

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

TARSILA FERRAZ FREZZA

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DO PRAZIQUANTEL ASSOCIADO A LIPOSSOMAS
EM *SCHISTOSOMA MANSONI* IN VIVO**

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
Tarsila Ferraz Frezza
Silmara Marques Allegretti
e aprovada pela Comissão julgadora.

Tese apresentada ao Instituto de
Biologia, da Universidade Estadual
de Campinas (UNICAMP), para
obtenção do Título de Mestre em
Parasitologia.

Orientadora: Profa. Dra. Silmara Marques Allegretti

CAMPINAS

2007

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP

F899a

Frezza, Tarsila Ferraz

Avaliação do efeito do praziquantel associado a lipossomas em *Schistosoma mansoni* *in vivo* / Tarsila Ferraz Frezza. – Campinas, SP: [s.n.], 2007.

Orientadora: Silmara Marques Allegretti.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. *Schistosoma mansoni*. 2. Praziquantel. 3. Lipossomos. I. Allegretti, Silmara Marques. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Título em inglês: Evaluation of the praziquantel in liposome effect in *Schistosoma mansoni* *in vivo*.

Palavras-chave em inglês: *Schistosoma mansoni*; Praziquantel; Liposome.

Titulação: Mestre em Parasitologia.

Banca examinadora: Silmara Marques Allegretti, Luiz Augusto Magalhães, Maria Palmira Daflon Gremião.

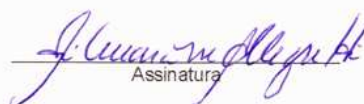
Data da defesa: 27/07/2007.

Programa de Pós-Graduação: Parasitologia.

Campinas, 27 de julho de 2007.

BANCA EXAMINADORA

Prof(a). Dr(a). Silmara Marques Allegretti


Assinatura

Prof. Dr. Luiz Augusto Magalhães


Assinatura

Prof(a). Dr(a). Maria Palmira Daflon Gremião


Assinatura

Prof(a). Dr(a). Marlene Tiduko Ueta

Assinatura

Prof(a). Dr(a). Mara Cristina Pinto

Assinatura

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Silmara Marques Allegretti, meus mais sinceros e profundos agradecimentos pela orientação, pelo profissionalismo, pela amizade, pela preocupação, pela dedicação, pela disponibilidade, pela paciência e pelo afinho com que abraçou este trabalho e, porque não dizer, abraçou a mim também.

Aos membros da banca de exame prévio Profa. Dra. Marlene Tiduko Ueta, Prof. Dr. Luiz Augusto Magalhães, Profa. Dra. Maria Palmira Daflon Gremião e Profa. Dra. Mara Cristina Pinto que com suas considerações e críticas me auxiliaram na conclusão dessa dissertação.

Ao Dr. “ô” Rubens Riscala Madi pelas análises estatísticas, pela amizade, pelos conselhos e pelas informações compartilhadas não só durante o desenvolvimento deste trabalho, como também ao longo dos anos.

Aos técnicos do Departamento de Parasitologia da Unicamp, João Batista Alves de Oliveira e Ivo Gonçalves Pereira e aos alunos de graduação em Biologia da Unicamp, Tamy Midori Banin e Anderson Tintino dos Santos, pelos apoios tanto técnicos como fraternos, sem os quais ficaria mais difícil a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Arício Xavier Linhares, pelo auxílio nas análises estatísticas.

À aluna de Pós-Graduação em farmácia da Unesp de Araraquara, Ana Luíza Ribeiro de Souza, pelas preparações com Praziquantel.

À Coordenação da subcomissão de Pós-Graduação em Parasitologia, na pessoa da Profa. Dra. Urara Kawazoe, pelo auxílio prestado.

À minha família, minha maior incentivadora, que sempre me apoiou incondicionalmente durante esta e outras caminhadas.

A Maria Isabel Müller, minha amiga, minha irmã, obrigada por todos os momentos que me concedeu ao seu lado.

Aos amigos do Departamento de Parasitologia da Unicamp e aos amigos da Graduação em Biologia da Puc-Campinas (2001-2004), pelas risadas, pelas confidências, pelos momentos de descontração, pelas alegrias, pelo apoio nos momentos difíceis... guardarei para sempre essas lembranças.

