 400 mg/kg/dia durante 5 dias consecutivos 30 dias após a infecção, observou-se alteração do oograma e um percentual pequeno de vermes mortos no fígado no 15º dia do tratamento. O percentual de alteração do oograma e da mortalidade dos vermes foi maior quando se prolongou o tratamento para 30 e 60 dias. Dois meses após o tratamento, ainda foi observado alteração de postura, inclusive com baixa acentuada do número de ovos no fígado dos animais tratados. A análise morfológica mostrou alterações degenerativas nos vermes, sendo que as principais acometeram o aparelho reprodutor, com a redução e alteração dos folículos vitelínicos e do ovário das fêmeas e modificações nos testículos dos machos (Araújo *et al.* 2002).

“Essas drogas anti colesterolêmicas ainda não foram, mas deveriam ser, ensaiadas na clínica como agente antiesquistossomose” (Katz 2005).

O papel de uma dieta rica em colesterol na esquistossomose mansoni foi avaliado experimentalmente usando-se quatro grupos de animais: infectados com dieta rica em colesterol (29% de lípidos); infectados com dieta padrão (12% de lípidos); sem infecção com dieta rica em colesterol e sem infecção com dieta padrão, e observou-se que os camundongos infectados alimentados com dieta rica em colesterol apresentaram

maior número de ovos de *S. mansoni* viáveis e maior número de ovos nas fezes em comparação ao grupo de camundongos infectados alimentados com dieta normal. Observou-se também que os vermes adultos recuperados do grupo de camundongos infectados alimentados com dieta padrão apresentaram maior número de modificações morfológicas no aparelho reprodutor dos vermes machos, principalmente em relação ao lobo supranumerário, vesícula seminal e espermateca. Neste grupo, o ovário das fêmeas apresentava maior número de oócitos sendo eliminados do que dos espécimes do grupo com 29% de lípidos na dieta. O autor sugere que um ambiente rico em colesterol é benéfico para a reprodução e excreção dos ovos do *S. mansoni* (Neves 2006).

Em estudo realizado por Okomura-Noji et al (2001) a taxa de maturação de ovos de *S. japonicum in vitro* foi reduzida quando vermes adultos foram cultivados na presença de soro de paciente com deficiência na enzima CETP (*Cholesterol Ester Transfer Protein*). A deficiência nesta enzima acarreta um acúmulo de ésteres de colesterol na molécula de HDL, utilizada pelos vermes adultos como fonte de nutrição, alterando sua estrutura e aumentando o tamanho da molécula de HDL. Assim, os vermes adultos passam a não utilizar o HDL em sua nutrição, acarretando uma redução na taxa de ovos maduros.

O clonazepam (fármaco de uma classe química conhecida como benzodiazepinas) tem como propriedade principal a inibição de funções do sistema nervoso central possuindo ação anticonvulsivante, sedativa, relaxante muscular e efeito tranquilizante e foi citado pela primeira vez como esquistossomicida por Stohler (1978). O autor mostrou que Ro 11-3128 (meticlazepam) foi altamente eficaz contra a infecção por *S. mansoni* tal qual niridazol, hycanthone e oxamniquina. *In vitro*, quando foi adicionado 6,25µg/ml do fármaco ao meio contendo vermes machos de *S. mansoni* os mesmos se contraíram em segundos (Stohler 1978). Pax et al (1978) estudaram a ação da benzodiazepina Ro 11-3128 e do praziquantel na musculatura dos vermes de *S. mansoni* e *S. japonicum in vitro* e mostraram que em baixas concentrações elas produzem tensão, paralisia e imobilidade dos vermes machos. Estudos *in vitro* feitos por Bennett em 1980, usando 20 vermes machos de *S. mansoni* e 20 de *S. japonicum* incubados a 37°C por 10 minutos em 2,0 ml de solução de Earle e variando a concentração da benzodiazepina Ro 11-3128 observou que o fármaco possui um sítio

específico de ligação com o verme macho apresentando o tegumento intacto. Estes sítios de ligação foram visivelmente alterados em presença de agentes que, sabidamente, destroem a integridade da membrana.

Leite *et al.* (2007) estudaram a participação dos sítios de ligação na ação contraturante do clonazepam e 3 metilclonazepam sobre vermes de *S. mansoni*. Vermes adultos, machos, foram colocados em placas de vidro contendo solução salina e o efeito de contração muscular das benzodiazepinas foi avaliado através da redução da área corpórea, medida por análise das imagens captadas através de câmeras. Encontraram que os benzodiazepínicos utilizados na concentração de 10 μ M levaram à contração dos vermes de forma tempo-dependente semelhante ao praziquantel quando usado na concentração de 1 μ M. Diante dos resultados concluíram que o efeito de contração causado pelas duas benzodiazepinas não se deve a um efeito direto no músculo do verme, nem como resultado da ligação a um dos dois receptores benzodiazepínicos presentes no *S. mansoni*. Noel *et al.* (2007) pesquisaram a presença de receptores do ácido gama-aminobutírico (GABA) em vermes adultos de *S. mansoni*, usando [3H] – flunitrazepam para marcar os sítios de ligação alósterico dos agentes benzodiazepínicos e detectaram em grande parte da população de vermes alta afinidade de sítios de ligação para a droga estudada. Os autores descreveram as propriedades farmacológicas de alguns receptores diazepínicos como uma contribuição para o desenvolvimento de novas drogas esquistossomicidas. Descreveram também, pela primeira vez, a presença de receptores benzodiazepínicos periféricos no parasita. Pica-Mattocia *et al.* (2008) estudaram o mecanismo de ação de Ro 11-3128 (metilclonazepam) e do praziquantel, *in vitro* e *in vivo*, sobre os vermes do *Schistosoma*. As duas drogas causam paralisia, influxo dos canais de cálcio e danos no tegumento dos parasitas. Sabendo que o Ro-11-3128 é ativo contra vermes imaturos do *S. mansoni* e o praziquantel é ineficaz nesta fase e o praziquantel é ativo contra o *S. japonicum*, enquanto o Ro 11-3128 é inativo, foi estudado o excesso de uma droga sobre a outra e verificou-se que um excesso do praziquantel não inibe a atividade do Ro 11-3128 sobre os vermes imaturos de *S. mansoni* e um excesso de Ro 11-3128 não inibe a eficácia do praziquantel sobre o *S. japonicum*, sugerindo que o sítio de ligação do verme das duas drogas é diferente. Por outro lado, quando foi usado cytochalasin D – um agente que bloqueia o canal de cálcio – houve inibição da atividade dos dois agentes. A associação

desses resultados sugere que as duas drogas, embora se liguem a diferentes sítios receptores no parasita, apresentam o mesmo mecanismo esquistossomicida.

Cabe ressaltar que na grande maioria dos trabalhos sobre benzodiazepinas citados a ação do clonazepam e Ro 11-3128 foi observada em vermes machos de *S. mansoni* provenientes de infecções unissexuadas (Stohler 1978, Pax 1978, Leite 2007).

Fazendo a ligação entre clonazepam e praziquantel, é curioso notar que no princípio da década de 70, pesquisadores do laboratório E. Merck, na busca por medicamentos tranqüilizantes que fossem mais ativos e causassem menos efeitos colaterais, incluíram as substâncias pirazinoisoquinolinas (entre as quais, o praziquantel) como promissoras para tal propósito. Mas para que o praziquantel apresentasse efeito comparável aos tranqüilizantes deveria ser usado em doses relativamente altas. Sendo assim, não houve interesse do Laboratório Merck em continuar os estudos e um acordo foi firmado entre esse laboratório e o Laboratório Bayer no sentido de desenvolver um fármaco para uso veterinário. Dos estudos entre esses dois laboratórios surgiu o praziquantel com atividade esquistossomicida. (WHO 1998).

Artemisinina (qinghaosu), uma lactona sesquiterpena com um grupo endoperóxido, é o princípio ativo extraído das folhas da *Artemisia annua*, uma planta originária da Ásia, amplamente disseminada na China, encontrada também na Europa Central, Estados Unidos e Argentina e atualmente produzida em muitos países, aonde são desenvolvidos projetos de adaptação da planta, visando aumentar a produção da artemisinina. A artemisinina e seus derivados semi-sintéticos (arteméter, artesunato e arteéter) são considerados atualmente de importância fundamental para o tratamento e controle da malária, incluindo malária cloroquina-resistente em áreas endêmicas (Klayman 1985)

O descobrimento da ação esquistossomicida da artemisinina data de 1980. O efeito esquistossomicida do arteméter e artesunato foi descrito pela primeira vez na China, para *S. japonicum*, no princípio da década de 80. (Chen *et al.* 1980, Le *et al.* 1982, 1983). Le *et al.* (1982) foram os primeiros a confirmar a atividade esquistossomicida do arteméter em camundongos e cães infectados com *S. japonicum*. Usando diferentes doses e vias de administração os autores mostraram redução significativa na carga de vermes dos animais tratados. As fases larvárias

(esquistossômulos) de *S. japonicum* também foram suscetíveis ao arteméter. Sobre os ovos não foi observado efeito significativo (Yue *et al.* 1984). Outros estudos confirmaram a atividade esquistossomicida para derivados da artemisinina, como artesunato, (Le *et al.* 1983, Araújo *et al.* 1999) e dihidroartemisinina (Abdel-Azia & El-Badawy 2000). Atualmente sabe-se que o arteméter e seus derivados possuem atividade também sobre o *S. mansoni* e o *S. haematobium* (Araújo *et al.* 1991, Xiao *et al.* 2002, Utzinger *et al.* 2003). No Brasil, experimentos utilizando-se o arthemeter e o artesunato foram realizados em camundongos e hamsters experimentalmente infectados pela cepa LE do *S. mansoni* e tratados 45 dias após a infecção (Araujo *et al.* 1991,1999). O arthemeter usado na dose única de 100mg/kg, via intramuscular apresentou 100% de alteração do oograma e 61,5% de vermes mortos. A mesma dose administrada por cinco dias consecutivos elevou para 96,3% a mortalidade dos vermes. Com a dose única oral de 100mg/kg não foi observado alteração do oograma e somente 22,6% dos vermes encontravam-se mortos. A administração da dose única de 200mg/kg, via intramuscular, a camundongos infectados e examinados 45 dias após o tratamento mostrou que os vermes sobreviventes se recuperaram e reiniciaram a oviposição (Araujo *et al.* 1991). Camundongos infectados experimentalmente com *S. mansoni* foram tratados, em dose oral única, com artesunato 300 ou 500mg/kg ou com as mesmas doses durante 5 dias consecutivos. Os animais foram sacrificados 7, 30, 60 ou 90 dias após o tratamento. Diferenças estatisticamente significativas foram encontradas na distribuição e mortalidade dos vermes e na alteração do oograma nos grupos tratados em relação ao grupo controle quando os animais foram sacrificados 30 dias após o tratamento. A análise morfológica dos vermes mostrou alterações no aparelho reprodutor feminino com diminuição do volume do ovário e rarefação dos folículos vitelínicos, entretanto, quando os animais foram sacrificados 60 ou 90 dias após o tratamento, as diferenças e alterações foram menores, mostrando que os vermes sobreviventes, recuperados, reiniciaram a postura (Araujo *et al.* 1999).

Importante frisar que a atividade do arthemeter é maior nas formas jovens do que nos vermes adultos (Xiao *et al.* 2002), daí ser considerada por alguns autores como profilática. Recomendação especial para o potencial perigo do uso continuado e prolongado da artemisinina e seus derivados em área endêmica para malária com vistas a prevenir o aparecimento de resistência a essas drogas é feita por Katz (2005).

O autor adverte que “essas drogas são muito importantes para o tratamento dos indivíduos infectados pelo *Plasmodium falciparum*, especialmente devido ao efeito rápido e eficaz nos casos de envolvimento cerebral causado por esse parasito. Por outro lado, as formulações atuais da artesiminina e seus derivados não parecem ter indicação do ponto de vista prático, seja pela necessidade do tratamento repetido e constante nessas áreas, seja pela possibilidade do aparecimento de formas resistentes a essas drogas na malária. Todavia, é possível indicá-las para o tratamento de curto prazo de pessoas que obrigatoriamente têm que entrar em contato com águas contaminadas em zonas endêmicas, como o pessoal das forças armadas ou limpadores de canais de sistema de irrigação” (Katz 2005).

3.10 Experimentos *in vitro* e *in vivo*

Os métodos de pesquisa *in vitro* e *in vivo* são importantes para o desenvolvimento de diversas pesquisas.

Atualmente há um amplo debate sobre a necessidade de se usar animais em pesquisa científica. Grupos de defesa aos animais aparecem a todo o momento, na mídia, trazendo questões éticas sobre o assunto e as alternativas aos experimentos utilizando-se de animais vivos. Com isso surgiram diversos comitês de ética no uso animal, regulamentações, cobrança da sociedade, pressionando para minimizar o uso de animais de experimentação na classe científica. Uma das alternativas já usada há bastante tempo, mas que vem ganhando corpo no meio científico é a prática de experimentos *in vitro*. Porém, não se pode perder de vista que estes experimentos podem ser usados para fazer triagens, para apontar caminhos para estudo de mecanismos de ação de fármacos, mas nunca para substituir aqueles realizados *in vivo*. A avaliação de atividade de um fármaco, por exemplo, pode sofrer alterações específicas dependendo dos processos biológicos do organismo.

Sendo assim, importante ter sempre em mente que os estudos *in vitro* são muito importantes para gerar conhecimentos, mas eles são uma simulação da realidade e precisam estar sempre atrelados aos estudos *in vivo*, para dar suporte à pesquisas (Andersen, 2004).

3.11 Sonda Hoechst 33258

Com o avanço da tecnologia, atualmente já é possível determinar através de fluorimetria amostras que contêm DNA, utilizando uma substância denominada bisbenzimidida, também conhecida por Corante de Hoechst 33258 ou Sonda Hoechst 33258 (bisbenzamida) (2,4 hidroxifenil 5, 4 metil, 1 piperazina 2,5 bi H-benzimidazol). Esta sonda apresenta alteração de fluorescência na presença de DNA, porém, por ser hidrofílica só se difunde para o interior das células em presença de lesões.

O espectro de excitação da Sonda Hoechst 33258 é a 356nm e o de emissão a 492nm. Quando este se liga ao DNA absorve a 365nm e emite a 458nm, ou seja, a exposição de uma amostra de DNA, com a solução de Hoechst 33258, a um comprimento de onda de 365nm, através da utilização de uma lâmpada de mercúrio, causa uma excitação da mesma e posterior emissão de luz a 458nm (Rebello 2003).

A utilização de técnicas de marcações específicas empregando corantes fluorescentes (sondas fluorescentes ou fluorocromos) permitam a realização de uma análise segura da integridade estrutural e viabilidade celular de microrganismos. Alguns corantes específicos para DNA são impermeáveis às membranas intactas, corando somente aquelas que se encontram lesadas.

Ovos de *S. mansoni* imaturos considerados morfologicamente viáveis apresentaram fluorescência quando marcados com a sonda Hoechst 33258, devido à presença de lesões morfologicamente imperceptíveis à microscopia óptica. Os ovos morfologicamente classificados como maduros vivos não apresentaram fluorescência, ao contrário dos maduros mortos. Essas observações foram realizadas em microscópio de fluorescência, uma vez que o microscópio óptico convencional não permite classificar os ovos imaturos como vivos ou mortos. Considerando os resultados pode-se inferir que a sonda Hoechst 33258 pode ser considerada como um bom marcador de integridade da membrana (Sarvel *et al.* 2006).

Araujo *et al.* 2009 apresentaram um estudo comparativo da viabilidade dos ovos de *S. mansoni* usando a técnica de observação dos mesmos ao microscópio óptico e de marcação através de fluorescência e mostraram que houve uma diferença significativa no número de ovos viáveis quando foi usada a prova de fluorescência. De fato, a média de ovos morfologicamente viáveis marcados pela sonda Hoechst 33258 foi de aproximadamente 70% nos grupos expostos a duas concentrações de

lovastatina. No grupo controle, foi observado que somente 16% dos ovos morfológicamente viáveis foram corados pela sonda. Como somente ovos mortos são corados pela sonda Hoechst 33258, torna-se evidente a diferença na classificação dos ovos quando se usa a sonda fluorescente para marcação ou quando a morfologia dos ovos é observada através do microscópio óptico. Quando usada em experimentos na ausência de fármacos a metodologia proposta por Sarvel et al (2006), com o objetivo de confirmar a técnica de classificação morfológica tradicional (usando o microscópio óptico) observa-se 83% de confirmação entre as duas técnicas. No entanto, em experimentos nos quais se pretende avaliar a atividade de fármacos a sensibilidade da técnica tradicional é 30% menor do que aquela onde se usa a marcação de fluorescência através da sonda Hoechst 33258, isto é, somente 10 dos 35 ovos morfológicamente viáveis em presença de lovastatina não apresentaram fluorescência quando expostos à sonda. Dessa maneira, o uso da sonda Hoechst 33258 aumenta a sensibilidade dos experimentos que objetivam avaliar a ação de fármacos na viabilidade de ovos de *S. mansoni*.

METODOLOGIA

4 Metodologia

4.1 Animais e parasitas

Camundongos *Mus musculus*, fêmeas, com mais ou menos dois meses de idade, pesando de 18 a 22 gramas, nascidos e criados no Biotério do Centro de Pesquisas René Rachou (CPqRR) foram utilizados nos experimentos para avaliação da atividade dos fármacos.

Os animais foram infectados, por via subcutânea, no dorso, utilizando-se 100 ± 10 cercárias da cepa LE de *S. mansoni*. Esta cepa é mantida rotineiramente no Moluscário do CPqRR por mais de 30 anos usando o modelo *B. glabrata* – camundongo – *B. glabrata* (Pelegriño & Katz 1968).

As Normas Regimentais da FIOCRUZ para o uso de animais em experimentos foram seguidas e os procedimentos realizados foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Fundação Oswaldo Cruz (Licença nº L 0118/09).

4.2 Tratamento dos animais

O tratamento dos animais foi realizado após 45 dias da infecção na maioria dos experimentos. Em apenas um experimento os animais foram tratados semanalmente a partir do primeiro dia da infecção. Os fármacos foram administradas por via oral, utilizando-se agulha própria para gavagem, e em dose única, excetuando-se um experimento no qual os animais foram tratados durante cinco dias consecutivos.

4.3 Fármacos e Doses Utilizadas

Lovastatina – medicamento genérico Lei nº 9.787, de 1999 – Sandoz - na dose de 400mg/kg/dia durante cinco dias consecutivos.

Clonazepam – medicamento genérico Lei nº 9.787, de 1999 – Medley - nas doses de 1,0, 2,5, 5,0, 10,0 ou 25,0 mg/kg.

Oxamniquina – Mansil® (Pfizer) nas doses de 25, 50, 75 ou 100mg/kg.

Praziquantel (Farmanguinhos – FIOCRUZ) nas doses de 100, 200 ou 300mg/kg.

4.4 Avaliação da Atividade Terapêutica

Com vistas à avaliação da atividade terapêutica os camundongos foram submetidos à eutanásia por fratura cervical e abertos para exposição da cavidade

peritoneal. Mesentério e fígado foram separados através da ligadura da veia renal. Para permitir a recuperação dos vermes, a veia porta foi seccionada. Com o auxílio de uma agulha acoplada a um pipetador automático, foi injetada solução salina 0,85%, heparinizada, na aorta descendente, para perfusão das veias mesentéricas e coleta dos vermes. A perfusão do fígado foi feita através de injeção de solução salina, 0,85%, heparinizada, na veia cava inferior. Os vermes recuperados através de perfusão foram contados, considerando-se separadamente machos, fêmeas e acasalados, com o auxílio de microscópio estereoscópico. Durante o processo de contagem dos vermes observou-se também, o tamanho dos mesmos, pigmentação e presença de ovos no útero das fêmeas (Pellegrino & Siqueira 1956).

Os fígados dos animais foram esmagados entre duas placas de vidro e observados em microscópio estereoscópico para contagem dos vermes mortos, imobilizados por tecido inflamatório (Pellegrino & Katz 1968).

A alteração do oograma foi observada em fragmentos de ± 1 cm retirados da parte distal do intestino delgado, esmagados entre lâmina e lamínula de plástico e observados ao microscópio óptico. Foram considerados alterados oogramas que apresentassem ausência de ovos nos estágios iniciais de desenvolvimento (Pellegrino & Faria 1965).

Para avaliação da atividade estes parâmetros foram comparados com os resultados obtidos de um grupo de camundongos controle, infectados e não tratados.

4.5 Interpretação e análise dos resultados

Foi considerado para avaliação de atividade dos fármacos o número médio de vermes obtidos, a percentagem de distribuição dos vermes no mesentério e fígado, o percentual de vermes mortos e de alteração do oograma sempre comparando grupos tratados com seus respectivos controles (animais infectados e não tratados).

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado com amostragem aleatória simples, usando variáveis quantitativas e testes de comparação de médias. Os resultados foram comparados através de análise de variância (teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade) num dispositivo fatorial de 3 fatores de bloco, cada fármaco constituindo um bloco e regressão linear. A comparação das médias foi

feita pelo teste t de Student ou Qui quadrado de Pearson e teste para comparação de proporções aplicando-se a correção de Bonferroni.

O tamanho da amostra calculado para um desvio padrão de 4,0, nível de significância de 5% e poder de teste de 95% foi de 14 animais por grupo experimental (Snedecor & Cochran 1977).

Como auxiliar nos cálculos estatísticos foi usado o software GraphPad Prism v. 4 (GraphPad, Califórnia).

4.6 Ensaios *in vitro*

Camundongos infectados com cercárias da cepa LE de *S. mansoni* foram sacrificados após 6 a 7 semanas da infecção por *overdose* de pentobarbital sódico a 3% (Hypnol - Fontoveter) administrado por via intraperitoneal ($\pm 0,2$ ml) e perfundidos através da perfusão retrógrada do fígado, segundo técnica de Smithers e Terry (1965) que consiste na exposição das vísceras abdominais e do coração, secção da veia porta na altura dos rins, com o auxílio de uma agulha. Em seguida, injeta-se meio de cultura RPMI – 1640, pH 7,4 na parte inferior dos ventrículos do coração.

Os vermes coletados foram lavados com meio de cultura RPMI – 1640, contendo 0,3% de soro albumina bovina e distribuídos em placa de 6 poços (4 pares de vermes por poço) e mantidos em meio de cultura RPMI-1640 suplementado com 5% de soro bovino fetal, 100 μ g/ml de penicilina e 100 μ g/ml de estreptomicina. Os vermes foram expostos ao fármaco diluído em meio de cultura RPMI-1640, nas concentrações de 0,5, 1, 2 e 4 μ g/ml de lovastatina ou na dose de 0,6mg/ml de clonazepam (1ml de clonazepam pediátrico 2,5mg/ml em 3ml de meio de cultura) por 24 horas e mantidos em estufa a 37°C e 5% de CO₂. Paralelamente foi feito um grupo controle com vermes que foram mantidos nas mesmas condições excetuando-se a presença dos medicamentos. Após este período, os vermes foram lavados com meio de cultura e mantidos sob as mesmas condições anteriores, porém, sem adição do fármaco durante o restante do ensaio. Foram realizadas observações, em intervalos regulares de tempo, em microscópio invertido e fotografias diárias no período de uma hora até oito dias do início do experimento. O meio de cultura foi trocado em dias alternados.