Aos camundongos, pois sem eles nada seria possível!

A todos vocês, que foram meus “companheiros de viagem”, meu muito obrigada.

SUMÁRIO

Lista de Tabelas.....	vi
Lista de Figuras.....	vii
Resumo	viii
Abstract	x
I. Introdução.....	1
II. Objetivos.....	8
III. Material e Métodos.....	9
IV. Resultados.....	21
V. Discussão.....	47
VI. Conclusões.....	66
VII. Referências Bibliográficas.....	69
VIII. Anexo I	84

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Efeito das doses de PRZ e PRZ+LPZ sobre a população de vermes adultos de *Schistosoma mansoni*. Tratamento aos 30 dias de infecção28

Tabela 2: Efeito das doses de PRZ e PRZ+LPZ sobre a população de vermes adultos de *Schistosoma mansoni*. Tratamento aos 45 dias de infecção29

Tabela 3: Efeito das doses de PRZ e PRZ+LPZ sobre os ovos de *Schistosoma mansoni*. Tratamento aos 30 dias de infecção40

Tabela 4: Efeito das doses de PRZ e PRZ+LPZ sobre os ovos de *Schistosoma mansoni*. Tratamento aos 45 dias de infecção41

Tabela 5: Efeito das doses de PRZ e PRZ+LPZ sobre a área dos granulomas no fígado. Tratamentos feitos aos 30 dias de infecção45

Tabela 6: Efeito das doses de PRZ e PRZ+LPZ sobre a área dos granulomas no fígado. Tratamentos feitos aos quarenta e cinco dias de infecção46

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Esquema do cronograma das infecções	13
Figura 2: Escala visual de granulomas no baço	16
Figura 3: Escala visual de granulomas no fígado	16
Figura 4: Escala visual de granulomas nos pulmões	17
Figura 5: Escala visual de granulomas em fragmento do intestino delgado	17
Figura 6: A. Quantidade de Vermes Adultos Fora do Sistema Porta Hepático (VFSPH). B. Quantidade de Vermes Adultos no Sistema Porta Hepático (VSPH)	25
Figura 7: Quantidade de ovos por grama de fezes	33
Figura 8: Oograma dos grupos tratados aos: A. 30 dias de infecção; B. 45 dias de infecção	38

RESUMO

Para o tratamento da esquistossomose mansônica no Brasil, a Oxamniquina (OXA) e o Praziquantel (PRZ) são os fármacos escolhidos. O primeiro tem sua produção reduzida por causa dos efeitos colaterais, carcinogênicos e mutagênicos que apresenta. O segundo tem amplo espectro de atuação e baixa toxicidade, quando comparado ao OXA, mas tem a desvantagem de ser eliminado rapidamente pelo organismo. Além disso, tem ação dependente da idade do parasito e seu uso extensivo culmina na resistência do *Schistosoma mansoni* ao fármaco. Assim, o estudo de novas alternativas que tornem o PRZ mais disponível no organismo, com taxa de liberação mais adequada, é necessário. Uma dessas alternativas é sua incorporação ao lipossoma (LPZ).

O presente trabalho teve por objetivo analisar o efeito do PRZ incorporado a LPZ (PRZ+LPZ) pela sua ação na sobrevivência dos vermes adultos de *S. mansoni*, linhagem BH, e alteração na postura dos ovos além da sua ação na formação de granulomas no fígado.

Foram testadas cinco doses de PRZ livre e PRZ+LPZ (40; 47; 60; 250 e 300 mg/kg) em camundongos *Swiss*, administradas por meio da tubagem esofágica, em dose única. Os lipossomas de fosfatidilcolina foram preparados pelo método da sonicação. Os camundongos foram divididos em dois grandes grupos (um deles foi tratado após 30 dias de infecção e o outro após 45 dias) sendo que em cada grupo, dez animais receberam uma determinada dose de PRZ a ser testada, para os outros dez a mesma dose, dessa vez com o PRZ+LPZ e para os dez restantes, Tampão Tris HCl pH 7,5. Após 15 dias da administração do tratamento, os animais foram sacrificados e necropsiados.