4.7 Análise de viabilidade dos ovos

Os ovos obtidos do cultivo *in vitro*, foram corados com sonda Hoechst 33258 na concentração de 1 mg/ml. Foram adicionados 10 µl da sonda para cada ml de meio contendo os ovos e, preparadas lâminas que foram observadas ao microscópio de fluorescência (K-ZEISS) usando os aumentos de 10 e 40 vezes, durante os oito dias de cultura (Sarvel *et al.* 2006).

A Hoechst 33258 foi obtida do Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, USA, sob a forma de pó e diluída em água destilada obtendo-se uma solução estoque com concentração de 10 mg/ml.

4.8 Índice de Combinação

O Índice de Combinação dos fármacos foi calculado pela expressão:

$$I_{com} = I_{50ab1}/I_{50a} + I_{50ab2}/I_{50b}$$

Onde I_{50ab1} e I_{50ab2} são as doses I_{50} (50% de atividade) dos fármacos em associação e I_{50a} e I_{50b} as doses I_{50} (50% de atividade) dos fármacos administrados em monoterapia. Resultados iguais à unidade significam efeito aditivo, menor ou maior do que a unidade efeito sinérgico ou antagônico, respectivamente (Ramakrisnan e Jusko, 2001).

4.9 Construção de Curva de Resposta e Isoblograma

Para a representação gráfica da curva de resposta e do isoblograma foram determinadas as percentagens de vermes mortos no fígado em cada dosagem de cada um dos fármacos e a DL_{50} para os dois fármacos foi calculada através da análise de regressão dos dados. As DL_{50} de cada fármaco aplicadas isoladamente em um gráfico de dispersão em escala logarítmica formaram dois pontos que, unidos deram origem à curva de aditividade. As doses da associação necessárias para matar 50% dos vermes foram determinadas através do gráfico em escala logarítmica, transformadas em mg/kg e lançadas no gráfico. Se os pontos representativos da associação se posicionarem em torno da curva de aditividade significa que o efeito da associação foi aditivo; se estiverem abaixo significa efeito sinérgico e acima da curva, efeito antagônico (Tammes 1964).

RESULTADOS

5 RESULTADOS

5.1 Artigo 1

Oxamniquine, praziquantel and lovastatin association in the experimental *Schistosomiasis mansoni*

Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 2008;103(5):450-454

Estado do Conhecimento

A produção de ovos na esquistossomose está associada com a atividade da enzima HMG-CoA (3-hidroxi 3-metilglutaril Coenzima A) redutase e lípidos não esteróis, produzidos no metabolismo bioquímico, regulados por esta enzima estimulam a produção de ovos (Vandewaa *et al* 1989, Chen *et al* 1990).

As estatinas são substâncias com a propriedade de inibir a síntese de colesterol endocelular, por competição com a enzima HMG-CoA redutase, impedindo a transformação desta enzima em ácido mevalônico. Com a redução intracelular de colesterol, há estímulo à formação de receptores de LDL na membrana da célula. A presença de maior número de receptores de LDL determina maior adaptação das LDL em circulação, diminuindo do seu nível plasmático. Há também elementos que demonstram que a diminuição da síntese de colesterol leva à menor produção hepática das lipoproteínas de pequeno peso molecular VLDL, portanto as estatinas têm efeito hipolipemiante semelhante, em função do maior catabolismo das LDL e da menor síntese endógena das VLDL. (Mano 2006). A lovastatina, medicamento utilizado na clínica com o objetivo de induzir a diminuição dos níveis séricos de colesterol no organismo, reduz a ovoposição pelas fêmeas do *S. mansoni*, ocasionando a morte de um pequeno percentual de vermes (Araújo *et al.* 2002).

Questões

- A lovastatina apresenta ação sinérgica em associação com oxamniquina ou praziquantel?
- A lovastatina possui ação sobre os vermes de *S. mansoni in vitro*?
- A metodologia proposta por Sarvel *et al* (2006) utilizando a sonda Hoechst 33258 aumenta a sensibilidade dos ensaios nos quais se pretende avaliar ação de fármacos?

Resultados principais

A ação da lovastatina sobre a postura do *S. mansoni*, tanto nos experimentos *in vivo*, como naqueles *in vitro* foi confirmada. No entanto, a ação sinérgica entre este fármaco associado aos esquistossomicidas não foi observada no protocolo experimental utilizado. Foi possível inferir que a utilização da metodologia de Sarvel *et al* (2006) aumenta a sensibilidade dos ensaios nos quais se pretende avaliar ação de fármacos.

Oxamniquine, praziquantel and lovastatin association in the experimental *Schistosomiasis mansoni*

Neusa Araújo^{1*}, Ana Carolina Alves de Mattos, Ana Karine Sarvel¹, Paulo Marcos Zech Coelho¹, Naftale Katz²

¹Laboratório de Esquistossomose, Instituto René R. Lou-Filho, Av. Augusto de Lima 1715, 30190-002 Belo Horizonte, MG, Brasil
²Santa Casa de Belo Horizonte, Belo Horizonte, Brasil

The activity of lovastatin associated with oxamniquine or praziquantel against schistosomiasis mansoni was evaluated in mice infected with Schistosoma mansoni. Forty days after infection, mice were treated with lovastatin, 400 mg/kg for five consecutive days by oral route, and on the last day of this sequence with 50 mg/kg oxamniquine or with 200 mg/kg praziquantel, both by oral route, single dose. Fifteen days later, the animals were perfused in parallel with an untreated control group. Studies were carried out in vitro, using lovastatin in culture medium containing S. mansoni worms proceeding from experimentally infected mice. In the in vivo trials, the association of lovastatin with oxamniquine or praziquantel did not show any additive action, but there were oogram changes when lovastatin was associated with oxamniquine. In vitro lovastatin was able to interrupt the maturation of S. mansoni eggs, which remained at the 1st or 2nd stages, depending on the dose used. The total number of morphologically dead eggs found in culture of worms exposed to 2 µg/ml or 4 µg/ml concentrations of lovastatin was significantly higher than the number of viable eggs. Using the probe Hoescht 33258 it was observed that 70% of the eggs considered morphologically viable in the treated groups (against 16% in the control group) were labeled, indicating that the majority of the viable eggs had membrane permeability increased due to lovastatin action.

Key words: *Schistosoma mansoni* - lovastatin - drug association

In practice, chemotherapy is the main measure utilized for the control of schistosomiasis in endemic countries. The schistosomicidal drugs used, oxamniquine and praziquantel, present few side effects and a high schistosomicidal activity, thus contributing for the treatment of infection, as well as for the control of morbidity and transmission of the disease. In the 1970s, oxamniquine was very used for individual and mass treatment of schistosomiasis, presenting satisfactory results regarding efficacy and tolerance (Katz 1980). At the end of that decade, praziquantel became available for the treatment of schistosomiasis, showing good therapeutic activity and also few side effects as well. Praziquantel is now the drug of choice for the treatment of the disease caused by the three main species of the parasite that infect humans (Doenhoff et al. 2002). Taking into account the possible rise of resistance to treatment, the tolerance level of the worm to the drug, and the therapeutic failures, it is very important to search for new therapeutic alternatives for schistosomiasis. This search is now imperative, especially considering the possible interruption of oxamniquine production as a result of its higher cost, when compared to praziquantel.

The association of different drugs for use in the therapeutics of various infectious diseases can serve as a mechanism to avoid, or to delay, the rise of drug resistance.

In the present study, in vivo and in vitro trials were carried out on the efficacy of the treatment with lovastatin against the *Schistosoma mansoni* adult worms, when administered in association with oxamniquine or praziquantel in the mouse model.

MATERIALS AND METHODS

Experimental chemotherapy - Swiss mice (weighting 20 g on average), infected with 100 ± 10 *S. mansoni* cercariae (LE strain), by subcutaneous route, were used. The guidelines of the Ethical Committee for the use of experimental animals of the Fiocruz were followed. Forty days post infection (pi), groups of animals were treated with 400 mg/kg/day, oral route lovastatin (Mevacor®, Merck Sharp & Dohme), for five consecutive days, and on the last day with a single oral dose of 50 mg/kg oxamniquine or a single oral dose of 200 mg/kg praziquantel. The animals were sacrificed by cervical fracture, and perfused 15 days after the end of treatment. The same procedures were used for the control group, which was comprised of infected and untreated mice (Pellegrino & Siqueira 1956). The female worms were observed with an optical microscope to observe the presence of eggs. The eggs in various stages of maturity were studied using the oogram pattern (Pellegrino et al. 1962).

In vitro trials - Mice infected with *S. mansoni* cercariae were sacrificed using sodium pentobarbital 3% (300 µl/mice), and perfused according to the technique by Smithers and Terry (1965). The worms obtained were distributed into a 6-well-plaque (4 worms pairs/well), and maintained in culture medium RPMI-1640 supplemented with 5% fetal bovine serum, 100 µg/ml penicillin and

Financial support: FIOCRUZ and FAPMIG
*Corresponding author: anaaraujo@cepim.fiocruz.br
Received 27 January 2008
Accepted 4 July 2008

100 µg/ml streptomycin. The worms were exposed to lovastatin, diluted in culture medium RPMI-1640, at the concentrations of 0.5 µg/ml, 1.2 µg/ml and 4µg/ml for 24h, and kept in an incubator at 37°C and 5% CO₂. Afterwards, the worms were washed with culture medium, and maintained under the same conditions, without addition of the drug. Simultaneously, a control group was organized with worms that had been maintained under the same conditions, except for the presence of drug. Using an inverted microscope, observations were performed, and daily photos were taken from 24h up to seven days after the beginning of culture. The culture medium was changed on alternate days.

Analysis of egg viability - The eggs obtained in culture were stained with the probe Hoescht 33258, at the concentration of 1 mg/ml. For each milliliter of culture medium with eggs, 10 µl of the probe was added. Slides were then prepared and observed under fluorescent microscope (K-Zeiss), using magnification of 10 and 40 times, for an 8-day-culture period (Sarvel et al. 2006).

In vitro/in vivo trials - The worms obtained from mice treated with lovastatin (400 mg/kg/day for 5 days) and sacrificed three days after the end of treatment were cultured in vitro (in vivo/in vitro trials) in parallel with a group of worms exposed to 4 µg/ml lovastatin in vitro, as well as with a control group (worms not exposed to drug).

Analysis of data - The Student's *t* test, the chi-square test or the analysis of variance, with the significance level of $p \geq 0.05$ were applied.

RESULTS

The results obtained in *S. mansoni*-infected mice treated with 400 mg/kg lovastatin, for five consecutive days, starting on the 40th day pi, associated with 50 mg/kg oxamniquine or 200 mg/kg praziquantel, single oral dose administered on the last day of treatment can be seen in Table. The percentage of worms in the group of animals treated with lovastatin was distributed as follows: 86.4% in the mesentery, and 13.6% in the liver. In the group treated with oxamniquine, these values, were 49.1% in the mesentery and 50.9% in the liver. In the group treated with lovastatin and oxamniquine in association, 30.6% and 69.4% of the worms were recovered from the mesentery and liver, respectively. When the animals were treated with oxamniquine or with oxamniquine/lovastatin in association, the mortality rates of the worms were 43.6% and 60.3%, respectively. No significant difference has been observed in these results. As far as the oogram change is concerned, the value increased from 75.0% (oxamniquine administered alone) to 92.3% (when oxamniquine and lovastatin were administered in association) ($p > 0.05$). When praziquantel was administered, the mortality of parasites was 45.1% with oogram changes giving a value of 54.5% in comparison when it was administered associated with lovastatin (36.7% worm mortality; 57.1% oogram changes). The percentage of worms in the group of animals treated with praziquantel was distributed as follows: 49.5% from the mesentery, and 50.5% from the liver. When

TABLE

Results obtained in experimentally infected mice with 100 ± 10 *S. mansoni* cercariae (LE strain), treated with 400 mg/kg/day for five days lovastatin (LOV) orally, 40 days after infection, and with 200 mg/kg/day praziquantel (PZQ), single dose, or 50 mg/kg oxamniquine (OXA). PZQ and OXA were administered alone or with LOV on the last day (5th) of treatment with LOV. Mice were sacrificed 15 days after the end of treatment

Drug	Treatment mg/kg x days	Number of animals		Mean of worms	Distribution of worms (%)		Dead worms in the liver (%)	Oogram changes (%)	Worms with intra-uterine egg n (%)		Worms without intra-uterine egg n (%)	
		Treated	Examined		Mesenterium	Liver			intra-uterine egg n (%)	intra-uterine egg n (%)		
PZQ	200 x 1	14	11	8.3	49.5	50.5	45.1	54.5	12 (63.2)	7 (36.8)	16 (88.9) ^a	55 (91.7) ^a
OXA	50 x 1	14	8	6.9	49.1	50.9	43.6	75.0	2 (11.1)	2 (11.1)	5 (8.3)	13 (50.0)
LOV	400 x 5	14	9	13.1	86.4	13.6	0.0	44.4	15 (50.0)	1 (3.7)	1 (3.7)	26 (96.3) ^a
LOV + PZQ	400 x 5 + 200 x 1	14	7	11.3	54.4	45.6	36.7	57.1	1 (3.7)	1 (3.7)	1 (3.7)	24 (30.8)
LOV + OXA	400 x 5 + 50 x 1	14	13	8.5	30.6	69.4	60.3	92.3 ^b	0.0	5.4 (69.2)	0.0	0.0
Control	-	-	14	11.9	91.0	9.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0

a: $p < 0.05$ when compared to the group treated with oxamniquine alone; b: $p < 0.05$ in relation to the control group.

the animals were treated with the association of praziquantel and lovastatin the percentages were 54.4% dead worms in the mesentery, and 45.6% in the liver. The differences were not statistically significant. The group of animals treated with lovastatin alone presented 44.4% of organ changes (a statistically significant result, when compared with the control group), with dead worms in the liver, and with a worm distribution in the mesentery and liver similar to that of the control group.

The number and respective percentage of female worms presenting intra-uterine egg in the different groups are in Table. When the three drugs were administered alone, lovastatin and oxamniquine presented a great activity regarding the cessation of oviposition (absence of intra-uterine egg). In fact, 91.7% and 88.9% of *S. mansoni* females treated with lovastatin or oxamniquine did not show any intra-uterine eggs, a significant result when compared to 30.8% of the control group ($p < 0.05$). As regard praziquantel, no difference could be detected when compared to the control group. When lovastatin was used in association with oxamniquine or praziquantel, it was observed that the number of females without intra-uterine eggs varied from 36.8% to 50% (praziquantel association), and from 88.7% to 96.3% (oxamniquine association), but the differences were not significant, i.e., there was no additive or synergistic action as a result of the association of these drugs.

In vitro trials - The worms exposed to lovastatin, at any drug concentration, did not show any morphological change under observation using an inverted microscope, using 100X magnification. The regement was found to be apparently complete, and the worm motion similar to that of the control group. Eggs could be seen in all the groups. However, the eggs laid by worms exposed to lovastatin did not develop throughout the experiment,

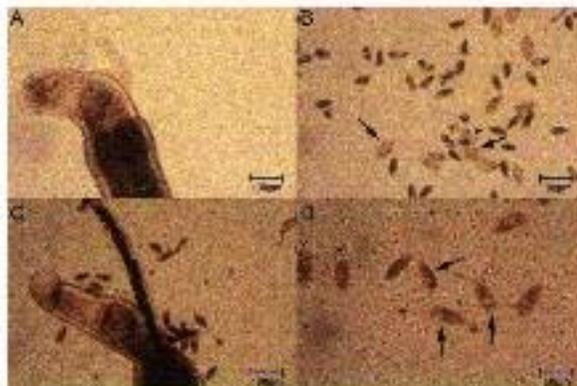


Fig. 1: evaluation of the *in vitro* activity of lovastatin on *Schistosoma mansoni* worms after a 3-day-culture period. A, B: control. A: adult paired worms without apparent morphological change; B: eggs at all stages; mature eggs (arrow), 3rd stage (head of the arrow), 4th stage (*), C: paired worms exposed to 2 µg/ml lovastatin and without apparent morphological change, and eggs at the 1st and 2nd stages; D: eggs laid by worms exposed to 4 µg/ml lovastatin; eggs at the 1st stage (arrow) and dead (head of the arrow).

i.e., eggs at the 1st and 2nd stages, or rarely at the 3rd stage, were found dead at the end of the experiment, in the group exposed to 0.05 µg/ml lovastatin. On the other hand, in the control group, eggs at all the stages, including mature eggs, and hatched miracidia could be seen (Fig. 1). In the groups submitted to lovastatin at the concentrations of 2 and 4 µg/ml, the 1st stage-eggs were not able to develop. After an 8-day-period of observation, the total number of morphologically dead eggs in the groups exposed to 2 µg/ml and 4 µg/ml lovastatin *in vitro* was 44 (73.3%) and 348 (94.8%), respectively; in the control group it was 144 (27.5%). Using the probe Hoechst 33258, a fluorescent marker that label dead eggs (Sarvel et al 2006) it was observed that in the group exposed to 2 µg/ml lovastatin, 69% of the morphologically viable eggs were labeled by the probe, whereas in the group exposed to 4 µg/ml lovastatin, 74% of the eggs were labeled. In the control group, 16% of the morphologically viable eggs were labeled by the probe ($p < 0.05$). The labeled eggs are shown in Fig. 2.

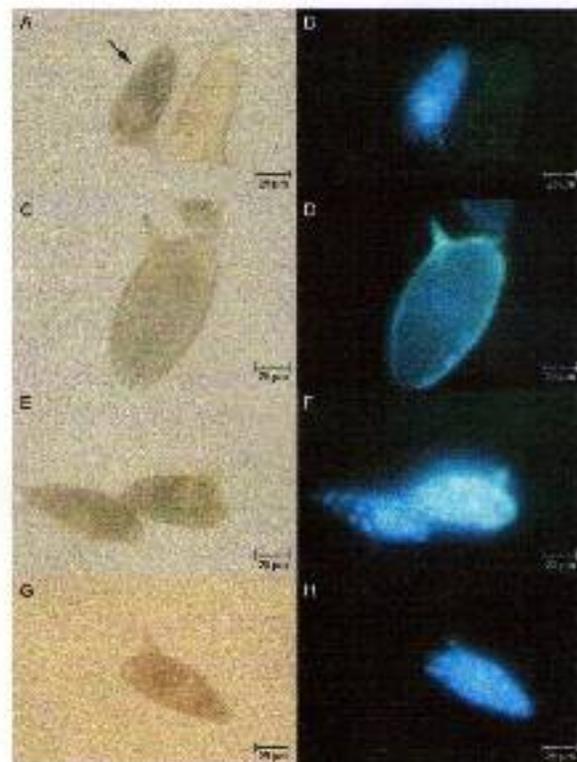


Fig. 2: classification of *S. mansoni* eggs by morphological (left) and fluorescent microscopy techniques using the probe Hoechst 33258 (right). A-D: control, untreated worms; E-H: worms exposed to 2 µg/ml or 4 µg/ml lovastatin *in vitro* for 24 h. A: morphologically viable egg of the 1st stage and an empty egg (8-day-culture period); B: the same eggs with the embryo region clearly stained; considered as dead egg; C: morphologically viable mature egg (8-day-culture period); D: miracidium without labeling (alive egg); E: morphologically viable eggs of the 1st and 2nd stages (8-day-culture period) laid by treated worms; F: the same eggs both of them with the embryo region clearly stained (dead eggs); G: morphologically dead egg (8-day-culture period); H: the same egg totally labeled (dead egg).

The worms obtained from mice treated with lovastatin (400 mg/kg/day for 5 days) and sacrificed three days after the end of treatment were cultured *in vitro* (in vivo/in vitro trials) in parallel with a group of worms exposed to 4 µg/ml lovastatin *in vitro*, as well as with a control group (worms not exposed to drug). Morphological changes could not be observed throughout the 8-day culture, regarding the motion and egg-laying among the worms treated *in vivo* or *in vitro*, as well as among the worms of the control group. In both cases, the eggs reached maturation, and hatching of miracidia could also be seen. The worms exposed to lovastatin *in vitro* presented results similar to those of the former experiment, as above mentioned.

DISCUSSION

Vandewaa et al. (1989) working with mevinolate, farnesol and mevinolin, *in vivo* and *in vitro*, suggest that egg-production in schistosomiasis is associated with the activity of the enzyme 3-hydroxy 3-methylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA) reductase, and that non-sterol lipids produced in biochemical metabolism, modulated by this enzyme, stimulate egg-production. Chen et al. (1990) observed that egg-laying by the parasite females was discontinued in mice infected with *S. mansoni* and treated with low doses of mevinolin. The administration of 0.2% mevinolin in the diet of infected mice (14 days) resulted in elimination of 96% of the parasites. The same dose administered two days before and 15 days *pi* resulted in 93-95% reduction in the number of adult parasites. When mevinolin was administered with 0.5% mevinolate, there was inhibition of the anti-schistosomal activity of the former, suggesting that mevinolate and/or metabolites are of the utmost importance for inhibiting *S. mansoni* egg-production, as well as promoting the parasite's survival.

Lovastatin, a lactone, inactive form of the corresponding open hydroxylic acid, is a potent inhibitor of the endogenous synthesis of cholesterol. After gastrointestinal absorption, lovastatin is rapidly hydrolysed to open hydroxyacid, a competitive inhibitor of HMG-CoA reductase, an enzyme that catalyzes a regulatory step in the biosynthesis of cholesterol. In clinical studies (Araújo et al. 2002), lovastatin reduced the total plasmatic cholesterol concentrations and lipoprotein of low density, as well as lipoprotein of very low density bound to cholesterol.

Araújo et al. (2002) investigated the activity of lovastatin on the oviposition of the adult worm in experimentally infected mice with *S. mansoni*. These authors demonstrated that, despite the relatively low mortality rate (~30%) of the worms, when the beginning of treatment was on the 30th day *pi*, with an oral dose of 400 mg/kg, for five consecutive days, there was a reduction in the oviposition of *S. mansoni* females, presenting oogram changes in up to 80% of mice, and an average number of eggs in the jejunum and liver significantly lower in the treated animals, when compared to the control group. The morphological analysis of the worms revealed degenerative changes, mainly in the reproductive apparatus of the worms, with reduction and alteration in the vitelline follicles and in the ovary of females, as well as changes in the male testis.

The role of cholesterol in schistosomiasis *mansoni* was experimentally evaluated by Neves (2006), using four groups of animals: infected, fed on a diet rich in cholesterol (29% of lipids); infected, fed on a standard diet (12% of lipids); uninfected, fed on a diet rich in cholesterol; uninfected, fed on a standard diet. It was observed that infected mice that received a diet rich in cholesterol presented a higher number of viable *S. mansoni* eggs, a greater maturation and peak numbers of eggs in feces, when compared to the group of infected mice fed on a standard diet. It was also observed that the adult worms recovered from the group of infected mice fed on a diet rich in cholesterol (29% lipids) presented a higher number of morphological changes in the reproductive apparatus of male worms, mainly in relation to supernumerary lobe, seminal vesicle and spermatheca. In this group, the ovary of females presented a higher number of oocytes being discharged than in females belonging to the group with 12% lipids in the diet. It seems that a site rich in cholesterol is beneficial for reproduction and discharge of *S. mansoni* eggs (Neves 2006).

Soliman & Ibrahim (2005) studied the activity of atorvastatin (cholesterol lowering agent) alone, and concurrently with medoxyprogesterone (intramuscular contraceptive) on *S. haematobium* adult worms, in experimentally infected hamsters. Atorvastatin administered by oral route, at the dose of 0.9 mg/kg starting from day 35 *pi*, for 49 consecutive days, and with medoxyprogesterone acetate in association, at the dose of 0.1 ml/kg on days seven and 35 *pi*, intramuscularly, produced damages in the tegument of male and female worms. Loss or rupture of tubercles, collapse of tissues, and erosion of the tegument and of the oral suckers, degenerations or collapses of sensorial organelles, were some of the observed changes. Administration of atorvastatin alone, according to the same schedule previously described, produced less severe damages in the tegument of male worms, and only a few females presented tegumental changes. Both treatment schedules (atorvastatin concurrently with medoxyprogesterone acetate or alone) contributed to a significant reduction in the total number of recovered worms, 46.2% and 51.3%, respectively. The two drugs in association produced oogram changes, with a high number of dead eggs.

In the present work, *in vivo* assays showed that lovastatin acted on *S. mansoni* egg-laying, initially by decreasing in the presence of egg in the female uterus, and after that by oogram changes. These results were observed not only in the animals treated with lovastatin alone, but also when this drug was administered concurrently with oxamniquine. *In vitro* trials showed that maturation of eggs was not complete due to the action of lovastatin, being interrupted at the 1st or 2nd stages, according to the dose used. On the other hand, those eggs discharged by females of the control group developed normally, passing through all the stages, reaching maturation and culminating with miracidium hatching. The complete process of egg maturation was also observed when worms were recovered from mice treated with lovastatin and cultured *in vitro*. The exposure of worms to lovastatin *in vitro* is necessary to obtain the blockage of egg development. Additionally, the viabil-

ity of *S. mansoni* eggs showed a significant difference when a fluorescent probe was used. In fact, the average of morphologically viable eggs, labeled by the probe, was 70% approximately in the groups exposed to 2 µg/ml or 4 µg/ml lovastatin. In the control group, it was observed that only 16% of the morphologically viable eggs were labeled by the probe. Since egg labeling by the probe indicates that the egg is dead, the difference in the classification of viable eggs is evident when the probe is used in comparison when only the morphology of the egg is observed under an optic microscope. When applied in assays without drug utilization, the methodology recommended by Sarvel et al. (2006) with the aim to confirm the traditional morphological classification, 83% of corroboration between the two methods was detected. Nevertheless, in the trials related to drug activity was much lower (30%), i.e., only 10 out of 35 morphologically viable eggs present in the groups exposed to 2 µg/ml or 4 µg/ml lovastatin were not labeled by the probe. The use of the probe Hoechst 33258 enhances the sensitivity of the trials aiming to evaluate drug action on viable *S. mansoni* eggs.

The data obtained corroborate the action of lovastatin in *S. mansoni* egg-laying, in both in vivo and in vitro experiments. Nevertheless, the synergistic or additive schistosomicidal action of this drug concurrently with other known antischistosomal drugs (oxamniquine or praziquantel) could not be observed.

ACKNOWLEDGEMENT

To Dr. John R. Kusel for his suggestions and review of the manuscript.

REFERENCES

- Araujo N, Kohn A, Oliveira AA, Katz N 2002. *Schistosoma mansoni*: ação da lovastatina no modelo murino. *Rev Soc Bras Med Trop* 35: 35-38.
- Chen GZ, Foster L, Bennett JL 1990. Antischistosomal action of mevinolin: evidence that 3-hydroxy-methylglutaryl-coenzyme A reductase activity *Schistosoma mansoni* is vital for parasite survival. *Nauryn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 342: 477-482.
- Doenhoff MJ, Kussel JR, Coles GC, Cioli D 2002. Resistance of *Schistosoma mansoni* to praziquantel: is there a problem? *Trans R Soc Trop Med Hyg* 96: 465-469.
- Katz N 1980. Experiência com quimioterapia em grande escala no controle da esquistossomose no Brasil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 22: 40-51.
- Neves RH 2006. *Avaliação do papel da dieta rica em colesterol na esquistossomose mansônica experimental de Mus musculus Swiss Webster*, PhD Thesis, Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 161 pp.
- Pellegrino J, Oliveira CA, Faria J, Cunha AS 1962. New approach to screening of drugs in experimental *Schistosomiasis mansoni* in mice. *Am J Trop Med Hyg* 11: 201-215.
- Pellegrino J, Siqueira AF 1956. Técnica de perfusão para colheita de *Schistosoma mansoni* em cobaias experimentalmente infestadas. *Rev Bras Malariol Doenças Trop* 8: 589-597.
- Sarvel AK, Kusel JR, Araujo N, Coelho PMZ, Katz N 2006. Comparison between morphological and staining characteristics of live and dead eggs of *Schistosoma mansoni*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 101 (Suppl. 1): 289-292.
- Smithers SR, Terry RJ 1965. The infection of laboratory hosts with cercariae of *Schistosoma mansoni* and the recovery of adults worms. *Parasitology* 55: 695-700.
- Soliman MFM, Ibrahim MM 2005. Antischistosomal action of atorvastatin alone and concurrently with medroxyprogesterone acetate on *Schistosoma haematobium* harboured in hamster: surface ultrastructure and parasitological study. *Acta Trop* 93: 1-9.
- Vandewaa EA, Mills G, Foster LA, Bennett JL 1989. Physiological role of HGM-CoA reductase in regulating egg production by *Schistosoma mansoni*. *Am J Physiol* 257: 618-625.

5.2 Artigo 2

Association of oxamniquine, praziquantel and clonazepam in experimental schistosomiasis mansoni

Memórias do Instituto Oswaldo Cruz Vol. 2008;103(8):781-785

Estado do Conhecimento

O clonazepam, fármaco de uma classe química conhecida como benzodiazepinas, que possuem como principais propriedades inibição leve das funções do sistema nervoso central com ação anticonvulsivante, sedativa, relaxante muscular e efeito tranquilizante, foi citado pela primeira vez como esquistossomicida por Stohler (1978). Pax et al (1978) revelaram que vermes de *S. mansoni* incubados em pequenas concentrações de clonazepam apresentavam contrações na musculatura e tornavam-se imóveis, resultando daí o seu efeito esquistossomicida. Estudos feitos por Bennett em 1980 sugeriram que o verme macho de *S. mansoni* apresenta sítios de ligação para os benzodiazepínicos em seu tegumento. Noel *et al.* (2007) pesquisaram a presença de receptores do ácido gama-aminobutírico (GABA) em vermes adultos de *S. mansoni*, usando [3H] – flunitrazepam para marcar os sítios de ligação alósterico dos agentes benzodiazepínicos e detectaram em grande parte da população de vermes alta afinidade de sítios de ligação para a droga estudada. Os autores descrevem as propriedades farmacológicas de alguns receptores diazepínicos como uma contribuição para o desenvolvimento de novas drogas esquistossomicidas. Descrevem também, pela primeira vez, a presença de receptores benzodiazepínicos periféricos no parasita.

Questões

- O clonazepam possui ação esquistossomicida?
- O clonazepam age sobre os vermes do *S. mansoni* em experimentos *in vivo*?
- O clonazepam age sobre os vermes do *S. mansoni* em experimentos *in vitro*?
- O clonazepam apresenta ação sinérgica em associação com oxamniquina ou praziquantel?

Resultados principais

Os resultados apresentados evidenciam a ação do clonazepam sobre o verme adulto do *S. mansoni*, *in vitro*, causando paralisia total dos vermes machos e fêmeas do *S. mansoni*. Entretanto, com os esquemas terapêuticos utilizados em experimentos *in vivo* não foi detectado atividade contra os vermes do *S. mansoni* quando o clonazepam foi administrado em monoterapia, nem ação aditiva ou sinérgica quando associado à oxamniquina ou ao praziquantel.

Association of oxamniquine praziquantel and clonazepam in experimental Schistosomiasis mansoni

Neusa Araújo^{1*}, Ana Carolina Alves de Mattos, Paulo Marcus Zech Coelho², Naftale Katz¹

¹Laboratório de Esporozoários, Instituto René Rachou-Fiocruz, Av. Augusto de Lima 1715, 30190-002 Belo Horizonte, MG, Brazil

²Santa Casa de Belo Horizonte, Belo Horizonte, MG, Brazil

The antischistosomal activity of clonazepam, when administered alone or in association with oxamniquine and praziquantel, was experimentally evaluated in mice infected with Schistosoma mansoni. The animals were treated 45 days post-infection with a single dose, by oral route, according to three treatment schedules: clonazepam 25 mg/kg and sacrificed 15 min, 1h or 4 h after treatment; clonazepam 1.0, 2.5 or 10.0 mg/kg and sacrificed 15 days post-treatment or with the dose of 10 mg/kg in association with oxamniquine 50 mg/kg or praziquantel 200 mg/kg, single dose, orally, every schedule with a control group. The efficacy of the drugs in vivo was assessed by means of worm counts and their distribution in mesentery and liver, mortality and oogram changes. In the chemotherapeutic schedules used, clonazepam did not present antischistosomal activity and the result of the association of this drug with oxamniquine or praziquantel was not significantly different from the one obtained when these two last drugs were administered alone. In the in vitro experiments, the worms exposed to 0.6 mg/mL clonazepam remained motionless throughout the 8-day-period of observation, without egg-laying, whereas the worms of the control group showed normal movements, egg-laying and hatching of miracidia on the last day of observation. The results obtained in the present study confirm the action of clonazepam on S. mansoni adult worm, in vitro, causing total paralysis of males and females. However, no additive or synergistic effects were observed when clonazepam were used in association with oxamniquine or praziquantel.

Key words: Schistosoma mansoni - clonazepam - drug association

The most efficient measure for the morbidity control of schistosomiasis is the treatment of infected patients. According to Savioli et al. (2004), the antischistosomal drugs play an important role for the treatment of infection and for the control of morbidity and transmission.

In spite of oxamniquine and praziquantel, that are the two available antischistosomal drugs for treatment of the disease, being efficient and presenting few side effects, some relevant aspects must be considered. Oxamniquine has a complicated manufacturing process, requiring big fermentation tanks for biological synthesis, resulting in a high cost, when compared to praziquantel. Due to this difficulty, praziquantel has been practically the unique drug utilized at the moment, and the use of a single drug in a mass scale and in recurrent treatments may result in the emergence of resistant strains.

For the reasons above, it is clear that there is the need for new and effective drugs, or new alternatives for the treatment of schistosomiasis. In our laboratories, a large project to find new antischistosomal drugs is being conducted. One attempt is to use known antischistosomal agents (mainly oxamniquine or praziquantel) in association with other drugs that may increase the activity of these known schistosomicides. In this context, we re-

cently demonstrated that the concomitant use of lovastatine (potent inhibitor of the synthesis of cholesterol) produces in vitro and in vivo action against egg production and development (Araújo et al. 2008). Clonazepam belongs to the chemical group known as benzodiazepines, the main properties of which are mild inhibition of the functions of the central nervous system with anticonvulsive and sedative activity, muscular relaxant and tranquilizer effects, as its main properties. Clonazepam as an antischistosomal agent was quoted for the first time at Hoffmann-La Roche Laboratories by Stohler (1978). Pax et al. (1978) revealed that *Schistosoma mansoni* worms incubated in clonazepam concentrations presented muscular contractions and remained motionless, thus resulting in the antischistosomal effect of the drug. Studies performed by Bennett (1980) suggested that the male worms of *S. mansoni* present binding sites for benzodiazepines in their tegument.

Based on these studies, this work investigates the antischistosomal activity of clonazepam in experimentally infected mice with *S. mansoni*, as well as its association with oxamniquine and praziquantel, well known antischistosomal medicines. In vitro studies were also carried out to observe the possible damages caused in *S. mansoni* worms by clonazepam.

MATERIAL AND METHODS

Experimental chemotherapy - Swiss mice (mean weight 20 g) were infected by subcutaneous route with 100 ± 10 cercariae of *S. mansoni* (LE strain). The Guidelines of the Ethical Committee for the use of experimental animals of the Fiocruz were followed. Forty-five days

Financial support: FIOCRUZ, FAPEMIG

* Corresponding author: nauara@epc.fiocruz.br

Received 18 June 2008

Accepted 6 November 2008

post-infection, groups of animals were orally treated, single dose, according to three schedules: 25 mg/kg clonazepam (Medley Industry) and sacrificed 15 min, 1h or 4 h after treatment; 1.0, 2.5, 5.0 or 10.0 mg/kg clonazepam and sacrificed 15 days after treatment; 10 mg/kg clonazepam associated to 50 mg/kg oxamniquine (Mansil®/Pfizer), or to 200 mg/kg praziquantel (Farmanguinhos/Fiocruz), simultaneously with the control groups. The animals were sacrificed by cervical fracture and perfusion was performed for collecting worms in the mesentery and liver. The same procedures were adopted for the control groups constituted by infected and untreated mice (Pellegrino & Katz 1968).

In vivo activity evaluation - Drug activity was assessed by means of perfusion of the animals pertaining to treated and control groups, considering the mean of the number of worms, rates of worm distribution in the mesentery and liver, dead worms in the liver and oogram changes (Pellegrino et al. 1962).

In vitro trials - Mice infected with *S. mansoni* cercariae (LE strain) were sacrificed using sodium pentobarbital 3% (30 µL/mice) and perfused according to the technique by Smithers and Terry (1965). The collected worms were distributed into plates of six wells each (4 pairs of worms per well and kept in culture medium RPMI-1640 supplemented with 5% fetal bovine serum, 100 µg/mL of antibiotics penicillin/streptomycin). In the experimental group, the worms were exposed to clonazepam at the dose of 0.6mg/mL (1 mL of pediatric clonazepam, 2.5 mg/mL in 3 mL of culture medium) for 24 h and maintained in incubator at 37°C and 5% CO₂. In the control group, the worms were kept under the same conditions, except for the presence of the drug. Afterwards, the worms were washed with culture medium and maintained under the same previous conditions, but without drug addition throughout the rest of the trial. Observations under inverted microscope were documented 1 h after drug contact 5, 24, 48, 72 and 96 h after drug discontinuation and eight days after the beginning of the experiment. The culture medium was changed in alternate days. The experiments were performed in duplicate and repeated twice (2 experiments).

Statistical analysis - The results obtained were compared by means of the Student's *t* test, $p \geq 0.05$ being stipulated as significance level.

RESULTS

The results obtained with experimentally infected mice with *S. mansoni* (LE strain), treated with clonazepam 25 mg/kg/body weight, single dose, by oral route, and sacrificed 15 min, 1h or 4 h after treatment can be seen in Table I. In the treated animals, a discrete migration of the worms (ca 30%) to the liver could be observed, whereas in the animals of the control group this displacement was about 10% (not significant difference). No dead worms in the liver, as well as oogram changes were observed.

Table II shows the results obtained in mice treated with clonazepam 1.0, 2.5, 5.0 or 10.0 mg/kg and sacrificed 4 h or 15 days after treatment. No significant differences were presented by the animals of the treated groups when compared with the control group. It is worth highlighting that the animals treated with the highest dose (25 mg/kg body weight) remained sedated for at least 3 h, being recovered after this period. In none of the groups could be found a dead animal due to sedation.

The results of the trial with 10 mg/kg clonazepam in association with 50 mg/kg oxamniquine or with 200 mg/kg praziquantel are indicated in Table III. In the animals treated with clonazepam alone, a worm mortality rate of 6.8% could be observed, however, the other parameters did not show any change when compared with the control group. The results obtained in animals treated with clonazepam alone did not present significant differences, when compared with those obtained in animals treated with clonazepam in association with oxamniquine or praziquantel.

In vitro trials - The worms exposed to clonazepam could be seen motionless 1 h after contact with the drug, and so they remained throughout the rest of the experiment (Table IV). In the first trial, some worms could be seen contracted, when the observation was performed 48 h after the beginning of the experiment. In the second trial, the worms remained motionless and some blisters appeared in the tegument up to the 8th day of observation. *S. mansoni* eggs could not be seen in the experimental wells. The worms in the control groups appeared with normal movements and morphology, presenting eggs during the first 24 h, with the presence of newly hatched miracidia, when examined eight days after the beginning of the experiment (Figure).

TABLE I

Results obtained in mice experimentally infected with 100 ± 10 cercariae of *Schistosoma mansoni* (LE strain) treated with clonazepam 25 mg/kg body weight, single dose, orally, 45 days after infection

Time after treatment	Number of animals examined	Mean of worms	Distribution of worms %		Dead worms in the liver %	Oogram changes %
			Mesentery	Liver		
15 min	3	13.3	80.0	20.0	0.0	0.0
1 h	3	7.5	73.3	26.7	0.0	0.0
4 h	3	14.0	69.0	31.0	0.0	0.0
Control	3	10.6	90.6	9.4	0.0	0.0

TABLE II

Results obtained in mice experimentally infected with 100 ± 10 cercariae of *Schistosoma mansoni* (LE strain), treated with clonazepam, single dose, orally, 45 days after infection

Treatment schedule mg/kg	Time after treatment	Number of animals*		Mean of worms	Distribution of worms %		Dead worms in the liver %	Oogram changes %
		Treated	Examined		Mesentery	Liver		
1.0	4 h	3	3	6.7	85.0	15.0	0.0	0.0
1.0	15 days	5	5	14.0	97.1	2.9	0.0	0.0
2.5	4 h	3	3	9.3	85.7	14.3	0.0	0.0
2.5	15 days	5	5	14.8	86.5	13.5	0.0	0.0
5.0	4 h	3	3	11.0	90.9	9.1	0.0	0.0
5.0	15 days	5	3	8.3	84.0	16.0	0.0	0.0
10.0	4 h	3	3	8.0	95.8	4.2	0.0	0.0
10.0	15 days	5	1	7.0	100.0	0.0	0.0	0.0
Control	-	-	5	15.6	88.5	11.5	0.0	0.0

or: the difference between the number of treated animals and examined animals means the number of dead animals.

TABLE III

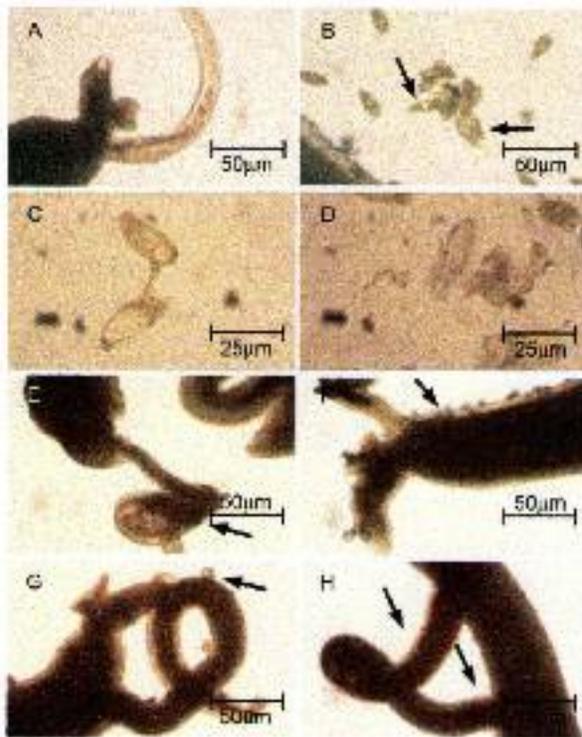
Results obtained in experimentally infected mice with 100 ± 10 *Schistosoma mansoni* cercariae treated 45 days after infection with 10 mg/kg clonazepam (CLO) alone or in association with 50 mg/kg oxamniquine (OXA) or 200 mg/kg praziquantel (PZQ), single dose, orally, and sacrificed 15 days post-treatment. There was no significant difference between the results obtained with oxamniquine and praziquantel when administered alone and those ones obtained with these two drugs in association with clonazepam.

Drug	Treatment schedule mg/kg	Number of animals		Mean of worms	Worm distribution %		Dead worms in the liver %	Oogram changes %
		Treated	Examined		Mesentery	Liver		
OXA	50	14	14	6.2	62.1	37.9	32.2	50.0
PZQ	200	14	14	9.7	36.8	63.2	56.6	42.9
CLO	10	14	14	10.2	79.5	20.5	6.8	0.0
CLO + OXA	10 + 50	14	14	9.3	40.0	60.0	56.2	64.3
CLO + PZQ	10 + 200	14	14	13.6	32.6	67.4	61.0	42.9
Control	-	-	14	12.6	86.4	13.6	0.0	0.0

TABLE IV

Results obtained in in vitro experiments using adult *Schistosoma mansoni* worms exposed to clonazepam at the dose of 0.6 mg/ml.

Group	Period of observation	Observations (worms)
Experimental	1 h of contact	motionless, paired, without contraction, normal morphology, absence of eggs
Control		live, paired, normal movements and morphology, absence of eggs
Experimental	24 h of contact	motionless, paired, absence of eggs
Control		live, paired, normal movements and morphology, = 100 eggs at the first stage and dead
Experimental	5 h after contact	motionless, paired, absence of eggs
Control		live, paired, normal movements and morphology, = 100 eggs at the first stage and dead
Experimental	24 h after contact	motionless, 2 pairs of mated worms and 3 unmated other ones, contracted, absence of eggs
Control		live, paired, normal movements and morphology, = 150 eggs at 1st and 2nd stages and dead
Experimental	48 h after contact	motionless, absence of eggs
Control		live, paired, normal movements and morphology, eggs at the 1st, 2nd, 3rd and 4th stages and dead
Experimental	7 days after contact	motionless, apparently without damages in the tegument, absence of eggs
Control		live, paired, normal movements and morphology, eggs at all developmental stages, presence of hatched miracidia but dead



Evaluation of the *in vitro* activity of clonazepam on *Schistosoma mansoni* worms. Control group not exposed to the drug. A: paired adult worms without apparent morphological change, two days of culture; B: presence of eggs of 1st (arrow) and 2nd (head of the arrow) stages, two days of culture; C: presence of eggs at the 4th stage, eight days of culture; D: presence of hatched miracidium, eight days of culture. Evaluation of the *in vitro* activity of clonazepam on *S. mansoni* worms. Group exposed to 0.6 mg/ml of the drug. E: adult worms: paired, motionless and contracted (firmish arrow), two days of culture; F, G: adult worms: paired, motionless and contracted (2 and 3 days of culture, respectively), presence of crystals adhered to the worm tegument (arrow); H: paired female and male presenting separation of the tegument (arrow), eight days of culture. In none of the observations eggs in the groups exposed to clonazepam could be detected.