O tratamento feito com PRZ+LPZ na dose de 300 mg/kg, administrado no 45º dia de infecção, mostrou-se mais eficaz para a maioria dos parâmetros analisados (maior quantidade de vermes fora do sistema porta-hepático – indicando uma resposta do verme à ação do fármaco –, maior redução no número de vermes e de ovos nas fezes e maior redução dos ovos viáveis no intestino –

principalmente dos imaturos). Provavelmente, este tratamento alterou a oviposição do verme. Os órgãos dos camundongos tratados com PRZ+LPZ na dose 300 mg/kg, administrado no 30º dia de infecção, apresentaram poucas lesões. Além disso, não apresentaram granulomas nos fígados observados histologicamente, o que pode ser explicado pela baixa oviposição que ocorre nesse período, com o fato deste tratamento talvez ter a capacidade de minimizar a formação dos granulomas.

O tratamento feito com PRZ+LPZ foi superior provavelmente porque aumentou a disponibilidade do fármaco no organismo assim como a sua solubilidade em meios aquosos. Além disso, o fármaco, quando incorporado, provavelmente foi absorvido com mais facilidade pelo verme, fazendo com que os danos provocados pelo PRZ no parasito, fossem mais profundos.

ABSTRACT

For the treatment of schistosomiasis mansoni in Brazil, the drugs of choice are Oxamniquina (OXA) and the Praziquantel (PRZ). OXA has its production reduced by its collateral, carcinogenic and mutagenic effects that it presents. PRZ has wide action spectrum and low toxicity, when compared to OXA. However, it has the disadvantage of being eliminated very fast by the organism. Besides, it has its action depending on the age of the parasite and its extensive use leads to a resistance of the *Schistosoma mansoni* to the drug. It's necessary the research of new alternatives to make PRZ more available in the organism, with more adequate liberation rate. One of these alternatives is its incorporation to the liposome (LPZ).

The current work had as a target to analyze the effect of the PRZ incorporated to LPZ (PRZ+LPZ) by its action in the survival of adult worms of *Schistosoma mansoni*, BH strain, and alteration in the laying of eggs beyond its action in the formation of granulomas in the liver.

Five doses were tested of PRZ e PRZ+LPZ (40; 47; 60; 250 and 300 mg/kg) in Swiss mice, administered by the intragastric route in only one dose. The liposomes of phosphatidilcoline were prepared by the method of sonication. The mice were divided in two big groups (one of them was treated after 30 days of infection and the other group treated after 45 days) and in each group ten animals received a determined dose of PRZ to be tested, to the other ten the same dose, this time with PRZ+LPZ and to the last ten, Busser Tris HCl pH 7,5. After 15 days of the administration of the treatment, the animals were sacrificed and necropsies.

The treatment done with PRZ+LPZ in the dose of 300 mg/kg, administered of the 45th day of the infection, showed itself superior to the majority of the analyzed parameters (higher quantity of worms outside the porta-hepatic system – which indicates a response of the worm to the action of the drug -, big reduction in the number of worms and eggs in the fezzes and big reduction of the viable eggs in the intestines – mainly of immature eggs). Probably this treatment altered the oviposition of the worm. The organs of mice treated with PRZ+LPZ in dose of 300

mg/kg, administered in the 30^{est} day of infection, presented fewer injuries. Besides, they don't show granulomas in the livers observed histologically, which can be explained by the low oviposition that occurs in this period, with the fact that this treatment perhaps has the capacity to minimize the formation of granulomas.

The treatment done with PRZ+LPZ was superior probably because the availability increased of the drug in the organism as well its solubility in water environment. Besides, the drug, when incorporated, probably was more easily absorbed by the worm, making the harm provoked by PRZ deeper.

I. INTRODUÇÃO

A esquistossomose mansônica, também conhecida por esquistossomíase, bilharziose, xistosa, doença do caramujo ou barriga d'água, é uma infecção parasitária comum causada pelo trematódeo digenético intravascular *Schistosoma mansoni* (Blanchard *et al.*, 1993).