DISCUSSION

The results obtained show that clonazepam did not present antischistosomal activity *in vivo* when administered alone, nor additive or synergistic action, when used in association with antischistosomal drugs (oxamniquine and praziquantel).

Stobler (1978) identified the benzodiazepines clonazepam and RO 11-3128 (methylclonazepam) as being antischistosomal drugs. That author showed that RO 11-3128 was highly effective against *S. mansoni* infection, similar to niridazole, hycanthone and oxamniquine. *In vitro*, when added at a concentration of 6.25 µg/mL to the medium containing *S. mansoni* male worms, contraction of these worms could be observed after some seconds. In hamsters, the activity against *Schistosoma haematobium* was similar to that showed for *S. mansoni*.

However, infection due to *Schistosoma japonicum* was resistant to treatment when using hamsters treated with doses up to 150 mg/kg administered in five times. Pax et al. (1978) studied the activity of benzodiazepine RO 11-3128 and of praziquantel in the musculature of *S. mansoni* and *S. japonicum* worms and showed that at low concentrations this compound causes tension, paralysis and lack of movement in male worms. Bennett (1980), *in vitro* studies using 20 *S. mansoni* male worms and 20 also of *S. japonicum*, incubated at 37°C for 10 min in 2.0 mL of Earl's solution and varying the concentration of benzodiazepine RO 11-3128, suggested that *S. mansoni* male worm is endowed with a specific binding site, when this worm presents an intact tegument. These binding sites were clearly changed in presence of agents that, as it is well known, are able to destroy the membrane integrity. Boyle et al. (1985) evaluated the effect of meclonazepam (3-methylclonazepam) in volunteers, using single doses of 1, 2 and 4 mg, orally, and reported that the doses higher than 1 mg caused dose-dependent damages in the cognitive and psychomotor functions of patients, as well as mood changes and ataxia. These effects could be markedly observed at the first 3 h after drug administration and a mild sedation up to 6 h after drug administration of 4 mg. The authors suggest, as a result of the findings, that the use of benzodiazepines as antischistosomal drugs needs further investigation. Leite and Monteiro (2007) studied the participation of the binding sites in the contractive activity of clonazepam and 3-methylclonazepam on *S. mansoni* worms. Male adult worms were placed on glass slides containing saline solution and the muscular contraction effect of benzodiazepines was evaluated through the reduction of the body area, measured by analysis of the images captured by cameras. They observed that the utilized benzodiazepines at the concentration of 10 µM led to worm contraction in a time-dependent manner, similar to that of praziquantel, when used at the concentration of 1 µM. Based on these results, they concluded that the effect of contraction caused by both benzodiazepines is not due either to a direct effect in the worm muscle or as a result of binding to one of the two benzodiazepinic receptors present in *S. mansoni*. Noel et al. (2007) investigated the presence of gamma-aminobutyric acid (GABA) in *S. mansoni* adult worms, using [3H]-flunitrazepam to label the allosteric binding sites of the benzodiazepinic receptors and detected a large number of binding sites to [3H]-flunitrazepam in the great majority of the worm population. The authors describe the pharmacological properties of some diazepam receptors as possible targets for the development of new antischistosomal drugs. The presence of benzodiazepinic peripheral receptors in the parasite was found for the first time by Noel et al. (2007). Pica-Mattoccia et al. (2008) studied the mode of action of RO11-3128 (methyl-clonazepam) and praziquantel, *in vitro* and *in vivo*, on *Schistosoma* worms. Both drugs cause paralysis, influx of the calcium ducts and damages in the parasites' tegument. Since it is well known that RO 11-3128 is active against immature

worms of *S. mansoni* and praziquantel is ineffective at this phase, praziquantel being active against *S. japonicum*, whereas RO 11-3128 is inactive, the excess of one drug on another one was studied. It was verified that the excess of praziquantel does not inhibit the activity of RO 11-3128 on *S. mansoni* immature worms and an excess of RO 11-3128 does not inhibit the efficacy of praziquantel on *S. japonicum*, suggesting that the binding site of the worm with both drugs is rather different. On the other hand, when cytochalasin D, an agent that blocks the calcium channel, was used it inhibited the activity of both agents. Association of these results suggests that both drugs, although binding themselves at different receptor sites in the parasite, present the same schistosomicidal mechanism (Picca-Mattocchia et al. 2008).

It must be highlighted that in the majority of the studies above mentioned, the activity of clonazepam and RO 11-3128 was observed in male worms of *S. mansoni* proceeding from unisexual infections. Pica-Mattocchia et al. (2008) showed the activity of praziquantel and RO 11-3128 on *S. japonicum* adult worms, males and females, and reported that praziquantel was found to be more active against male worms. Pre-incubation with RO 11-3128 for 1 h before addition of praziquantel did not affect the activity of this last drug (Picca-Mattocchia et al. 2008).

The results obtained in the present study confirm the action of clonazepam on *S. mansoni* adult worm, in vitro, causing total paralysis of males and females. However, with the therapeutic schedules used in experimentally infected mice, it was not possible to detect any activity against *S. mansoni*, when clonazepam was administered alone or in association with oxamniquine or praziquantel. No additive or synergistic effects were observed when clonazepam was used in association with these two known antischistosomal drugs.

ACKNOWLEDGEMENT

To Dr. John R. Kusel, for his suggestions and reviewing of manuscript.

REFERENCES

- Araújo N, Mattos ACA, Sarvel AK, Coelho PMZ, Katz N 2008. Oxamniquine, praziquantel and lovastatin association in the experimental Schistosomiasis mansoni. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 103: 450-454.
- Bennett JL 1980. Characteristics of antischistosomal benzodiazepine binding sites in *Schistosoma mansoni*. *J Parasitol* 66: 742-747.
- Boyle CO, Lambe R, Darraugh A 1985. Central effects in man of the novel schistosomicidal benzodiazepine meclonazepam. *Eur J Clin Pharmacol* 29: 105-108.
- Leite CC, Monteiro LM 2007. Efeitos contraturantes do clonazepam e 3-metilclonazepam em *Schistosoma mansoni* adultos e sua relação com sítios de ligação benzodiazepínicos. In *XXIX Jornada Giulio Massarani de Iniciação Científica e Cultural da UFRJ*, Vol. 1, UFRJ, Rio de Janeiro, resumo 2543, p. 435.
- Noel F, Mendonça-Silva DL, Thibaut JP, Lopes DV 2007. Characterization of two classes of benzodiazepine binding sites in *Schistosoma mansoni*. *Parasitology* 22: 1-10.
- Pax R, Bennett JL, Fetterer R 1978. A benzodiazepine derivative and praziquantel: effects on musculature of *Schistosoma mansoni* and *Schistosoma japonicum*. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 304: 309-315.
- Pellegrino J, Katz N 1968. Experimental chemotherapy of Schistosomiasis mansoni. *Adv Parasitol* 6: 233-290.
- Pellegrino J, Oliveira CA, Faria J, Cunha AS 1962. New approach to screening of drugs in experimental Schistosomiasis mansoni in mice. *Am J Trop Med Hyg* 11: 201-215.
- Picca-Mattocchia L, Ruppel A, Xia CM, Cioli D 2008. Praziquantel and the benzodiazepines RO 11-3128 do not compete for the same binding sites in schistosomes. *Parasitology* 135: 47-54.
- Savioli L, Albonico M, Engels D, Montresor A 2004. Progress in the prevention and control of Schistosomiasis and soil-transmitted helminthiasis. *Parasitol Int* 53: 103-113.
- Smithers SR, Terry RJ 1965. The infection of laboratory hosts with cercariae of *Schistosoma mansoni* and the recovery of adult worms. *Parasitology* 55: 695-700.
- Stohler HR 1978. RO 11-3128 - a novel schistosomicidal compound. *Proceedings of the 10th International Congress of Chemotherapy*, Vol. 1, American Society for Microbiology, Washington DC, p. 147-148.

5.3 Artigo 3

Oxamniquine and praziquantel association in experimental schistosomiasis mansoni

Submetido à Acta Tropica

Estado do Conhecimento

O modelo experimental de avaliação da atividade aditiva ou sinérgica de fármacos, utilizado por Shaw e Brammer (1983), é um bom modelo para estudos de associação de fármacos. Os autores apresentaram resultados obtidos após o tratamento de camundongos infectados experimentalmente com *S. mansoni* com doses crescentes de oxamniquina, praziquantel e os dois fármacos associadas. Os resultados foram apresentados em um isoblograma, mostrando a ação sinérgica entre oxamniquina e praziquantel. Dados referentes à associação oxamniquina praziquantel para o tratamento clínico da esquistossomose são controversos. Pugh e Teesdale (1983) e Campos et al (1985), relataram ação sinérgica; entretanto, Creasey et al. (1986), Dietze e Prata (1986), Zwingberger et al. (1987), Farid et al. (1990) e Grysche et al. (2004) relataram ausência de sinergismo. Em experimentos utilizando animais, Shaw e Brammer (1983), Campos et al. (1989), Botros et al (1989) e Delgado et al. (1992) demonstraram sinergismo; Campos et al (1987) relataram ausência de sinergismo da associação quando os animais foram tratados na fase pré-patente da infecção.

Questões

- A associação de oxamniquina com praziquantel possui efeito sinérgico?
- A associação de oxamniquina com praziquantel é eficaz mesmo havendo um intervalo de tempo entre a administração dos dois fármacos?
- A associação oxamniquina-praziquantel é ativa em todas as fases de desenvolvimento do *S. mansoni*?

Resultados principais

A associação se mostrou mais ativa do que os fármacos administrados em monoterapia quando os dois medicamentos foram administrados simultaneamente ou quando o praziquantel foi administrado 4 horas, 1 ou cinco dias após a oxamniquina. A associação dos dois fármacos nas várias fases da infecção apresentou redução no número de vermes vivos, excetuando-se o grupo de camundongos tratados após 21 dias da infecção, fase em que o tratamento com a oxamniquina e o praziquantel usados em monoterapia, também não foi eficaz, mostrando ser a terceira semana da infecção a mais crítica em relação à quimioterapia. O praziquantel começou a apresentar atividade significativa a partir do 28º dia da infecção. Os dados apresentados mostram que o melhor esquema terapêutico foi o da associação dos dois medicamentos administrados simultaneamente na fase patente da infecção, tanto pela atividade apresentada quanto pela praticidade do tratamento.

Elsevier Editorial System(tm) for Acta Tropica

Manuscript Draft

Manuscript Number:

Title: Oxamniquine and praziquantel association in experimental schistosomiasis.

Article Type: Regular Articles

Keywords: Keywords: Schistosoma mansoni, oxamniquine, praziquantel, drug association

Corresponding Author: Mrs. Neusa Araujo, full researcher

Corresponding Author's Institution: Research Center René Rachou/FIOCRUZ

First Author: Neusa Araujo, full researcher

Order of Authors: Neusa Araujo, full researcher; Andrea C Vimieiro, MSc; Paulo Marcos Z Coelho, PhD; Naftale Katz, PhD, MD

Abstract: The effectiveness of oxamniquine (OXA) and praziquantel (PZQ) in association against schistosomiasis mansoni was evaluated using three different approaches: 1 - both drugs administered simultaneously or at predetermined intervals; 2 - different drug dosages used singly or in combination, with a view to obtain an activity curve and isobologram for synergism observation; 3 - both drugs administered at different stages of infection (prepatent and patent periods). Mice were experimentally infected with Schistosoma mansoni cercariae (LE strain), and treated with doses of 50 mg/kg OXA and 200 mg/kg PZQ using the schedules 1 and 3 above mentioned, and with 25, 50, 75 or 100 mg/kg OXA, as well as 100, 200 or 300 mg/kg PZQ according to schedule 3. Distribution of worms, number of dead worms, and oogram changes were the parameters considered for evaluation of drug activity, when administered in monotherapy or in association. The combination of both drugs showed a beneficial effect, when both drugs were simultaneously administered or when PZQ was given 4 hours, 1 day or 5 days after OXA. Combination among different dosages of OXA and PZQ presented synergistic activity. The association of both drugs at various stages of infection showed a reduction in the number of live worms collected by means of perfusion, with the exception of a group of mice treated 21 days postinfection, that showed a reduction of only 16.3%. This exception was maintained, when other parameters such as worm mortality rate and oogram changes were analyzed, and also when OXA and PZQ were given in monotherapy conditions. In relation to chemotherapy with these two drugs, the third week after infection was seen as the most critical one. Treatment with these drugs, administered singly or in association, 4 hours postinfection, showed similar results among all groups treated with the drugs in combination or with OXA in monotherapy as far as live worm burden reduction and oogram are concerned. PZQ started to show a significant activity when treatment was given, at least, 28 days after infection, whereas OXA presented activity already at the pre-patent period.

Oxamniquine and praziquantel association in experimental schistosomiasis mansoni

N. Araújo a, A.C.S. Vimeiro a, P.M.Z. Coelho, a,b and N. Katz a,b

a Laboratório de Esquistossomose, Centro de Pesquisas René Rachou/FIOCRUZ, Av. Augusto de Lima 1715, Barro Preto, 30.190-002 Belo Horizonte, MG, Brazil

b FAPEMIG (Fundação de Apoio à Pesquisa em Minas Gerais), Brazil

Abstract

The effectiveness of oxamniquine (OXA) and praziquantel (PZQ) in association against schistosomiasis mansoni was evaluated using three different approaches: 1 – both drugs administered simultaneously or at predetermined intervals; 2 – different drug dosages used singly or in combination, with a view to obtain an activity curve and isobologram for synergism observation; 3 – both drugs administered at different stages of infection (prepatent and patent periods). Mice were experimentally infected with *Schistosoma mansoni* cercariae (LE strain), and treated with doses of 50 mg/kg OXA and 200 mg/kg PZQ using the schedules 1 and 3 above mentioned, and with 25, 50, 75 or 100 mg/kg OXA, as well as 100, 200 or 300 mg/kg PZQ according to schedule 3. Distribution of worms, number of dead worms, and oogram changes were the parameters considered for evaluation of drug activity, when administered in monotherapy or in association. The combination of both drugs showed a beneficial effect, when both drugs were simultaneously administered or when PZQ was given 4 hours, 1 day or 5 days after OXA. Combination among different dosages of OXA and PZQ presented synergistic activity. The association of both drugs at various stages of infection showed a reduction in the number of live worms collected by means of perfusion, with the exception of a group of mice treated 21 days postinfection, that showed a reduction of only 16.3%. This exception was maintained, when other parameters such as worm mortality rate and oogram changes were analyzed, and also when OXA and PZQ were given in monotherapy conditions. In relation to chemotherapy with these two drugs, the third week after infection was seen as the most critical one. Treatment with these drugs, administered singly or in association, 4 hours postinfection, showed similar results among all groups treated with the drugs in combination or with OXA in monotherapy as far as live worm burden reduction and oogram are concerned. PZQ started to show a significant activity when treatment was given, at least, 28 days after infection, whereas OXA presented activity already at the pre-patent period.

Keywords: *Schistosoma mansoni*, oxamniquine, praziquantel, drug association

1. Introduction

Financial support: FIOCRUZ and FAPEMIG, Brazil.
Corresponding author: araujon@cpqrr.fiocruz.br
FAX: +55 – 31 – 3295-5315

Currently, there are two available drugs for the clinical treatment of schistosomiasis mansoni: oxamniquine (OXA), that is effective against *S. mansoni*, but not against *S. haematobium* and *S. japonicum*. Male worms are more susceptible to the action of OXA than females, and the drug is active in all the stages of infection, except on the third week (Cioli et al., 1995); praziquantel (PZQ), that has cure activity against *S. mansoni*, *S. haematobium*, *S. japonicum*, *S. intercalatum* and *S. mattheei*, mainly at the patent period of infection, and showing evidence for the preferential killing of female worms (Gönnert and Andrews 1977). Worms are less susceptible to the action of PZQ at the prepatent period of infection (Andrews, 1981). However, reports on the worm resistance to OXA (Cioli et al., 1993; Fallon and Doenhoff, 1994; Coelho et al., 1997; Bonesso Sabadini and Dias, 2002), and its high cost of production, have contributed to the almost exclusive use of PZQ for treatment of the disease.

Taking into account reports on cases of resistance or therapeutic failures attributed to treatment with PZQ (Fallon and Doenhoff, 1994; Ismail et al., 1999; Cioli, 2000; Liang et al., 2001; Doenhoff et al., 2002), studies on novel therapeutic agents or on the current agents with new association schedules are needed (Zwingberger et al., 1987), aiming to prevent resistance, side effects and enhancing the therapeutic effects.

The experimental model of the additive or synergistic action of drugs used by Shaw and Brammer (1983) is a good template for studies on drug association. These authors, using experimentally infected mice with *S. mansoni*, presented results obtained after treatment with growing doses of OXA, PZQ and both drugs in combination. Fourteen days after treatment, the animals were sacrificed and the rate of encapsulated worms in the liver was calculated. The value considered was ED₉₉ the necessary dose to kill 99% of male worms. The values presented by means of a graph (isobologram) show that if the effect was merely additive, the values of ED₉₉ for the different association schedules should be near and follow the same design of the additive line. Data regression analysis demonstrated the synergistic action between OXA and PZQ (Shaw and Brammer, 1983).

The methodology of response curves and isobologram performed after ED₅₀ (dose that kills 50% of worms) for the drugs administered in monotherapy or in association, has been frequently utilized in order to define the type of the existent interaction between

two drugs (Gowing, 1960; Hatzios and Penner, 1985; Green and Bailey, 1987; Gressel, 1990; Strelbig et al., 1998). The curve of the response to the doses may be used not only in studies on associations, but also in studies on resistance to drugs. Another way to analyze the data related to association of drugs is through evaluation of the Combination Index (Icom) that correlates the ED₅₀ doses used in the association with those ones used in the administration of drugs isolately (Ramakrishnan and Jusko, 2001).

Data related to OXA-PZQ association for the clinical treatment of schistosomiasis are controversial. Pugh and Teesdale (1983) and Campos et al. (1985) reported synergistic activity; nevertheless, Creasey et al. (1986), Dietze and Prata (1986), Zwingbergter et al. (1987), Farid et al. (1990) and Gryscheck et al. (2004) reported absence of synergism. Experimentally in mice, Shaw and Brammer (1983), Campos et al. (1989), Botros et al. (1989), and Delgado et al. (1992) demonstrated synergism for mature infection; Campos et al. (1987) reported absence of synergism of drugs at the prepatent stage of infection.

In view of these conflictant results, the aim of the present study was to evaluate experimentally the efficacy of OXA-PZQ association, using subcurative doses of both drugs administered in monotherapy or in combination, simultaneously or at predetermined intervals among treatments, in order to obtain a curve of response, isobologram and assessment of the Combination Index, using equidistant and increasing doses of both drugs, as well as to verify the existence of synergism between OXA and PZQ administered at different stages of infection.

2. Materials and Methods

2.1. Treatment

Female Swiss mice, weighing 20 g, were subcutaneously infected with 100 ± 10 *S. mansoni* cercariae (LE strain), and treated with a single dose, by oral route, according to the following schedules (the Guidelines of the Ethical Committee for the use of experimental animals of the FIOCRUZ were followed).

2.1.1. Schedule 1

Groups of animals treated with 50 mg/kg/body weight OXA, 200 mg/kg PZQ, and a combination therapy at the same doses simultaneously, 4 hours, 1 or 5 days postinfection. The animals were sacrificed 45 days after treatment.

2.1.2. Schedule 2

Groups of mice were treated (45 days postinfection) with 25, 50, 75 or 100 mg/kg OXA; 100, 200 or 300 mg/kg PZQ, as monotherapy or in association (OXA and PZQ) and sacrificed 15 days after treatment.

2.1.3. Schedule 3

Groups of mice were treated with 50 mg/kg OXA, and 200 mg/kg PZQ or with a combination of both drugs, with the same doses 4 hours, 7, 14, 21, 28, 35 and 42 days postinfection. Groups treated 35 and 42 days postinfection were sacrificed 15 days after treatment, and the other ones were sacrificed on 45th day postinfection.

Each of all the mentioned schedules had a group of control mice infected with *S. mansoni* but untreated. The animals were sacrificed by cervical fracture (experimental and control groups). Afterthat, perfusion of the mesenteric vessels and liver was performed for collecting and counting the worms. The livers were squeezed between slide and cover slip, and observed under stereomicroscope, for countings of dead worms; fragments of 1 cm from the distal portion of the small intestine were collected, compressed on a plastic slide and observed under optical microscope for detection of *S. mansoni* eggs at different stages (Pellegrino et al., 1962).

The parameters considered for activity evaluation were the mean worm burden, worm distribution in the mesentery and liver, dead worm rate in the liver, and oogram changes (Pellegrino and Katz, 1968). Pearson's chi-square test, as well as a test to assess the comparison among proportions, using Bonferroni's correction, were utilized for data analysis (Johnson and Wichern, 1992).

For the graphic representation of the response curve and isobologram, the dead worm rates in the liver were determined in relation to each dose of both drugs, and the ED₅₀

for both drugs was calculated by means data regression analysis. The ED₅₀ of each drug applied isolately in a dispersion graph in logarithmic scale formed the points that together originated the activity isobole. The doses of OXA-PZQ association required to kill 50% of worms were determined by a graph in logarithmic scale, transformed into mg/kg and transferred to the graph. If the representative points of association are located around the activity isobole, it means that the association effect is additive; if they are under the activity curve it means that there is synergism, and above the curve it shows an antagonic effect (Gessner, 1995).

The Combination Index of the drugs was calculated according to the expression:

$$I_{com} = I_{50ab1}/I_{50a} + I_{50ab2}/I_{50b}$$

the doses I_{50ab1} and I_{50ab2} of OXA and PZQ being those ones effective in killing 50% of worms, when administered in association and I_{50a} and I_{50b} the doses as monotherapy (Ramakrisnan and Jusko, 2001).

3. Results

Table I shows the results obtained with OXA and PZQ administration, as well as the combination of these drugs given simultaneously or at predetermined intervals. Association of both drugs provoked a significant hepatic shift of worms, increased the dead worm rate and oograma changes. The most successful results could be seen when both drugs were simultaneously administered, or when PZQ was given 4 hours after OXA administration, since 100% worms were found dead in the liver, and 100% oogram changes could be detected as well. When PZQ was given 1 or 5 days after OXA administration, the results obtained were also significant, although with a lower percentage of dead worms (91.3 and 77.3%, respectively), but with 100% oogram changes.

The curves of worm mortality response to the doses of 25, 50, 75 or 100 mg/kg OXA administered singly or in association with 100, 200 and 300 mg/kg PZQ are depicted in Figure 1. The Combination Index values of the various association schedules can be seen in Table II. The results obtained with treatment combinations were adjusted to the log-logistic model. Administration of both drugs in association showed synergism,

even when lower doses of the drugs were used. In fact, 25 mg/kg OXA associated to 100 mg/kg PZQ resulted in a mean worm burden reduction of 50%, increased from 17 to 87% the worm mortality and from 0.0 to 100.0% the oogram changes.

The drug association tested at different stages of infection showed also synergism between the two drugs. OXA (50 mg/kg) given singly showed excellent efficacy when treatment was administered 4 hours after infection, with a worm reduction of 90% in relation to the control group, with only 2 out of 13 animals examined presenting eggs in the oogram. The most unfavorable result was detected when treatment started 21 days after infection, showing a very low worm mortality rate (4%), and only 1 out of 12 animals examined presented no eggs under oogram observation. PZQ (200 mg/kg) started to show activity only when treatment was given 35 or 42 days after infection, with 23% of worm mortality, 29% oogram changes and 67% of worm mortality, 46% oogram changes, respectively. Apart from treatment given 4 hours after infection, when the result presented by the animals treated with both drugs in association was similar to that presented by the animals treated with OXA alone, the combination of drugs showed higher efficacy (statistically significant) in all stages of infection in which the treatments were carried out. The results of oogram changes and worm mortality rates obtained from the protocols can be seen in Figures 2 and 3, respectively.

4. Discussion

In this study, the synergistic effect between OXA and PZQ was demonstrated using the experimental model for evaluation of the additive synergistic activity of drugs, according to Shaw and Brammer (1983). These authors were the first ones to report the efficacy of a combination of both drugs in experimental schistosomiasis mansoni. They utilized mice infected with *S. mansoni* and treated 7 weeks postinfection, single dose, oral route, with different doses of OXA and PZQ, isolately or simultaneously administered with different combinations. Using ED₉₉ (defined as the total dose required to kill 99% of male worms, and assessed by means of data regression analysis) as a parameter to evaluate both drugs simultaneously administered alone or in association, the authors obtained an isobologram showing that the values presented by combination

of both drugs could be seen under the activity isobole, thus indicating synergism between the two drugs.

Our results were submitted to regression analysis, and then the response curves and isobologram could be obtained using ED_{50} (defined as the drug total dose required to kill 50% of worms) as a parameter. Further, the Combination Index (1com) - that relates the doses (ED_{50}) used in the association of drugs with those ones utilized in the administration of drugs isolately – was then evaluated. Considering both methodologies used to evaluate the synergistic effect of the drugs: Isobologram and Combination Index – we may conclude that there was a synergistic effect between OXA and PZQ under the previously described conditions. In fact, the values of the doses (ED_{50}) of OXA and PZQ obtained at different association schedules, were found to be under the activity line, thus indicating synergism. Moreover, the values of the Combination Index (always inferior to 1) corroborated the synergistic effect of the drugs.

When OXA and PZQ were administered to the animals at different lengths of time intervals, the most successful results (100% dead worms and 100% oogram changes) were observed when both drugs were simultaneously administered, or when PZQ was given 4 hours after OXA administration. When treatment with PZQ was given 1 or 5 days after OXA administration, the absence of viable eggs confirmed by oogram observation was maintained in 100% of the animals examined. However, the worm mortality was not total, but decreased to 77%, when a 5-day interval was observed among treatments. Considering that the association side effects are rare, neither very much severe nor very different from those ones presented by the drugs used in monotherapy: dizziness, drowsiness, nausea, vomiting, and abdominal pain (Gryscheck et al., 2004).

The ideal procedure would be the treatment with both drugs given simultaneously, thus avoiding waiting time or the patient's return to the doctor's office in order to receive the second drug.

OXA-PZQ association, at different *S. mansoni* infection stages, was investigated by Botros et al. (1989) in mice previously infected and treated with 1/3 of the curative dose of each drug in combination. These authors compared the results with those ones obtained in animals treated with the same association dosages or with the curative doses of both drugs, 14 hours before infection, or 4 hours, 1, 2, 3, 4 and 5 days postinfection. They reported a better efficacy of treatment in animals that received the

drugs in association. The most significant results were observed in the animals treated 4 hours after infection, presenting 96% worm reduction and no eggs in the liver or intestine. Treatment with both drugs in association carried out 5 weeks after infection showed 98% reduction in the number of eggs detected in tissues.

Enk et al. (2008) reported for the first time in the literature the advantage in performing treatment in the early stages of schistosome infection. A technician suffered accidentally infected when handling an aquarium containing *Biomphalaria glabrata* snails infected with *S. mansoni* was treated with 50mg/kg OXA 6 hours after the accident and considered cured after repeated stool exams.

Our results showed a worm burden reduction of 97%, and 9 out of the 11 animals examined presented no *S. mansoni* eggs, when OXA-PZQ association was used for treatment 4 hours postinfection. However, administration of OXA in monotherapy showed a reduction of 92% in the number of eggs, and absence of eggs detected by oogram in 11 out of 13 animals examined as well.

These practically identical results showed no differential effect of single or combined OXA administration, at the pre patent stage of infection.

References

Andrews, P., 1981. A summary of the efficacy of praziquantel against schistosomes in animals experiments and notes on its mode of action. Drug Res. 31, 538-541.

Bonesso Sabadini, P.I.P., Dias, L.C.S., 2002. Altered response of *Schistosoma mansoni* to oxamniquine and praziquantel. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 97, 381-385.

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

Campos, R., Pinto, P.L.S., Sant'Ana E.J., Moreira, A.A.B., Amato Neto, V., Padilha, L.A.A., Levai, E.V., Catalano, C.M., 1985. Esquistossomose clínica e terapêutica: a associação de oxamniquine e praziquantel no tratamento da esquistossomose mansônica. XXI Congresso da Soc. Bras., Med. Trop, pp. 51.

Campos, R., Pinto, P.L.S., Sant'Àna, E.J., Moreira, A.A.B.; Amato-Neto, V., 1987. Tratamento de esquistossomose mansônica por meio da associação de oxamniquina com praziquantel. I – Observações experimentais relativas à fase pré-patente. Rev. Hosp. Clin. Fac. Med. São Paulo 42, 2021-203.

Campos, R., Pinto, P.L.S., Amato-Neto, V., Moreira, A.A.B., 1989. Tratamento da esquistossomose mansônica por meio da associação de oxamniquina com praziquantel. II – Observações experimentais relativas à fase patente. Rev. Hosp. Clin. Fac. Med. São Paulo 44, 111-114.

Cioli, D., Pica-Mattocchia, L., Archer, S. 1993. Drugs resistance in schistosomes. Parasitol. Today 9, 162-166.

Cioli, D., Pica-Mattocchia, L., Archer, S. 1995. Antischistosomal drugs: past, present and future. Pharmacol. Ther. 68, 35-85.

Cioli, D. 2000. Praziquantel: Is there real resistance and are there alternatives? Current Opinion in Infectious Diseases 13, 659-663.

Coelho, P.M.Z., Lima, F.C.S., Nogueira, J.A.M., 1997. Resistance to oxamniquine of a *Schistosoma mansoni* isolate from a patient submitted to repeated treatments. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo 39, 101-106.

Creasey, A.M., Taylor, P., Thomas, J.E.P., 1986. Dosage trial of a combination of oxamniquine and praziquantel in the treatment of Schistosomiasis in Zimbabwean schoolchildren. Cent. Afr. J. Med. 32, 165-167.

Delgado, V.S., Suarez, D.P., Cesari, I.M., Incani, M., 1992. Experimental chemotherapy of *Schistosoma mansoni* with praziquantel and oxamniquine: differential effect of single or combined formulations of drugs on various strains and on both sexes of the parasite. Parasitol. Res. 78, 648-654.

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

Doenhoff, M.J., Kussel, J.R., Coles, G.C., Cioli, D., 2002. Resistance of *Schistosoma mansoni* to praziquantel: is there a problem? Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 96, 465-469.

- Enk, M. J. Katz, N., Coelho, P. M. Z., 2008. A case of *Schistosoma mansoni* infection treated during the prepatent period. *Nature clinical practice Gastroenterology hepatology*. 5,112-5.
- Fallon, P.G., Doenhoff, M.J., 1994. Drug resistant schistosomiasis: resistance to praziquantel and oxamniquine induced in *Schistosoma mansoni* in mice is drug specific. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 51, 83-88.
- Farid Z., El Masry, N.A., Bassily, S., Kamal, M., Kilpatrick, M.E., 1990. Combined praziquantel-oxamniquine treatment of schistosomiasis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 84, 807.
- Gessner, P.K., 1995. Isobolographic analysis of interactions: an update on applications and utility. *Toxicology*. 105, 161-179.
- Gönnert R, Andrews P., 1977. Praziquantel, a new broad-spectrum antischistosomal agent. *Z Parasitenkd* 52, 129-150.
- Gowing, D.P., 1960. Comments on tests of herbicides mixtures. *Weeds* 8, 379-391.
- Green, J.M. Bailey, S.P., 1987. Herbicide interactions with herbicides and other agricultural chemical. In: McWhorter, C.G., Gebhardt, M.R. *Methods of applying herbicides*. Champaign: WSSA, 37-61.
- Gressel, J., 1990. Synergizing herbicides. *Rev. Weed Sci.* 5, 49-82.
- Grysczek, R.C.B., Carvalho, S.A., Amato-Neto, V., 2004. Eficácia e tolerabilidade da associação oxamniquine com praziquantel no tratamento da infecção humana por *Schistosoma mansoni*. *Rev. Bras. Med.* 2, 168-170.
- Hatzios, K.K., Penner, D., 1985. Interactions of herbicides with other agrochemicals in higher plants. *Rev. Weed Sci.* 1, 1-63.
- Ismail, M., Botros, S., Metwally, A., William, S., Farghally, A., Tao, L.F., Day, T.A., Bennett, J.L., 1999. Resistance to praziquantel: direct evidence from *Schistosoma mansoni* isolated from Egyptian villagers. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 60, 932-935.
- Johnson, R.A., Wichern, D.W., 1992. *Applied multivariate statistical analysis*. 3. ed. New Jersey : Prentice-Hall.

- Liang, Y.S., Coles, G.C., Doenhoff, M.J., Southgate, V.R., 2001. *In vitro* responses of Praziquantel-resistant and susceptible *Schistosoma mansoni* to praziquantel. *Inter. J. Parasitol* 31, 1227-1231.
- Pellegrino, J., Oliveira, C.A., Faria, J., Cunha, A.S., 1962. New approach to the screening of drugs in experimental *Schistosoma mansoni* in mice. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 11, 201-215.
- Pellegrino, J., Katz, N., 1968. Experimental chemotherapy of Schistosomiasis mansoni. *Adv. Parasitol* 6, 233-290.
- Pugh, R.N., Teesdale, C.H., 1983. Synergy of concurrent low dose of oxamniquine and praziquantel in schistosomiasis. *Br. Med. J.* 287, 877-878.
- Ramakrishnan, R., Jusko, W.J., 2001. Interactions of aspirin and salicylic acid with prednisolone for inhibition of lymphocyte proliferation. *Inter Immunophar.* 1, 2035- 2042.
- Shaw, J.R., Brammer, K.W., 1983. The treatment of experimental schistosomiasis with a combination of oxamniquine and praziquantel. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 77, 39-40.
- Streibig, J.C., Kudsk, P., Jensen, J.E., 1998. A general joint action model for herbicide Mixtures. *Pest. Sci.* 53, 21-28.
- Zwingenberger, K., Queiroz, J.A., Poggensee, V., Alencar, J.E., Valdeguas, J., Esmeralda, F., Feldmeier, H., 1987. Efficacy of oxamniquine, praziquantel and a combination of both drugs in schistosomiasis mansoni in Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo* 29, 305-311.

Table 1

Results obtained in mice experimentally infected with 100 ± 10 *Schistosoma mansoni* cercariae (LE strain), treated with 50 mg/kg oxamniquine (OXA), single dose, oral route, 45 days postinfection, 200 mg/kg praziquantel (PZQ), administered isolately or in association, and sacrificed 15 days after treatment

Drug	Treatment schedule mg/kg	Interval among treatments	Number of animals Treated/Examined		Mean worms	Worm distribution (%) Mesentery Liver		Liver dead worms (%)	Oogram changes (%)
OXA	50	-	14	8	6.9	49.1	50.9	43.6	75.0
PZQ	200	-	14	11	8.3	49.5	50.5	45.1	54.5
OXA+PZQ	50 + 200	simultaneous	14	12	12.8	0.0	100.0	100.0	100.0
OXA+PZQ	50 + 200	4 hours	14	13	10.2	0.0	100.0	100.0	100.0
OXA+PZQ	50 + 200	1 day	14	12	10.6	5.5	94.5	91.3	100.0
OXA+PZQ	50 + 200	5 days	14	8	8.3	20.0	80.0	77.3	100.0
Control	-	-	-	14	11.5	85.1	14.9	0.0	0.0

Table 2

Combination Index (I_{comb}) of praziquantel (PZQ) and oxamniquine (OXA) associations, assessed as from the required doses to obtain 50% worm mortality (ED_{50}), available by means of the response curves to the administered doses

Association	ED_{50} - praziquantel	ED_{50} - oxamniquine	I_{comb}
OXA 25 + PZQ 100	47	13	0.28
OXA 25 + PZQ 200	121	16	0.52
OXA 25 + PZQ 300	127	10	0.47
OXA 50 + PZQ 100	50	28	0.47
OXA 50 + PZQ 200	111	29	0.64
OXA 50 + PZQ 300	206	34	0.90
OXA 75 + PZQ 100	28	44	0.59
OXA 75 + PZQ 200	68	47	0.74
OXA 75 + PZQ 300	90	40	0.72
OXA 100 + PZQ 100	0	50	0.58
OXA 100 + PZQ 200	0	44	0.51
OXA 100 + PZQ 300	0	40	0.47

FIGURE 1

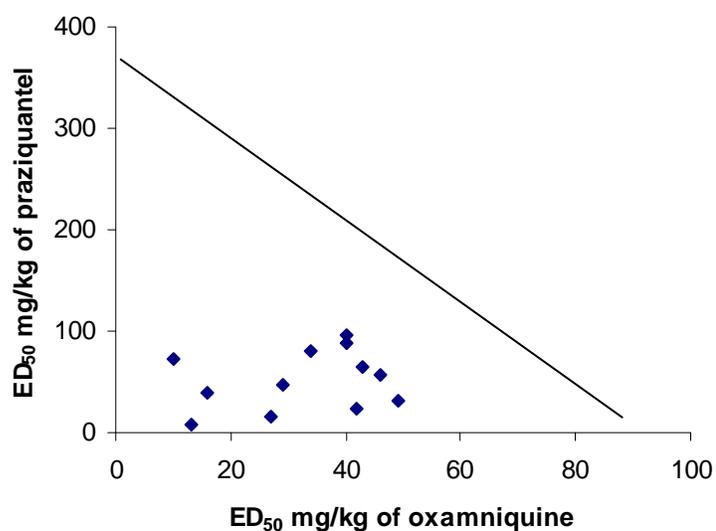


Figure 1 – Isobologram of the variable mortality with the values of the dose required to obtain 50% dead worms (ED_{50}), available as from the response curves to the doses of oxamniquine (OXA) and praziquantel (PZQ), given isolately or in association. The line A represents the additive curve (ED_{50}) of the drugs administered isolately. The points represents the results with the different doses of both drugs in association.

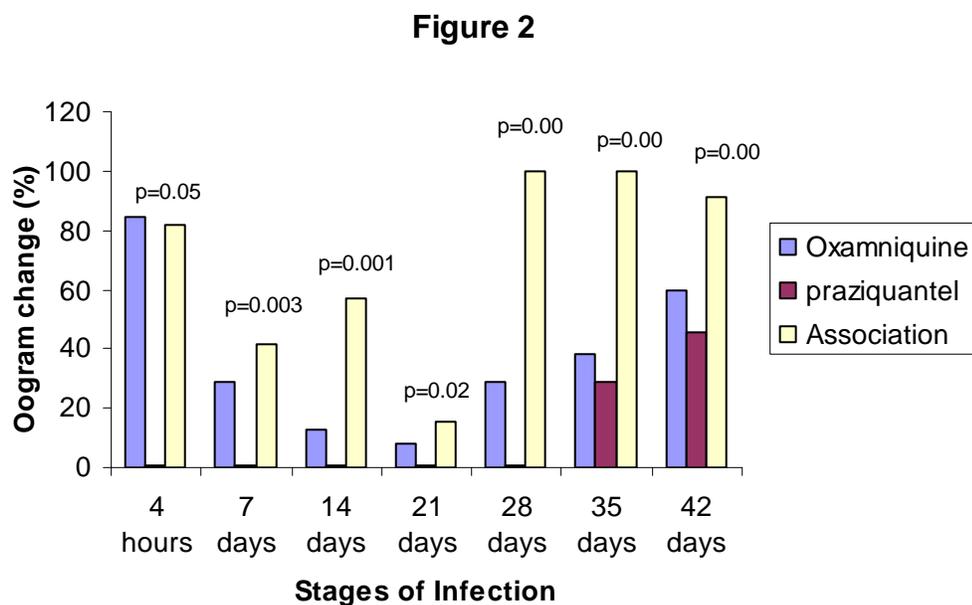


Figure 2 – Results of the oogram changes obtained in mice experimentally infected with 100 ± 10 *S. mansoni* cercariae, treated with 50 mg/kg oxamniquine (OXA); 200 mg/kg praziquantel (PZQ); OXA and PZQ in association (50 + 200 mg/kg) at different stages of infection. Animals were examined 45 days after infection

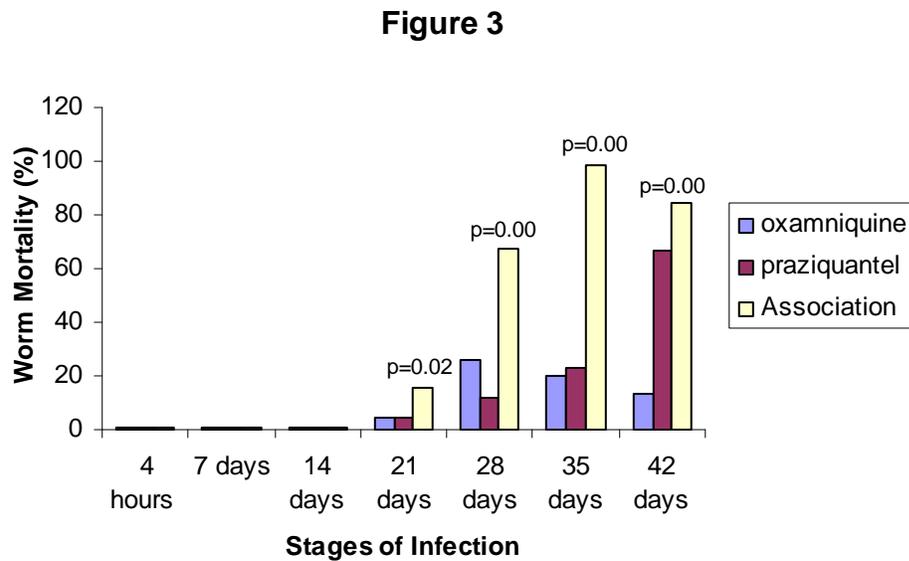


Figure 3 – Worm mortality rate detected in the liver of mice experimentally infected with 100 ± 10 *S. mansoni* cercariae, treated with 50 mg/kg oxamniquine (OXA) and 200 mg/kg praziquantel (PZQ); OXA-PZQ association (50 + 200 mg/kg), at different stages of infection. Animals were examined 45 days after infection

CONSIDERAÇÕES FINAIS

6 Considerações Finais

A esquistossomose, uma das parasitoses humanas mais difundidas no mundo, relaciona-se com a ausência ou precariedade de saneamento básico. Está entre as doenças de maior prevalência dentre aquelas veiculadas pela água. Estima-se que 200 milhões de pessoas no mundo sejam acometidos pela doença, que ocupa o segundo lugar em importância sócio-econômica. A estimativa é que no Brasil existam cerca de seis milhões de indivíduos infectados e 25 milhões expostos ao risco de contrair a doença. Porém considera-se que a real magnitude da esquistossomose não está completamente dimensionada no nosso país.

Controlar a transmissão da esquistossomose é primordial para a sua erradicação. Os programas de controle baseados unicamente na terapêutica da doença visam reduzir a morbidade, mas não interromper a transmissão. Para interromper a transmissão seria necessário o controle dos portadores da esquistossomose através da identificação e tratamento específico; o controle dos hospedeiros intermediários com medidas de saneamento ambiental, entre as quais: aterro de coleções hídricas, drenagem ou retificação de leitos d'água, canalização de coleções hídricas, limpeza e remoção da vegetação das coleções hídricas, controle de caramujos com moluscidas: recomendável para localidades com prevalência igual ou superior a 25%, quando as obras de engenharia sanitária não forem viáveis; implantação de sistemas de eliminação de dejetos e abastecimento de água. Educação para a saúde e mobilização comunitária devem preceder e acompanhar todas as atividades de controle, garantindo, dessa maneira, a modificação permanente das condições de transmissão.

Atualmente, dois são os fármacos usados para o tratamento da esquistossomose a oxamniquina e o praziquantel. Ambos apresentam boa eficácia e poucos efeitos colaterais, porém apresentam limitações como, baixa atividade na fase pré-patente da doença e falhas em tratamento devido, possivelmente à ocorrência de resistência ou tolerância a esses fármacos. Cabe ressaltar que o uso da oxamniquina diminuiu, especialmente devido ao maior custo do produto, tornando o praziquantel praticamente o único a ser utilizado. Considerando um número cada vez mais crescente de relatos de tolerância ou resistência ao praziquantel torna-se evidente a necessidade de pesquisas urgentes e efetivas na descoberta de novos agentes esquistossomicidas.

Nas últimas duas décadas cientistas têm tentado, com algum progresso, a caracterização de uma vacina contra a esquistossomose, mas um antígeno específico ainda não foi identificado. Todavia, devido á indisponibilidade de uma vacina a estratégia atual para o controle da doença ainda é a redução da morbidade em níveis individual e em massa usando fármacos seguros e eficazes

O desenvolvimento de novos medicamentos é, na maioria das vezes, um processo demorado e caro. Para que um princípio ativo seja transformado em medicamento, muitos passos devem ser seguidos: avaliações pré-clínicas (em animais), ensaios clínicos (em humanos), realizados em várias fases, e finalmente a autorização para liberação do medicamento pelas autoridades sanitárias. Sendo assim, para se chegar a um novo medicamento esquistossomicida são necessários pelo menos 10 anos, após o descobrimento da atividade. Nas últimas décadas não houve interesse das indústrias farmacêuticas em investir em pesquisas visando o descobrimento de novos agentes esquistossomicidas. Nesse contexto, a abordagem de se usar associação de medicamentos já caracterizados do ponto de vista farmacológico com princípios ativos estudados e com efeitos colaterais definidos, tem a vantagem de abreviar o tempo e o custo de desenvolvimento de um novo esquistossomicida.

A associação de medicamentos visa basicamente quatro objetivos: o efeito sinérgico entre os componentes da fórmula, quando um dos componentes reforça ou facilita a ação do outro, resultando em inquestionável benefício final; a antagonização dos efeitos colaterais específicos, o somatório de ações independentes para o mesmo fim terapêutico, e a multiplicidade de efeitos, aplicada através do uso conjunto de fármacos diferentes entre si para atender a diferentes aspectos de uma mesma doença.