A distribuição geográfica da doença se concentra nos países em desenvolvimento onde a política sanitária é inadequada, coincidindo com a existência de algumas espécies de moluscos de água doce do gênero *Biomphalaria*, que são os hospedeiros intermediários do parasito (Savioli *et al.*, 1997; Chitsulo *et al.*, 2000). É encontrada principalmente na região do Oriente Próximo (Israel, Arábia Saudita, Iêmen, Iran, Iraque), em grande parte da África (Egito, Líbia, Moçambique, Camarões, Nigéria, Angola, entre outros) nas Antilhas (Porto Rico, República Dominicana) e na América do Sul (Venezuela e Brasil) (SUCEN, 2004).

No Estado de São Paulo, entre 1981 a 1997, foram notificados 271.191 casos a SUCEN. Dentre as regiões de maior prevalência neste Estado destacam-se o Vale do Paraíba, o Vale do Ribeira, a Baixada Santista e a região de Campinas, sendo esta última de grande importância epidemiológica (SUCEN, 2004).

O ciclo biológico do *S. mansoni* é complexo já que envolve uma fase de reprodução sexuada, pelos vermes adultos, nos hospedeiros definitivos (humanos e camundongos, por exemplo) e uma fase assexuada em moluscos do gênero *Biomphalaria* (hospedeiros intermediários). O hospedeiro definitivo se infecta ao entrar em contato com coleções de água-doce contendo cercárias (forma larval livre-natante do parasito). As cercárias penetram na pele intacta do hospedeiro definitivo e se transformam em outra larva, o esquistossômulo. Os esquistossômulos, por sua vez, penetram nos vasos sanguíneos e são levados pela circulação para o coração, pulmões e em seguida para o fígado, onde

tornam-se adultos e se diferenciam em machos e fêmeas. Os vermes adultos acasalados migram para as veias mesentéricas, onde ocorrerá a oviposição. Parte dos ovos atravessam a parede intestinal, alcançam a luz e são eliminados com as fezes, enquanto que uma outra parte fica retida nos tecidos, como os do fígado, formando ao redor desses ovos uma reação granulomatosa, causa principal da morbidade da doença. O ciclo se completa quando os ovos eliminados ao meio externo alcançam coleções de água doce, quando ocorrerá a eclosão da larva (miracídio) que penetrará no hospedeiro intermediário, onde sofrerá transformações, até serem geradas as cercárias. Em condições favoráveis o ciclo completo ocorre em torno de 80 dias, ou seja, cerca de 40 dias para cada hospedeiro (Xavier *et al.*, 1998; Katz & Almeida, 2003; Utzinger *et al.*, 2003; Ribeiro-dos-Santos *et al.*, 2006).

Segundo Cunha (1992) a quimioterapia das esquistossomoses teve início com o tártaro emético, um antimonial trivalente que apresentava efeitos colaterais tóxicos, o que levou a pesquisa de fármacos mais ativos, livres de metais e administrados por via oral (Bonesso-Sabadini, 1995). A partir de então, surgem novos fármacos como a lucantona (Kikuth & Gönnert, 1948), o niridazole, que atuava nas três principais espécies de *Schistosoma* que parasitam o homem o *S. mansoni*, *S. haematobium* e *S. japonicum* (Lambert & Stauffer, 1964) e a hincantona, obtido pela ação do fungo *Aspergillus sclerotiorum* sobre a lucantona (Rosi *et al.*, 1965). No entanto, tais fármacos por apresentarem efeitos colaterais graves além de outros problemas, não eram considerados seguros o suficiente para serem utilizados em larga escala nas regiões endêmicas (Bonesso-Sabadini, 1995). Em 1969, Richards & Foster descreveram a Oxamniquina e em 1975 Thomas *et al.*, descreveram o Praziquantel.

Atualmente, para o tratamento da esquistossomose no Brasil, a Oxamniquina (OXA) e o Praziquantel (PRZ) são os fármacos de escolha. O primeiro, que é eficaz somente para *S. mansoni*, possui efeitos colaterais no sistema nervoso central, além de ter efeitos mutagênicos e carcinogênicos (Barberato, 1996). Também já foram detectados casos de resistência e tolerância a esse fármaco, além de já ter sido notificada sua baixa atividade nos casos de

esquistossomose mansônica aguda (Frézard & Melo, 1997) – ou seja, no período que vai da 3ª a 9ª semana de infecção coincidindo com a fase de produção de ovos (Jordan *et al.*, 1993). Dessa forma, a distribuição da OXA não é adequada, uma vez que a única indústria farmacêutica que a produz e a comercializa, mantém sua produção reduzida (Kusel & Hagan, 1999).