Através das considerações finais da presente tese será feita a análise dos resultados em relação aos objetivos propostos e a resposta às questões científicas formuladas no corpo do trabalho.

6.1 Objetivos - Resultados e Análise.

Objetivo Geral – Avaliar a atividade terapêutica e/ou profilática de associação de fármacos na esquistossomose mansoni experimental.

Esse objetivo foi atingido considerando-se os resultados obtidos nos três artigos apresentados.

Nesses artigos, foram avaliadas estratégias terapêuticas, baseadas no uso de associação de medicamentos sabidamente esquistossomicidas com outros com atividade não totalmente esclarecida, com a finalidade de avaliar o potencial terapêutico das mesmas frente à esquistossomose mansonii experimental. No artigo 3, paralelamente à avaliação do potencial terapêutico, avaliou-se a ação profilática da oxamniquina, do praziquantel e da associação desses dois medicamentos quando os animais foram tratados 4 horas após a infecção com a finalidade de evitar que a doença se instalasse no organismo dos mesmos.

Primeiro objetivo específico - Investigar a eficácia da lovastatina contra vermes adultos de *S. mansonii*, quando administrada em monoterapia ou associada com oxamniquina ou praziquantel, em experimentos realizados *in vivo* e *in vitro*.

No Artigo 1, os experimentos *in vitro*, mostraram que a maturação dos ovos colocados pelas fêmeas que sofreram a ação da lovastatina não se completa, ao contrário daqueles postos pelas fêmeas do grupo controle, que passam por todos os estágios, completando o ciclo com o ovo maduro, culminando, inclusive, na eclosão do miracídio. O processo completo de maturação dos ovos também foi observado quando vermes tratados *in vivo* são cultivados *in vitro* na ausência de lovastatina, demonstrando assim, que a exposição dos vermes à lovastatina *in vitro* é responsável pelo bloqueio do desenvolvimento dos ovos. A lovastatina usada nos experimentos *in vivo* causou redução na postura de ovos pela fêmea do *S. mansonii*, observado através do estudo do oograma.

A associação da lovastatina com os dois fármacos esquistossomicidas – oxamniquina ou praziquantel – não apresentou ação sinérgica quando comparada com os dois agentes esquistossomicidas usados em monoterapia.

Os principais resultados obtidos foram:

Ausência de atividade esquistossomicida da lovastatina usada em monoterapia.

Ausência de sinergismo quando da associação da lovastatina com oxamniquina ou praziquantel.

A lovastatina, administrada *in vivo*, leva à redução da postura de ovos pela fêmea do *S. mansoni*.

Os vermes adultos do *S. mansoni* não são afetados pela lovastatina em experimentos *in vitro*.

Os ovos colocados pelas fêmeas que sofreram a ação da lovastatina em experimentos *in vitro* não atingem o estágio maduro.

A utilização de sondas fluorescentes (Sarvel *et al* 2006) aumenta a sensibilidade dos ensaios nos quais se pretende avaliar ação de fármacos sobre a postura dos vermes.

Segundo objetivo específico - Estudar a viabilidade de ovos de *S. mansoni* usando a sonda Hoechst 33258.

Ainda no Artigo 1, o estudo de viabilidade dos ovos mostrou diferença significativa quando foi usada a sonda fluorescente em relação à observação ao microscópio óptico. De fato, a média de ovos morfológicamente viáveis, marcados pela sonda fluorescente, foi de aproximadamente 70% nos grupos expostos a 2 ou 4 µg/ml de lovastatina. Já no grupo controle (vermes não expostos à ação do fármaco) foi observado que apenas 16% dos ovos morfológicamente viáveis estavam corados pela sonda. É importante frisar que a marcação dos ovos pela sonda fluorescente é um indicativo de ovo morto. Sendo assim, torna-se evidente a diferença na classificação dos ovos viáveis quando se usa a sonda fluorescente ou quando a morfologia dos ovos é observada em microscópio óptico. Quando aplicada em experimentos nos quais não se utiliza fármacos a metodologia recomendada por Sarvel *et al.* (2006) com o objetivo de confirmar a classificação morfológica tradicional (observação em microscópio óptico) mostra que há uma concordância de 83% entre a técnica de classificação morfológica tradicional (oograma) e aquela do uso da sonda Hoechst 33258. Todavia, nos experimentos com o objetivo de testar atividade de fármacos a concordância entre as duas técnicas foi muito menor (30%), isto é, somente 10 dos 35 ovos morfológicamente viáveis presentes nos grupos expostos a 2 ou 4 µg/ml de lovastatina não foram corados pela sonda fluorescente. Dessa maneira, foi possível validar a utilização da metodologia

proposta por Sarvel *et al* (2006) com vistas ao aumento da sensibilidade dos ensaios nos quais se pretende avaliar ação de drogas.

Os principais resultados obtidos foram:

A utilização da metodologia de Sarvel *et al* (2006) aumenta a sensibilidade dos ensaios nos quais se pretende avaliar ação de fármacos.

Terceiro objetivo específico - Avaliar a eficácia da associação do clonazepam usado em monoterapia ou em associação com oxamniquina ou praziquantel no tratamento da esquistossomose mansoni experimental.

O clonazepam não mostrou atividade esquistossomicida quando administrado, por via oral em doses crescentes atingindo a dose máxima de 25mg/kg, em camundongos infectados com cercárias de *S. mansoni* e a associação desse fármaco com a oxamniquina ou o praziquantel não se mostrou sinérgica quando comparada com os dois agentes esquistossomicidas usados em monoterapia.

Os principais resultados obtidos foram:

Ausência de atividade esquistossomicida do clonazepam usado em monoterapia.

Ausência de ação aditiva ou sinérgica nos esquemas de tratamento de associação do clonazepam com a oxamniquina ou o praziquantel.

Quarto objetivo específico - Avaliar a ação do clonazepam sobre o verme adulto de *S. mansoni* em estudos *in vitro*.

Como pode ser visto no Artigo 2 a exposição de vermes adultos de *S. mansoni* ao clonazepam *in vitro* provocou contração dos vermes com paralisia total já na primeira hora de contato dos vermes com o medicamento.

Os principais resultados obtidos foram:

O clonazepam, usado *in vitro*, produz paralisia e morte dos vermes adultos de *S. mansoni*.

Quinto objetivo específico – Avaliar, experimentalmente, a eficácia da associação oxamniquina-praziquantel administrada nos vários estágios da infecção por *S. mansoni*.

No Artigo 3 o efeito sinérgico da associação de oxamniquina e praziquantel sobre o verme adulto de *S. mansoni* pôde ser evidenciada através da construção do isobograma - modelo experimental de avaliação da atividade aditiva ou sinérgica de drogas - utilizado por Shaw e Brammer em 1983 e dos cálculos do índice de combinação mostrando que os dois métodos podem ser usados em experimentos com o objetivo de avaliar a interação entre dois medicamentos usados em associação.

Animais tratados com a associação oxamniquina-praziquantel apresentaram cura total (100% de vermes mortos e de alteração do oograma) quando os dois esquistossomicidas foram administrados simultaneamente ou quando o praziquantel foi administrado 4 horas após a administração da oxamniquina. Considerando que os efeitos colaterais da associação são raros, não muito graves e nem muito diferentes daqueles apresentados pelas drogas usadas em monoterapia, o ideal é o tratamento realizado simultaneamente, que não requer um tempo de espera ou a volta do paciente ao consultório para tomar o segundo medicamento.

Animais tratados com a associação oxamniquina-praziquantel ou com a oxamniquina em monoterapia, 4 horas após a infecção apresentaram 97% e 92% de redução no número de vermes em relação ao controle não tratado, respectivamente. Esses resultados mostram a eficácia do tratamento com oxamniquina na fase inicial da infecção.

Os principais resultados obtidos foram:

A associação oxamniquina-praziquantel se mostrou mais ativa do que cada um dos fármacos administrados em monoterapia.

O sinergismo entre oxamniquina e praziquantel persiste ainda que haja um intervalo de até 5 dias entre a administração dos dois fármacos.

A terceira semana pós infecção foi a mais crítica em relação ao tratamento, pois a oxamniquina, o praziquantel ou a associação entre os dois mostrou-se ineficaz nesse período da infecção.

A associação de oxamniquina-praziquantel, administrados simultaneamente, no período patente (42 dias após a infecção) mostrou ser o melhor esquema terapêutico.

A oxamniquina administrada em monoterapia, 4 horas após a infecção, reduz o número de vermes em 97%, em relação ao controle.

O praziquantel apresenta atividade quando administrado a partir do 28^a dia da infecção, isto é, esse fármaco não é ativo nas fases iniciais da infecção.

Como avanços, além dos objetivos alcançados, destaca-se:

A metodologia utilizada permitiu a padronização de protocolos de pesquisa para novos compostos com potencial terapêutico.

Os dois protocolos de ensaios, *in vitro* e *in vivo*, são ferramentas pois fornecem informações sobre a atividade e o modo de ação do fármaco. Mas, definitivamente, os experimentos *in vivo* não podem ser substituídos por aqueles *in vitro*.

As duas metodologias utilizadas - Construção do Isoblograma e Índice de Combinação - podem ser aplicadas na avaliação de atividade sinérgica quando da administração de dois fármacos ativos e também nos estudos de resistência aos fármacos.

Assim, os objetivos desse trabalho foram alcançados em sua totalidade, sustentados por meio de metodologias adequadas ao longo do desenvolvimento dessa tese com os resultados apresentados nos Artigos 1, 2 e 3.

Os conhecimentos produzidos a partir desse trabalho representam um passo a mais na busca de terapêuticas alternativas para a esquistossomose, porém torna-se necessário aprofundar o conhecimento dos mecanismos de associação de medicamentos.

Em síntese, os estudos de associação de fármacos devem ser continuados, com vistas a encontrar alternativas para o tratamento da esquistossomose, contribuindo, dessa forma, para o controle dessa importante doença endêmica.

6.2 Perspectivas

A partir dos resultados apresentados e mesmo que não tenha sido detectada ação sinérgica em todas as associações estudadas, comprova-se que a hipótese de associar medicamentos no intuito de melhorar o percentual de atividade ou obter novos compostos ativos é válida. Esta constatação é importante por abrir perspectivas para a busca de novas abordagens terapêuticas para a esquistossomose mansoni.

Além disso, a partir do trabalho apresentado percebe-se que os estudos *in vivo* e *in vitro* são complementares nos estudos de avaliação de atividade terapêutica, e o uso dos dois protocolos nos experimentos fornece informações mais detalhadas sobre o composto analisado.

Um avanço importante no presente trabalho foi a validação da metodologia proposta por Sarvel *et al* (2006), uma vez que o estudo da viabilidade dos ovos através do uso da sonda Hoechst 33258 fornece informações adicionais sobre a atividade dos fármacos, aumentando, dessa maneira, a sensibilidade dos ensaios de avaliação de atividade de fármacos.

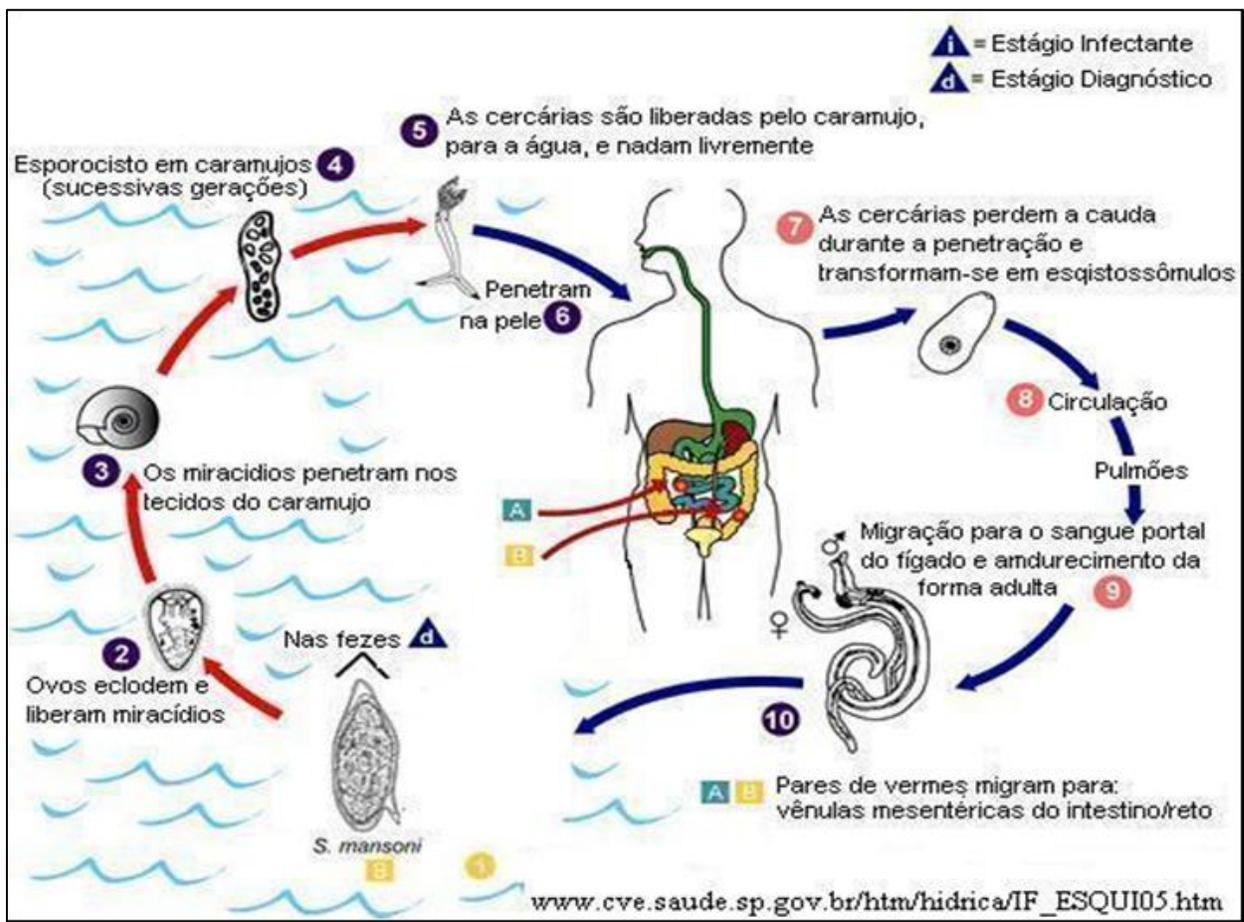
A utilização de duas metodologias para avaliar o tipo de interação entre os medicamentos em estudo – construção do Isoblograma e cálculos do Índice de Combinação – mostrou que esses métodos podem e devem ser utilizados para avaliar efeito sinérgico quando se usa dois fármacos em associação e também poderão ser ferramentas bastante úteis nos estudos onde se pretende avaliar resistência ao tratamento.

É importante que os estudos de associação de medicamentos continuem, na expectativa de se encontrar uma associação eficaz, que possa ser usada nos casos de resistência ao praziquantel.

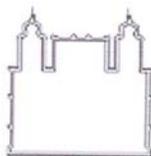
7 Anexos

7.1 Anexo 1 - Ciclo de vida do *Schistosoma mansoni*

CICLO DE VIDA DO *Schistosoma mansoni*



7.2 Anexo 2 – Certificado da licença CEUA



MINISTÉRIO DA SAÚDE / FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
VICE-PRESIDÊNCIA DE PESQUISA E DESENVOLVIMENTO TECNOLÓGICO
Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA-FIOCRUZ

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo intitulado :

" *Novas abordagens na terapêutica experimental da esquistossomose mansoni.* " número P-478/08, proposto por Neusa Araújo, foi licenciado pelo N° L-018/09.

Sua licença de N° L-018/09 autoriza o uso anual de :

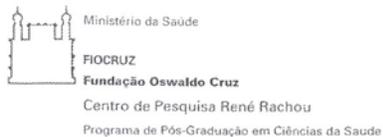
- 2000 *Mus musculus*

Esse protocolo está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi APROVADO pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA - FIOCRUZ). Na presente formatação, este projeto está licenciado e tem validade até 22 de janeiro de 2013.

Rio de Janeiro, 23/01/2009


Dra. Norma Vollmer Labarthe
Coordenadora da CEUA
FIOCRUZ

7.3 Anexo 3 – Exame de Qualificação



ATA DO EXAME DE QUALIFICAÇÃO - DOUTORADO

ALUNA: Neusa Araújo Pereira

ORIENTADOR: Dr. Naftale Katz

DATA/HORÁRIO/LOCAL: 29 de setembro de 2008, às 14 horas, na sala de aula do CPqRR.

BANCA

Dra. Andrea Teixeira de Carvalho

Dr. Marcos Pezzi Guimarães

ASSINATURAS

TÍTULO DO PROJETO: "Novas abordagens na terapêutica experimental da esquistossomose mansoni".

APROVADA APROVADA CONDICIONALMENTE REPROVADA

OBSERVAÇÕES:

REFERÊNCIAS BIBLIORÁFICAS

8 Referências Bibliográficas

- Abdel-Aziz SS, El-Badawi NM. Experimental trials of an artemisinin derivative in treatment of *Schistosoma mansoni* infected mice. J Egypt Soc Parasitol. 2000;30:295-303.
- Abdul-Ghani R, Loutfy N, El Sahn A, Hassan A. Current chemotherapy arsenal for schistosomiasis mansoni: alternatives and challenges. Parasitol Res. 2009;104:955-65.
- Abrantes W. Hipertensão portal – estado atual. Clin Bras Cir Col Bras Cir. 1995;2:121-36.
- Amaral RS, Tauil PL, Lima DD, Engels D. An analysis of the impact of Schistosomiasis Control Programme in Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2006;101:79-85.
- Andersen ML, D’Almeida Vânia, Gui Mi KO, Kawakami R, Martins PJF, Magalhães L, Tufik S. Princípios éticos e práticos do uso de animais de experimentação. São Paulo:CLR Balieiro; 2004.167p.
- Andrade ZA, Peixoto E, Guerret S, Grimaud JA. Hepatic connective tissue changes in hepatoesplenic schistosomiasis. Hum Pathol. 1992;23:566-73.
- Andrade ZA, Santana Filho D, Rebouças G. Patologia da esquistossomose avançada. Rev Inst Med Trop São Paulo. 1962;4:170-9.
- Andrade ZA, Santos HA, Boprojovic B, Grimaud JA. Lesões hepáticas produzidas por hycanthone. Rev Inst Med Trop São Paulo. 1974;16:160-70.
- Andrade ZA. The situation of hepatosplenic schistosomiasis in Brazil today. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1998;93:313-6.
- Andrews P, Thomas H, Pohlke R, Seubert J. Praziquantel. Med Res Reviews. 1983;3:147-200.
- Andrews P. A summary of the efficacy of praziquantel against schistosomes in animal experiments and notes on its mode of action. Drug Res. 1981;31:538-41.

Araújo N, Katz N, Dias EP, Souza CP. Susceptibility to chemotherapeutic agents of strains of *Schistosoma mansoni* isolated from treated and untreated patients. *Am J Trop Med Hyg.* 1980;29:890-4.

Araújo N, Kohn A, Katz N. Activity of the artemether in experimental schistosomiasis mansoni. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1991;86:185-88.

Araújo N, Kohn A, Katz N. Avaliação terapêutica do artesunato na infecção experimental pelo *Schistosoma mansoni*. *Rev Soc Bras Med Trop.* 1999;32:7-12.

Araújo N, Kohn A, Oliveira AA, Katz N. *Schistosoma mansoni*: ação da lovastatina no modelo murino. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2002;35:35-8.

Araújo N, Souza CP, Passos LKJ, Simpsons AJG, Neto E, Pereira TR, Cerutti JRC, Alencar FEC, Dietze R, Katz N. Suscetibilidade aos agentes quimioterápicos de isolados de *Schistosoma mansoni* oriundos de pacientes tratados com oxamniquina e praziquantel e não curados. *Rev Soc Bras Med Trop.* 1996;29:467-76.

Araújo N. Tentativa de obtenção de cepas de *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907 resistentes aos agentes quimioterápicos [Dissertação]. Belo Horizonte:Departamento de Parasitologia - Universidade Federal de Minas Gerais. 1978.

Archer S, Yarinsky A. Recent developments in the chemotherapy of schistosomiasis mansoni. In: Jucker E, editor. *Progress in Drug Research*. Basileia: Birkhauser Verlag; Basel 1972. P. 11-66.

Barbosa FS, Cruz OJ, Hollanda E, Siqueira SAV, Carvalho MAP, Gomes MI, Almeida AS. Modelo alternativo para o controle da esquistossomose: estado atual do projeto no Espírito Santo, Brasil. *Cad Saúde pública.* 1993;9:85-9.

Bassily S, Farid Z, Dunn M, El-Masry NA, Stek MJR. Praziquantel for treatment of schistosomiasis in patients with advanced splenomegaly. *Am J Trop Med Hyg.* 1985;79:629-34.

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

Bennett JL. Characteristics of antischistosomal benzodiazepine binding sites in *Schistosoma mansoni*. J Parasitol. 1980;66:742-7.

Berriman, M.; Haas, B.J.; LoVerde, P.T.; Wilson, R.A.; Dillon, G.P; Cerqueira, G.C.; Mashiyama, S.T.; Al-Lazikani, B.; Andrade, L.F.; Ashton, P.D.; Aslett, M.A.; Bartholomeu, D.C.; Blandin, G.; Caffrey, C.R.; Coghlan, A.; Coulson, R.; Day, T.A.; Delcher, A.; DeMarco, R.; Djikeng, A.; Eyre, T.; Gamble, J.A.; Ghedin, E.; Gu1, Y.; Hertz-Fowler, C.; Hirai, H.; Hirai, Y.; Houston, R.; Ivens, A.; Johnston, D.A.; Lacerda, D.; Macedo, C.D.; McVeigh, P.; Ning, A.; Oliveira, G.; Overington, J.P.; Parkhill, J.; Perteua, M.; Pierce, R.J.; Protasio, A.V.; Quail, M.A.; Rajandream, M.; Rogers, J.; Sajid, M.; Salzberg, S.L.; Stanke, M.; Tivey, A.R.; White, O.; Williams, D.L.; Wortman, J.; Wu, W.; Zamanian, M.; Zerlotini, A.; Fraser-Liggett, C.M.; Barrell, B.J.; El-Sayed, N.M. The genome of the blood fluke *Schistosoma mansoni*. Nature. 2009. 460: 352-358.

Bina JC, Spinola A. Convulsão associada ao uso de oxamniquina. Relato de um caso. Rev Soc Bras Med Trop. 1976;10:221-3.

Bina JC. Influência da terapêutica específica na evolução da esquistossomose mansoni. Rev Patol Trop. 1981;10:221-67.

Bina JC. Influência da terapêutica específica na evolução da esquistossomose. [dissertação]. Salvador:Universidade Federal da Bahia, Faculdade de Medicina. 1977.

Blair KL, Bennett JL, Pax RA. Praziquantel physiological evidence for its site(s) of action in magnesium-paralysed *Schistosoma mansoni*. Parasitol. 1992;104:59-66.

Bogliolo L. Sobre o quadro anatômico do fígado na forma hepato-esplênica da esquistossomose mansônica. Hospital. 1954;45:283-306.

Bonesso-Sabadini PIP, Dias LCS. Altered response of *Schistosoma mansoni* to oxamniquine and praziquantel. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2002;97:381-5.

Bormann S, Szlezák N, Faucher JF, Matsiegui PB, Neubauer R, Binder RK, Lell B, Kreamsner PG. Artesunate and praziquantel for the treatment of *Schistosoma haematobium* infections: a double-blind, randomized, placebo-controlled study. J Infect Dis. 2001;184:1363-6.

Botros S, Soliman A, El-Gawhary N, 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.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Análise da situação de Saúde. Situação da prevalência e controle das doenças transmissíveis no Brasil. In: _____. *Saúde Brasil 2004: uma análise da situação de saúde.* Brasília: MS, 2004. P. 326-8 (Série G. Estatística e Informação em Saúde). ISBN 85-334-0804-8. Biblioteca de Ciências Da Saúde Prof. Zigman Brener <http://netra.cpqrr.fiocruz.br/ph182/index.html>

Brindley PJ, Sher A. The chemotherapeutic effect of praziquantel against *Schistosoma mansoni* is dependent on host antibody response. *J Immunol.* 1987;39:215-20.

Bruckner DA, Schiller EL. Some biological characteristics of Liberian and Puerto Rican strains of *Schistosoma mansoni* *J Parasitol.* 1974;60:551-2.

Bueding E, Fisher J, Bruce J. The antischistosomal activity of chloroindazole analog of hycanthone in mice infected with *Schistosoma mansoni*. *Pharmacol Exp Ther.* 1973;186:402-7.

Campbell WC, Cuckler AC. Inhibition of egg production of *Schistosoma mansoni* in mice treated with nicarbazin. *J Parasitol.* 1967;53:977-80.

Campos R, Moreira AAB, Sette H Jr, Chamone DA, Silva LC. Hycanthone resistance in a human strain of *Schistosoma mansoni*. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1976;70:261-2.

Campos R, Pinto PLS, Amato Neto V, Moreira AAB. Tratamento da esquistossomose mansônica por meio da associação de oxamniquine com praziquantel. II – Observações experimentais relativas à fase patente. *Rev Hosp Clin Fac Med São Paulo.* 1989;44:111-4.

Campos R, Pinto PLS, Sant'ana EJ, Amato Neto V, Moreira AAB. Tratamento da esquistossomose mansônica por meio da associação de oxamniquine com praziquantel. I – Observações experimentais relativas à fase pré-patente. *Rev Hosp Clin Fac Med São Paulo.* 1987;42:201-3.

Campos R, Pinto PLS, Sant'ana EJ, Moreira AAB, Amato Neto V, Padilha LAA, Levai EV, Catalano CM. Esquistossomose clínica e terapêutica: a associação oxamniquina e praziquantel no tratamento da esquistossomose mansônica. In: XXI Congresso da Soc. Bras. Med. Trop. 1985;São Paulo.

Carvalho AS, Shikanai-Yasuda MA, Amato Neto V, Shiroma M, Lucas FJC. Neurotoxicidade do oxamniquina no tratamento da infecção humana pelo *Schistosoma mansoni*. Rev Inst Med Trop São Paulo. 1985;27:132-42.

Carvalho OS, Nunes IM, Caldeira RL. First report of *Biomphalaria glabrata* in the state of Rio Grande do Sul, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1998;93:39-40.

Charles HK, Mahmoud AAF. Drugs five years later. Praziquantel Ann Int Med. 1989;4:290-6.

Chen GZ, Foster L, Bennett JL. Antischistosomal action of mevinolin evidence that 3-hydroxy-methylglutaryl-coenzyme A reductase activity *Schistosoma mansoni* is vital for parasite survival. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol. 1990;342:477-82.

Chen DJ, Fu LF, Shao PP, Wu FZ, Fan CZ, Shu H, Ren CS, Sheng XL. Studies on antischistosomal activity of qinghaosu in experimental therapy. Zhong Hui Yi Xue Zha Zhi. 1980;80:422-8.

Chism WJ, Birch JB, Bingham SW. Non linear regressions for analysing growth stage and quincloraq interactions. Weed Technol. 1992;6:898-903.

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

Christophersen JB. The successful use of antimony in bilharziasis. Lancet.1918;2:325-7.

Cioli D, Botros SS, Francklow KW, Mbaye A, Southgate V, Tchuente TLA, Pica-Mattoccia L, Troiani AR, Seif el Din SH, Sabra AA, Albin J, Engels D, Doenhoff MJ. Determination of ED₅₀ values for praziquantel in praziquantel resistant and susceptible *Schistosoma mansoni* isolates. Int J Parasitol. 2004;34:979-87.

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

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

Cioli D, Pica Mattoccia L, Moroni R. *Schistosoma mansoni*: hycanthono/oxamniquine resistance is controlled by a single autosomal recessive gene. *Exp. Parasitol.* 1992; 75: 425 – 432.

Cioli D. Chemotherapy of schistosomiasis an update. *Parasitol Today.* 1998;14:418-422.

Cioli D. Praziquantel: is there real resistance and are there alternatives? *Curr Opin Infect Dis.* 2000;13:659-63.

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

Coelho PMZ, Mello RT, Gerken SE. *Schistosoma mansoni*: evaluation of the activity of oxamniquine on schistosomules, at 24 hour after infection. *Rev Inst Med Trop São Paulo.* 1993;35:557-67.

Coelho PMZ, Ribeiro F, Mello RT, Lima e Silva FC, Nogueira-Machado JA. Activity of oxamniquine at 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.

Coles CG, Mutihi WT, Kinoti GK, Bruce JI, Katz N. Tolerance of Kenyan *Schistosoma mansoni* to oxamniquine. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1987;81:782-5.

Coles GC, Bruce JI, Kinoti GK, Mutahi WT, Dias EP, Katz N. Drug resistance in schistosomiasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1986;80:347.

Conceição MJ, Argento CA, Corrêa A. Study of *Schistosoma mansoni* isolates from patients with failure of treatment with oxamniquine. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2000;95:375-8.

Conselho de Desenvolvimento Nacional. PECE: Programa Especial de Controle da Esquistossomose no Brasil, Brasília. s.n. 1976; p.41.

Costa MFL. Estudo clínico-epidemiológico da esquistossomose mansoni em Comercinho, MG (1974/1981). [Tese]. Belo Horizonte:Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.1983.

Coura JR, Queiroz GC, Florêncio CG, Argento CA, Coutinho SG, Figueiredo N, Wanke B, Camillo-Coura L. Morbidade da esquistossomose mansoni no Brasil, estudo de 4.652 casos observados no Rio de Janeiro de 1960 a 1976. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1982;77:69-88.

Creasey AM, Taylor P, Thomas JE. Dosage trial of a combination of oxamniquine and praziquantel in the treatment of schistosomiasis in Zimbabwean schoolchildren. Cent Afr J Med. 1986;32:165-7.

Cury GC. Estudo clínico-epidemiológico da esquistossomose mansoni em Comercinho, MG (1974, 1981 e 1988). [Tese]. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. 1991.

Danso-Appiah A, De Vlas SJ. Interpreting low praziquantel cure rates of *Schistosoma mansoni* infections in Senegal. Trends Parasitol. 2002;18:125-9.

Davies P, Jackson H. Experimental studies on the chemosterilization of *Schistosoma mansoni*. Parasitol. 1970;61:167-176.

Davis A, Wegner DH. Multicentre trials of praziquantel in human schistosomiasis: design and techniques. Bull World Health Organ. 1979;57:767-71.

De Clercq D, Vercruysse J, Vertlé P, Kongs A, Diop M. What is the effect of combining artesunate and praziquantel in the treatment of *Schistosoma mansoni* infections? Trop Med Int Health. 2000;5:744-6.

Delgado VS, Suarez DP, Cesari IM, Incani M. Experimental chemotherapy of *Schistosoma mansoni* with praziquantel and oxamniquine: differential effect of single or combined formulations of drugs on various strains and on both sexes of the parasite. Parasitol Res. 1992;78:648-54.

- Dias CB. Quimioterapia antimonial na esquistossomose mansônica. [Tese]. Belo Horizonte: Universidade de Minas Gerais. Faculdade de Medicina. 1949.
- Dias LCS, Bruce JI, Coles GC. Variation in response of *Schistosoma mansoni* strains to schistosomicides. Rev Inst Med Trop São Paulo. 1988;3:81-5.
- Dias LCS, Pedro RJ, Deberaldini ER. Use of praziquantel in patients with schistosomiasis mansoni previously treated with oxamniquine and/or hycanthone: resistance of *Schistosoma mansoni* to schistosomal agents. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1982;76:652-9.
- Dias LCS, Pedro RJ, Rigo E, Goto MM, Mafra GL. Linhagem humana de *Schistosoma mansoni* resistente a esquistossomicidas. Rev Saúde Pública. 1978;12:110.
- Diekmann HW, Schneidereit M, Overbosch D. Inhibitory effects of cimetidine, ketoconazole and miconazole on the metabolism of praziquantel. Acta Leiden. 1989;57:217-228.
- Dietze R, Prata A. Baixa eficácia da associação oxamniquine e praziquantel na cura da esquistossomose mansônica. Rev. Soc Bras Med Trop. 1986;19:247-9.
- Doenhoff MJ, Kussel JR, Coles GC, Cioli D. Resistance of *Schistosoma mansoni* to praziquantel: is there a problem? Trans R Soc Trop Med Hyg. 2002;96:465-9.
- Domingues ALC, Coutinho A. Tratamento da esquistossomose mansônica com oxamniquina oral. Rev Inst Med Trop São Paulo. 1975;17:164-80
- Drescher KM, Rogers EJ, Bruce JI, Katz N, Dias LCS, Coles GC. Response of drug resistant isolates of *Schistosoma mansoni* to antischistosomal agents. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1993;88:89-95.
- Ebeid FA, Metwally A, Botros SS, Bennett JL. Treatment of experimental schistosomiasis mansoni with praziquantel alone and combined with cimetidine. Arzneimittelforsch Drug Res. 1994;44:1268-70.
- El Guiniady MA, El Touny MA, Abdel-Bary MA, Abdel-Fatah SA, Metwally A. Clinical and pharmacokinetic study of praziquantel in Egyptian schistosomiasis patients with or without liver cell failure. Am J Trop Med Hyg. 1994;51:809-18.

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, Katz N, Coelho PMZ. A case of *Schistosoma mansoni* infection treated during the prepatent period. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol*. 2008;5:112-5.

Fallon PG, Cooper RO, Probert AJ, Doenhoff MJ. Immune-dependent chemotherapy of schistosomiasis. *Parasitol*. 1992; 05:S41-2.

Fallon PG, Doenhoff MJ. Drug resistant schistosomiasis: resistance to praziquantel and oxamniquine induce in *Schistosoma mansoni* in mice is drug specific. *Am J Trop Med Hyg*. 1994;51:83-8.

Fallon PG, Fookes RE, Wharton GA. Temporal differences in praziquantel-and oxamniquine-induced tegumental damage to adult *Schistosoma mansoni*: implications for drug antibody synergy. *Parasitol*. 1996;112:47-58.

Fallon PG, Sturrock RF, Capron A, Niang M, Deonhoff MJ. Short report: diminished susceptibility to praziquantel in a Senegal isolate of *Schistosoma mansoni*. *Am J Trop Med Hyg*. 1995;53:61-23.

Fallon PG, Tao LF, Ismail MM, Bennett JL. Schistosome resistance to praziquantel: fact or artifact. *Parasitol Today* 1996;12:316-20.

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

Farid Z, Mansour N, Kamal K, Girgis N, Woody J, Kamal M. The diagnosis and treatment of acute toxæmic schistosomiasis in children. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1987;81:959.

Farinazzo RJM, Siqueira-Batista R, Lopes F, Ramos Junior AM, Quintas LEM, Corrêa AD. Bases patológicas da esquistossomose mansoni. *Arq Bras Med*. 1997;71:107-10.

Farooq M, Nielsen J, Samaam AS, Mallah MB, Allam AA. The epidemiology of *Schistosoma mansoni* infections in the Egypt-49 Project Área. 3 - Prevalence of

bilharziasis in relation to certain environmental factors. Bull World Health Organ. 1966;35:319-30.

Fenwick A, Rollinson D, Southgate V. Implementation of human schistosomiasis control: challenges and prospects. Adv Parasitol.2006;61:567-622.

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

Ferraz AAB, Lopes EPA, Araújo Jr GC, Lima BA, Cantarelli F, Ferraz EM. Varizes de fundo gástrico na hipertensão portal esquistossomótica: resultados cirúrgicos. Rev Col Bras Cir. 2003;30:21-8.

Ferraz AAB, Silveira MJ, Coelho ARB, Câmara-Neto RD, Araújo Jr GC, Ferraz EM. Surgical treatment of schistosomal portal hypertension. Int Surg. 2001;86:1-8.

Fonseca CT, Cunha-Neto E, Goldberg AC, Kalil J, Jesus AR, Carvalho EM, Correa-Oliveira R, Oliveira SC. Human T cell epitope mapping of the *Schistosoma mansoni* 14kDa fatty acid-binding protein using cells from patients living in áreas endemic for schistosomiasis. Microbes Infect. 2005;7:204-12.

Foster R. A review of clinical experience with oxamniquine. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1987;81:55-9.

Foster R. The preliminar development of oxamniquine. Rev Inst Med Trop São Paulo. 1973;15:1-9.

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

Frézard F, Melo AL. Evaluation of the schistosomicidal efficacy of liposome-entrapped oxamniquina. Rev Inst Med Trop São Paulo.1997;39:91-100.

Frohberg H. Results of toxicological studies on praziquantel. Arzneimittelforschung 1984;34:1137-44.

Frohberg H. The toxicological profile of praziquantel in comparison to other anthelmintics drugs. *Acta Leiden*. 1989;57:201-15.

Giboda M, Smith JM, Prichard RK. Reduction in tissue egg load and maintenance of resistance to challenge in mice infected with *Schistosoma mansoni*, following combined treatment with praziquantel and an antifibrotic agent. *Ann Trop Med Parasitol*. 1994;88:385-95.

Giles HM, Zaki AAA, Soussa MhH Samaam SA, Soliman SS, Hassan A, Barbosa FS. Results of a seven year control project on the endemicity of *Schistosoma haematobium* infection in Egypt. *Ann Trop Med Parasitol*. 1973;67:45-65.

Gonnert R, Andrews P. Praziquantel, a new broad-spectrum antischistosomal agent. *Z parasitkd*. 1977;52:129-50.

Gonnert R, Vogel H. Dependence on host and parasite strain of the successful therapy of experimental schistosomiasis. *Z Tropenmed Parasitol*. 1955;6:193-8.

Graeff-Teixeira C, Anjos CB, Oliveira VC, Velloso CFP, Fonseca MBF, Valar C, Moraes C, Garrido CT, Amaral RS. Identification of a transmission focus of *Schistosoma mansoni* in the Southernmost Brazilian state, Rio Grande do Sul. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1999;94:9-10.

Graeff-Teixeira C, Valar C, Moraes CK, Salvany AM, Brum CO, Maurer RL, Ben R, Mardini L, Jobim MB, Amaral RS. The initial epidemiological studies in the low endemicity schistosomiasis area in Esteio, Rio Grande do Sul, the southernmost Brazilian state, 1977 to 2000. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2004;99:73-8.

Greenberg RM. Are Ca²⁺ channels targets of praziquantel action? *Int Parasitol*. 2005;35:9.

Gryschek RCB, Carvalho SA, Amato Neto V. Eficácia e tolerabilidade da associação oxamniquine com praziquantel no tratamento da infecção humana por *Schistosoma mansoni*. *Rev Bras Med*. 2004;2:168-70.

Gryseels B, Mbaye A, De Vlas SJ, Stelma FF, Guisse F, Van Lieshout L, Faye D, Diop M, Ly A, Tchum-Tchunte LA, Engels D, Polman K. Are poor responses to praziquantel

for the treatment of *Schistosoma mansoni* infections in Senegal due to resistance? An overview of the evidence. *Trop Med Int Health*. 2001;6:864-73.

Gryseels B, Polman K, Clerinx J. Human schistosomiasis. *Lancet*. 2006;368:1106-18.

Gryseels B, Stelma FF, Talla I, Van Dam GJ, Polman K, Sow S, Diaw M, Sturrock RF, Doehring-Schwerdtfeger E, Kardoff R, Decam C, Niang M, Deelder AM. Epidemiology, immunology and chemotherapy of *Schistosoma mansoni* infections in a recently exposed community in Senegal. *Trop Geogr Med*. 1994;46

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

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

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

Hotez PJ, Fenwick A. Schistosomiasis in Africa: an emerging tragedy in our new global health decade. *PLoS Negl Trop Dis*. 2009;3:e485.

Hotez PJ, Molyneux DH, Fenwick A, Ottessen E, Ehrlich Sachs S, Sachs JD. Incorporating a rapid-impact package for neglected tropical disease with programs for HIV/AIDS, tuberculosis and malaria. *PLoS Med*. 2006;3:102.

Hsu SYL, Chu KY, Hsu HF. Drug susceptibility of geographic strains of a *Schistosoma japonicum*. *Ztschr Tropenmed u Parasit Stuttgart*. 1963;14:37-40.

Ishizak T, Karno E, Boehme K. Double-blind studies on tolerance to praziquantel in Japanese patients with *Schistosoma japonicum* infections. *Bull World Health Organ*. 1979;57:787-91.

Ismail M, Botros S, Metwally A, William S, Fraghally A, Tao LF, Day TA, Bennett JL. Resistance to praziquantel: direct evidence from *Schistosoma mansoni* isolated from Egyptian villagers. *Am J Trop Med Hyg*. 1999;60:932-5.

Ismail M, Metwally A, Farghally A, Bruce J, Tao LF, Bennett JL. Characterization of isolates of *Schistosoma mansoni* from Egyptian villagers that tolerate highly doses of praziquantel. Am J Trop Med Hyg. 1996;55:214-8.

Jansen G. Profilaxia experimental da esquistossomose de Manson. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1946;44:549-78.

Jansma WB, Rogers SH, Liu CL, Bueding E. Experimentally Produced Resistance of *Schistosoma mansoni* to hycanthone. Am J Trop Med Hyg. 1977;26:926-36.

Jung H, Medina R, Castro N, Corona T, Sotelo J. Pharmacokinetic study of praziquantel administered alone and in combination with cimetidine in a single-day therapeutic regimen. Antimicrob Agents Chemother. 1997;41:1256-9.

Jung H. Topology and function of the Na⁺/proline transporter of *Escherichia coli*, a member of the Na⁺/solute cotransporter family. Biochim Biophys Acta. 1998;1365:60-4.

Katz N, Almeida K. Esquistossomose, xistosa, barriga d'água. Cienc Cult. 2003;55:38-43.

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;14:397-400.

Katz N, Dias EP, Araujo N, Souza CP. Estudo de uma cepa humana de *Schistosoma mansoni* resistente a agentes esquistossomicidas. Rev Soc Bras Med Trop. 1973;7:381-7.

Katz N, Grimbaum E, Chaves A, Zicker F, Pellegrino J. Clinical trials with oxamniquine by oral route in schistosomiasis mansoni. Rev Inst Med Trop São Paulo. 1976;18:371-7.

Katz N, Peixoto SV. Análise crítica da estimativa do número de portadores de esquistossomose mansoni no Brasil. Rev Soc Bras Med Trop. 2000;33:303-8.

Katz N, Rocha RS, Chaves A. Preliminary trials with praziquantel in human infections due to *Schistosoma mansoni*. Bull World Health Organ. 1979;57:781-5.

Katz N, Rocha RS, Souza CP, Coura Filho P, Bruce JI, Coles GC, Kinoti GK. Efficacy of alternating therapy with oxamniquine and praziquantel to treat *Schistosoma mansoni* in children following failure of first treatment. *Am J Trop Med Hyg.* 1991;44:509-12.

Katz N. Chemotherapy of schistosomiasis mansoni. *Adv Pharmacol Chemother.* 1977.14:1-70.

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

Katz N. Schistosomiasis control in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1998;93:33-35.

Katz N. Schistosomiasis vaccines: the need for more research before clinical trials. *Parasitol Today.* 1999;15:65-6.

Katz N. Terapêutica experimental e clínica na esquistossomose mansoni. In: Carvalho, OS (Org.); Coelho, PMZ (Org.); Lenzi, HL (Org.). *Schistosoma mansoni e esquistossomose: uma visão multidisciplinar.* Rio de Janeiro: Ed. FIOCRUZ; 2008.1123p. capa dura, 26cm. ISBN 978-857541-150-6. Boblooteca de Ciências da Saúde Prof. Zigman Brener <http://netra.cpqrr.fiocruz.br/ph182/index.html>

Katz N. Terapêutica Experimental e clínica na esquistossomose. Belo Horizonte: S.N, 2005. 79p. il. Tese (Doutorado em Ciências da Saúde – Doenças Infecciosas e Parasitárias) – Ministério da Saúde. Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisa René Rachou, Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde. Disponível em http://www.cpqrr.fiocruz.br/texto-completo/t_17.pdf Acesso em: 15 jan 2010. Biblioteca de Ciências da Saúde Prof. Zigman Brener. <http://netra.cpqrr.fiocruz.br/ph182/ondex.html>

Katz N. The discovery of Schistosomiasis mansoni in Brazil. *Acta Trop.* 2008;108:69-71.

Kaye B. Clinical experiences with and pharmacokinetics of oxamniquina. *Adv Pharmacol Ther.* 1978;10:41-7.

King CH, Mahmoud AAF. Drugs five years later; praziquantel. *Ann Int Med.* 1989;110:290-6.

King HC, Dickman K, Tisch DJ. Reassessment of the cost of chronic helminthic infection: a meta-analysis of disability-related outcomes in endemic schistosomiasis. *Lancet*. 2005;365:1561-69.

Kinoti GR. The significance of variation in the susceptibility of *Schistosoma mansoni* to the antischistosomal drug oxamniquine. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1987;82:151-6.

Klayman DL. Qinghaosu (Artemisinin): an antimalarial drug from China. *Science*. 1985; 228:1049-55.

Kloetzel K, Kloetzel J. A síndrome hepatoesplênica na esquistossomose mansônica: considerações sobre uma série de 119 casos. *Rev Bras Med*. 1958;15:178.

Kloetzel K. A rationale for the treatment of schistosomiasis mansoni even when reinfection expected. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1967;61:609-10.

Kloetzel K. A suggestion for the prevention of severe clinical forms of schistosomiasis mansoni. *Bull World Health Organ*. 1967;37:686.

Kloetzel K. Aspectos epidemiológicos da esquistossomose mansônica em uma população de Pernambuco. Suas correlações clínicas. [Tese] São Paulo: Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina; 1962.

Klos H, David R. The paleoepidemiology of schistosomiasis in ancient Egypt. *Hum Ecol Rev*. 2002;9:14-25.

Kohn A, Serapião CJ, Katz N, Dias EP. Ação da oxamniquine sobre o *Schistosoma mansoni* em camundongos experimentalmente infectados. *Rev Inst Med Trop São Paulo*. 1979;21:217-27.

Kohn AB, Roberts-Misterly JM, Anderson PAV, Khan N, Greenberg RM. Specific sites in the beta interaction domain of a schistosome Ca²⁺ channel beta subunit are key to its role in sensitivity to the anti-schistosomal drug praziquantel. *Parasitol*. 2003;127:349-56.

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

Krajden S, Keystone JS, Glenn C. Safety and toxicity of oxamniquina in the treatment of *Schistosoma mansoni* infections, with particular reference to electroencephalographic abnormalities. *Am J Trop Med Hyg.* 1983;32:1344-6.

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

Lage RCG. O efeito da pressão seletiva com praziquantel na diversidade genética da cepa LE de *Schistosoma mansoni*. [Dissertação]. Ouro Preto: Universidade Federal de Ouro Preto. 2005.

Lambertucci JR, Rayes AAM, Serufo JC, Gerspacher-Lara R, Brasileiro Filho G, Teixeira R, Antunes CMF, Góes AM, Coelho PMZ. Schistosomiasis and associated infections. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1998;93:135-9.

Lambertucci JR. Acute schistosomiasis: clinical diagnostic and therapeutic features. *Rev Inst Med Trop São Paulo.* 1985;35:399.

Le W, You J, Mei J. Chemotherapeutic effect of artesunate in experimental schistosomiasis. *Acta Pharm Sin.* 1983;18:619-21.

Le W, You J, Yang Y. Studies on the efficacy of artemether in experimental schistosomiasis. *Acta Pharm Sin.* 1982;17:187-93.

Lee HG, Cheer AW, Fairweather WR. Influence of parasite strain on chemotherapy of murine infections with *Schistosoma mansoni*. *Bull World Health Organ.* 1971;45:147-55.

Leite CC, Monteiro LM. Efeitos contraturantes do clonazepam e 3-metilclonazepam em *Schistosoma mansoni* adultos e sua relação com sítios de ligação benzodiazepínicos. In: XXIX Jornada Giulio Massarani de Iniciação Científica e Cultural da Universidade Federal do Rio de Janeiro:2007; Rio de Janeiro. p. 435.

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

Lima e Costa MF, Guerra HL, Pimenta-Júnior FG, Firmo JO, Uchoa E. Avaliação do programa de controle da esquistossomose (PCE/PCDEN) em municípios situados na Bacia do Rio São Francisco, Minas Gerais, Brasil. Rev Soc Bras Med Trop. 1996;29:117-26.

Liu YH, Qian MX, Wang XG, Jia J, Wang QN, Jiang YF, Wang RQ, Yan SW, Chen BY, Li JS, Qiu ZY, Shen JK. Comparative efficacy of praziquantel and its optical isomers in experimental therapy of schistosomiasis japonica in rabbits. Clin Med J. 1986;99:935-40.

LoVerde PT, Hirai H, Merrick JM, Lee NH, El-Sayed N. *Schistosoma mansoni* genome project: an update. Parasitol Int. 2004;53:183-92.

Maciel H. Contribuição ao estudo da distribuição geográfica da esquistossomose intestinal no Brasil. Sciencia Medica. 1929;7:514-6.

Mandour MLM, El Turbai H, Homeida MM, Sadig T, Ali HM, Bennett JL, Leahley WJ, Hassan DW. Pharmacokinetics of praziquantel in healthy volunteers and patients with schistosomiasis. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1990;84:389-93.

Matsumoto J. Adverse effects of praziquantel treatment of *Schistosoma japonicum* infection: involvement of host anaphylactic reactions induced by parasite antigen release. Int J Parasitol. 2002;32:461-71.

Melhorn H, Becker B, Andrews P, Thomas H, Frenkel JK. *In vivo* and *in vitro* experiments on the effects of praziquantel on *Schistosoma mansoni*. Arzneimittelforschung. 1981;31:544-54.

Metwally A, Bennett J, Botros S, Ebeid F, El-Attar GDM. Impact of drug dosage and brand bioavailability and efficacy of praziquantel. Pharmacol Res. 1995;31:53-9.

Neves RH. Avaliação do papel da dieta rica em colesterol na esquistossomose mansônica experimental de *Mus musculus* Swiss Webster. [Tese]. Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz. 2006.

Nies AS, Spielberg SE. Principles of Therapeutics. In: Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics. 9th ed. New York: Mc Graw-Hill;1996. P. 43-62.

Noel F, Mendonça-Silva DL, Thibaut JP, Lopes DV. Characterization of two classes of benzodiazepine binding sites in *Schistosoma mansoni*. *Parasitol.* 2007;22:1-10.

Okumura-Noji K, Sasai K, Zhan R, Kawaguchi H, Maruyama H, Tada T, Takahashi H, Okasaki M, Miida T, Sakuma N, Kimura G, Ohta N, Yokoyama H. Cholesteryl Ester transfer protein deficiency causes slow egg embryonation of *Schistosoma japonicum*. *Biochim Biophys Res Com.* 2001;286:305-10.

Olds GR, King C, Hewlitt J, Olveda R, Wu G, Ouma J, Petters P, McGarvey S, Odhiambo O, Koesch D, Liu CY, Aligui G, Gachichi G, Kombe Y, Parraga I, Ramirez B, Whalen C, Horton RJ, Reeve P. Double-blind placebo-controlled study of concurrent administration of albendazole and praziquantel in schoolchildren with schistosomiasis and geohelminths. *J Infect Dis.* 1999;79:996-1003.

Olds GR. Administration of praziquantel to pregnant and lactating women. *Acta Trop.* 2003;86:185-95.

Oliveira Fabrícia Alvisi de. Avaliação do efeito do praziquantel, da oxamniquina e da associação destas drogas sobre o verme adulto de *Schistosoma mansoni*. [Dissertação]. Belo Horizonte: s.n. (Mestrado em Ciências da Saúde - Doenças Infecciosas e Parasitárias)-Ministério da Saúde. Fundação Oswaldo Cruz. Centro de Pesquisas René Rachou. Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, 2005. Disponível em: http://www.cpqrr.fiocruz.br/texto-completo/D_39.pdf . Acesso em: 15 dez. 2009.

Pará M. Dados estatísticos de viscerotomia sobre doenças e condições mórbidas do homem no Brasil. I. Schistosoma mansônica no período de 1937-1946. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1949;47:443-519.

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

Pedro RJ, Dias LCS, Amato Neto V, Carvalho AS. Observations of the treatment of mansoni schistosomiasis with oxamniquine efficacy in children and in persistent

salmonellosis, resistance of a strain of *Schistosoma mansoni*, hepatic toxicity and neurological side effects. Rev Inst Med Trop São Paulo. 1980;22:32-6.

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;15:10-4.

Pellegrino J, Katz N, Dias EP. Experimental chemotherapy of schistosomiasis. VI – Egg suppressive activity of thiosamine. Rev Bras Pesq Med. 1972;5:43-5.

Pellegrino J, Katz N. Experimental chemotherapy of schistosomiasis. X – diaminophenylsulfone (DDS) in experimental schistosomiasis. Rev Inst Med Trop São Paulo. 1975;17:199-205.

Pellegrino J, Katz N. Experimental chemotherapy of schistosomiasis mansoni. Adv Parasitol. 1968;6:233-90.

Pellegrino J, Katz N. Experimental chemotherapy of schistosomiasis. IV – Oogram studies with nicarbazin, an egg-suppressive agent. Rev Inst Med Trop São Paulo. 1969;11:214-21.

Pellegrino J, Lima Costa FF, Antunes CM, Mello RT. Experimental chemotherapy of schistosomiasis mansoni. XIII. Activity of praziquantel, an isoquinoline-pyrazino derivative, on mice, hamsters and *Cebus* monkeys. Z Parasitenkd. 1977;52:151-68.

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

Pellegrino J, Oliveira CA, Faria J, Cunha AS. New approach to the screening of drugs in experimental *Schistosoma mansoni* in mice. Am J Trop Med Hyg. 1962;11:201-15.

Pereira C, Fallon PG, Comette J, Capron A, Doenhoff MJ, Pierce RJ. Alterations in cytochrome-c-oxidase expression between praziquantel-resistant and susceptible strains of *Schistosoma mansoni*. Parasitol. 1998;117:63-73.

Pica-Mattoccia L, Cioli D, Archer S. Binding of oxamniquine to the DNA of schistosomes. Trans R Trop Med Hyg. 1989;83:373-6.

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

Pica-Mattoccia L, Dias LCD, Moroni R, Cioli D. *Schistosoma mansoni*: genetic complementation analysis shows that two independent hycanthone/oxamniquine-resistant strains are mutated in the same gene. *Exp Parasitol.* 1993;77:445-9.

Pica-Mattoccia L, Ruppel A, Xiao CM, Cioli D. Praziquantel and the benzodiazepines RO 11-3128 do not compete for the same binding sites in schistosomes. *Parasitol.* 2008;135:47-54.

Picquet M, Vercruyse J, Shaw DJ, Diop M, Ly A. Efficacy of praziquantel against *Schistosoma mansoni* in northern Senegal. *Trans R Soc Med Hyg.* 1998;92:90-3.

Pirajá da Silva MA. Contribuição para o estudo da Schistosomíase na Bahia. *Braz Med.* 1908a;22:281.

Pirajá da Silva MA. Contribuição para o estudo da Schistosomíase na Bahia. Dezesesseis observações. *Braz Med.* 1908b;22:441-4.

Pirajá da Silva MA. Contribuição para o estudo da Schistosomíase na Bahia. Vinte observações. *Braz Med.* 1908c;22:451-4.

Pirajá da Silva MA. Contribution to the study of schistosomiasis in Bahia, Brazil. *J Trop Med Hyg.* 1909;12:159-64.

Polderman AM, Gryseels B, Ceroid JL, Kayitshonga M, Manshande JP. Side effects of praziquantel in the treatment of *Schistosoma mansoni* in Maniema, Zaire. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1984;78:752-4.

Prata A, Lauria L, Figueiredo JFM, Senna PG. Tratamento da esquistossomose pela oxamniquina em dose única. *Rev Bras Med Trop.* 1975;110:127-36.

Prata A. Esquistossomose mansoni. In: Veronesi R, Focaccia R. *Tratado de Infectologia.* São Paulo: Atheneu; 1997. P.1354-72.

Pugh RN, Teesdale CH. Synergy of concurrent low dose of oxamniquine and praziquantel in schistosomiasis. *Br Med J.* 1983;287:877-8.

Ramakrishnan R, Jusko WJ. Interactions of aspirin and salicylic acid with prednisolone for inhibition of lymphocyte proliferation. *Inter Immunophar.* 2001;1:2035-42.

Ray WA, Holden HE, Ellis JH, Hyneck ML. A comparative study of the genetic effects of hhycanthone and oxamniquina. *J Toxicol Environ Hlth.* 1975;1:211-27.

Rebello MLP. Aplicação do estudo de polimorfismos de cromossoma Y em genética forense Y-STRS e marcadores bialélicos. [monografia]. Universidade do Porto.2003.

Resendes APC, Souza-Santos R, Barbosa CS. Internação hospitalar e mortalidade por esquistossomose mansônica no Estado de Pernambuco, Brasil, 1992/2000. *Cad Saúde pública.* 2005;21:1392-401.

Ribeiro F, Mello RT, Tavares CAP, Kusel JR, Coelho PMZ. Synergistic action of praziquantel and host specific immune response against *Schistosoma mansoni* at different phases of infection. *Rev Inst Med Trop São Paulo.* 2004;46:231-3.

Ribeiro-dos-Santos G, Verjovski-Almeida S, Leite LCC. Schistosomiasis – a century searching for chemotherapeutic drugs. *Parasitol Res.* 2006;99:505-21.

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

Rocha RS. A 18-year prospective study on morbidity due to *Schistosoma mansoni* in a highly endemic area in the state of Minas Gerais, Brazil. In: *Simpósio Internacional de Esquistossomose*, 5, Salvador. 1995.

Rogers SH, Bueding E. Hycanthon resistance: development in *Schistosoma mansoni*. *Science.* 1971;172:1057-8.

Ross AG, Bartley PB, Sleight AC, Olds GR, Li Y, Williams GM, McManus DP. Schistosomiasis. *N Engl J Med.* 2002;346:1212-20.

Sabah AA, Fletcher C, Webbe G, Doenhoff MJ. *Schistosoma mansoni*: reduced efficacy of chemotherapy in infected T-cell-deprived mice. *Exp Parasitol.* 1985;60:348-54.

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

Santos AT, Blas BL, Nosenas JS, Portillo GP, Ortega OM, Hayashi M, Boheme K. Preliminary clinical trials with praziquantel in *Schistosoma japonicum* infections in the Philippines. Bull World Health Organ. 1979;57:793-9.

Sarvel AK, Kusel JR, Araujo N, Coelho PMZ, Katz N. Comparison between morphological and staining characteristics of live and dead eggs of *Schistosoma mansoni*. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2006;101:289-92.

Sarvel AK. Avaliação clínica-epidemiológica da esquistossomose mansoni em Comercinho, MG (1981/2005). [dissertação]. Belo Horizonte: Santa Casa de Belo Horizonte 2009.

Savioli L, Albonico M, Beach MJ, Chwaya HM, Crompton DW, Dunne J, Ehrenberg JP, Gyorkos T, Kvalsvig J, Taylor MG, Urbani Z, Zheng F. Treatment for intestinal helminth infection. Review needed to take account of all relevant evidence, not only effects on growth and cognitive performance. BMJ. 2000;320:1697-701.

Savioli L, Albonico M, Engels D, Montresor A. Progress in the prevention and control of schistosomiasis and soil-transmitted helminthiasis. Parasitol Int. 2004;53:103-13.

Scrimgeour EM, Gajdusek DC. Involvement of the central nervous system in *Schistosoma mansoni* and *Schistosoma haematobium* infection. Brain. 1985;108:1023-38.

Sette H. O tratamento da esquistossomose à luz da patologia hepática (estudo clínico). [dissertação]. Recife: Universidade Federal de Pernambuco. 1953.

Shaw JR, Brammer KW. The treatment of experimental schistosomiasis with a combination of oxamniquina and praziquantel. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1983;77:39-40.

Silva JR. Valor e importância do tratamento específico da esquistossomose mansoni no campo da profilaxia. Rev Bras Med. 1957;14:514.

Silva LC, Sette JHR, Chamone DAF, Alquezar AS, Punksas JA, Raia S. Clinical trials with oral oxamniquine (UK 4171) for the treatment of mansoni schistosomiasis. Rev Inst Med Trop São Paulo. 1974;16:103-9.

Silva LM, Andrade ZA. Immunostimulation as adjuvant for the chemotherapy of experimental schistosomiasis. *Rev Inst Med Trop São Paulo*. 1997;39:11-4.

Silveira RK, Silveira M, Kelner S. Prevalência de sexo, raça e grupo etário entre 3086 portadores de esquistossomose hepatoespênica In: Kelner S, Silveira M. Varizes do esôfago na esquistossomose mansônica. Recife: UFPE. Universidade Federal de Pernambuco; 1997. P. 41-53.

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

Snedecor GW, Cockran WG. Statistical methods. AMES: Iowa State University Press. 1977.

Southgate VR, Tchuem T, Sene M, De Clercq Q, Rheron A, Jourdane J, Webster BL, Rollinson D, Gryseels B, Vercruyse J. Studies on the biology of schistosomiasis with emphasis on the Senegal River Basin. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2001;96:75-8.

Steiner K, Garbe A, Diekmann HW, Nowak H. The fate of praziquantel in the organism. I – Pharmacokinetics in animals. *Eur J Drug Metab Pharmacokinetic*. 1976;1:85-95.

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;176:304-7.

Stelma FF, Talla A, Sow S, Kongs A, Nang M, Polman K, Delder AM, Gryseels B Efficacy and side effects of praziquantel in an epidemic focus of *Schistosoma mansoni*. *Am J Trop Med Hyg*. 1995;53:167-70.

Stolher HR. Ro 11-3128 – a novel schistosomicidal compound. In: American Society for Microbiology. Proceedings of the 10th International Congress of Chemotherapy 1978; Washington. P.147-8.

Sturrock RF. Schistosomiasis epidemiology and control: how did we get here and where should we go? *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2001;96:17-27.

Talla I, Kongs A, Verle P, Belot J, Sarr S, Coll AM. Outbreak of intestinal schistosomiasis in the Senegal River Basin. *Ann Soc Belge Med Trop.* 1990;70:173-80.

Tammes PML. Isoboles, a graphic representation of synergism in pesticides. *Nether J Plant Pathol.* 1964;70:73-80.

Thompson PE, Meisenhelder JE, Moore AK, Waitz JA. Laboratory studies on the joint effects of certain tris (p-aminophenyl) carbonium salts and antimonials as antischistosomal drugs. *Bull World Health Organ.* 1965;33:517-35.

Tsai MH, Marx KA, Ismail MM, Tao LF. Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) polymerase chain reaction assay for identification of *Schistosoma mansoni* strains sensitive or tolerant to anti-schistosomal drugs. *J Parasitol.* 2000;86:146-9.

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.

Utzinger J, Keiser J, Xiao SH, Tanner M, Singer BH. Combination chemotherapy of schistosomiasis in laboratory studies and clinical trials. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003;47:1487-95.

Utzinger J, Xiao Sh, N'goran EK, Bergquist R, Tanner M. The potential of artemether or the control of schistosomiasis. *Int J Parasitol.* 2001;31;1549-62.

Valle C, Troiani AR, Festucci A, Pica-Mattoccia L, Loberti P, Wolstenholme A, Franckdow K, Doenhoff MJ, Cioli D. Sequence and level of endogenous expression of calcium channel beta subunits in *Schistosoma mansoni* displaying different susceptibilities to praziquantel. *Mol Biochem Parasitol.* 2003;31:111-5.

Vandewaa EA, Mills G, Foster LA, Bennett JL. Physiological role of HGM-CoA reductase in regulating egg production by *Schistosoma mansoni*. *Am J Physiol.* 1989;257:618-25.

Vásquez V, Jung H, Sotelo J. Plasma levels of praziquantel decrease when dexamethasone is given simultaneously. *Neurology.* 1987;37:1561-1562.

Wilkins HA. Reinfection after treatment of schistosome infections. *Parasitol Today*. 1989;5:83-88.

William S, Botros S, Isnail M, Farghally A, Day TA, Bennett JL. Praziquantel-induced tegumental damage *in vitro* is diminished in schistosomes served from praziquantel-resistant infections. *Parasitol*. 2001;122:63-6.

William S, Sabra A, Ramzy F, Mousa M, Demerdash Z, Bennett JL, Day TA, Botros S. Stability and reproductive fitness of *Schistosoma mansoni* isolates with decreased sensitivity to praziquantel. *Int J Parasitol*. 2001;31:1093-100.

World Health Organization. The control of schistosomiasis (WHO Technical Report Series, no. 728). Report of the WHO Expert Committee, Geneva. 1985.

World Health Organization. Identification of high-risk communities for control of schistosomiasis in Africa: A multicomunity study. Social and Economic Research Reports. *TAR / SER / PRS / 15* 83pp. 1995.

World Health Organization. Prevention and control of schistosomiasis and soil-transmitted helminthiasis: report of a WHO expert committee. WHO Tech Rep Ser No. 912. 2002.

World Health Organization. International Strategies for Tropical Disease Treatment - Experiences with Praziquantel - EDM Research Series Nº 26 113p. 1998. Disponível em <http://aaps.who.int/medicinedocs/en/d/jwhozip48e/6.1.html> . Acesso em: 27 nov 2009.

World Health Organization. The control of schistosomiasis. Second report of WHO expert committee. Geneva: World Health Organization; 1993. WHO Technical Report Series, No. 830).

World Health Organization . The control of schistosomiasis. Second report of the WHO expert committee. Technical Report Series 830, p. 86, 1993. Disponível em <http://www.who.gov.br> Acesso em: 27 nov 2009.

World Health Organization WHO. First report of joint WHO expert Committees on the prevention and control of schistosomiasis and soil-transmitted helminthiasis. Technical report Series. 2002.

World Health Organization. Public health impact of schistosomiasis: disease and mortality. Bull World Health Org 71: 657-662, 1993. 26.

World Health Organization. TDR Strategic Direction: Schistosomiasis. Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases (TDR). Geneva. 2002.

World Health Organization. Oxamniquine. In: WHO Model Prescribing Information. Drugs used in parasitic diseases, p.118-9.

World Health Organization. Report of the WHO informal consultation Schistosomiasis control. Geneva Who/CDS/CPC/SIP/99 2.2-4 December 1998. Available on http://whglibdoc.who.int/hg/1999/WHO_CDS_CPC_SIP_99.2pdf. Acessado em 26/11/2009.

World Health Organization. Report of the WHO informal consultation on schistosomiasis in low transmission areas control strategies and criteria for elimination. London 10-13 april 2000. WHO Document WHO/CDS/CPE/SIP/2001.1. Geneva, Switzerland. 2001

World Health Organizations. Schistosomiasis can be controlled: now who can afford it. WHO Features, Geneva, October, N0.161. 1991

Wu MH, Wei CC, Xu ZY, Yuan HC, Lian WN, Yang QJ, Chen M, Jiang QW, Wang CZ, Zhang SJ. Comparison of the therapeutic efficacy and side effects of a single dose of levo-praziquantel with mixed isomer praziquantel in 278 cases of schistosomiasis japonica. Am J Trop Med Hyg. 1991;45:345-9.

Xiao SH, Booth M, Tanner M. The prophylactic effects of artemether against *Schistosoma japonicum* infections. Parasitol Today. 2000;16:122-6.

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

Xiao SH, Catto BA. *In vitro* and *in vivo* studies of the effect of artemether on *Schistosoma mansoni*. Antimicrob Agents Chemother. 1989;33:1557-66.

- Xiao SH, Tanner M, N'Goran EK, Utzinger J, Chollet J, Bergquist R, Chen M, Zheng J. Recent investigations of artemether, a novel agent for the prevention of schistosomiasis japonica, mansoni and haematobia. *Acta Trop.* 2002;82:175-81.
- Yarinsky A, Drobeck HP, Freele H, Wiland J, Gumaer KI. An 18-month study of the parasitologic and tumorigenic effects of hycanthon in *Schistosoma mansoni*-infected and noninfected mice. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1974;27:169-82.
- Yarinsky A. Hycanthon resistance in a human strain of *Schistosoma mansoni*. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1977;71:87-8.
- Yarinsky A. Susceptibility of schistosomes to chemotherapy with particular reference to hycanthon. *Proc Int Con Schisto.* 1978;1:259-69.
- Yue WJ, You JQ, Mei JY. Effects of arteméter on *Schistosoma japonicum* adult worms and ova. *Acta Pharmacol Sin* 1984;5:60-3.
- Zwingenberger K, Queiroz JA, Poggensee V, Alencar JE, Valdeguas J, Esmeralda F, Feldmeier H. Efficacy of oxamniquine, praziquantel and a combination of both drugs in schistosomiasis mansoni in Brazil. *Rev Inst Med Trop São Paulo.* 1987;29-30.