A Oxamniquina foi com êxito encapsulada em vesículas lipídicas-lipossômicas (Madden *et al.*, 1990). A superioridade da OXA incorporado ao lipossoma (LOXA) foi demonstrada na liberação prolongada do fármaco encapsulado e na sua proteção do rápido metabolismo do hospedeiro (Frézard & Melo, 1997). Assim, sua eliminação pode ser retardada, permanecendo em níveis pequenos durante um período mais prolongado no sangue (Foster, 1973).

Outro fator que atesta a superioridade do LOXA é a sua habilidade de atuar diretamente no fígado, região onde também se encontram os parasitos adultos (Frézard & Melo, 1997). Segundo Cioli (1998), a LOXA é, então, mais eficiente que a OXA para o tratamento da esquistossomose experimental quando administrado subcutaneamente em um período próximo à infecção.

O PRZ (2-ciclohexilcarbonil-1,2,3,6,7,11b-hexahidro-4*H*-pirazino[2,1-a]isoquinolina-4-ona) foi inicialmente sintetizado para atuar contra cestódeos e seu uso restringia-se ao uso veterinário (Bouree, 1991). Sabe-se, no entanto, que ele também pode ser utilizado para o tratamento da esquistossomose provocada por *S. mansoni*, *S. haematobium*, *S. japonicum*, *S. intercalatum* e *S. mattheei* (Webbe & James, 1977). Atualmente consiste no principal fármaco utilizado no programa de controle nacional e internacional de todas as espécies de esquistossomose (Cioli, 1998).

Além do *Schistosoma*, o PRZ é utilizado no tratamento das infecções provocadas por outros trematódeos, tais como *Opisthorchis sinensis*, *Opisthorchis viverrini*, *Paragonimus* spp., *Fasciolopsis buski*, *Heterophyes heterophyes* e *Metagonimus yokogawai* (Wagner, 1984).

Uma das vantagens do uso do PRZ é que, além do seu amplo espectro de ação, sua toxicidade é baixa (Frohberg, 1984). Tal fármaco também apresenta

baixa genotoxicidade (Kramers *et al.*, 1991; Montero & Ostrosky, 1997) e baixos efeitos mutagênicos (Montero *et al.*, 1994), apesar de certos metabólitos existentes na urina humana e no plasma de camundongos tratados com PRZ apresentarem-se mutagênicos para *Salmonella* sp. e linhagens celulares humanas e murinas (Montero & Ostrosky, 1997). O risco de provocar efeitos carcinogênicos é discutível (Herrera *et al.*, 1994; Anwar *et al.*, 1989; Anwar & Rosin, 1993; Anwar, 1994).

Além desses fatores, outra vantagem é que esse fármaco é bem tolerado por pacientes de todas as idades e com diferentes formas clínicas de esquistossomose, incluindo casos hepatoesplênicos avançados, quando usado a curto ou a longo prazo (Frohberg, 1984; Bassily *et al.*, 1985) e que durante o tratamento com PRZ observa-se que há uma redução na postura de ovos e prevenção da fibrose hepática (Metwally *et al.*, 1995). Também foi observada uma moderada redução na penetração das cercárias quando se utiliza o fármaco de maneira preventiva (Salafsky *et al.*, 1989).

Entretanto, os efeitos colaterais incluem dores de cabeça, náuseas, anorexia, vômitos, dores abdominais, dores epigástricas, diarreia com ou sem sangue e muco, febre, mialgia, sonolência e mais raramente “rash” e edemas cutâneos (Cioli & Pica-Mattocia, 2002).

Alguns estudos demonstraram uma baixa eficácia no tratamento da esquistossomose utilizando-se o PRZ. Primeiramente porque esse fármaco, apesar de ser rapidamente absorvido pelo organismo quando administrado oralmente (cerca de 15 minutos, com picos entre 1 a 2 horas), também desaparece da circulação sangüínea rapidamente (entre 1 a 3 horas após a sua ingestão), sendo que sua eliminação quase que completa (por meio das fezes e urina) ocorre em cerca de 24 horas (Valencia *et al.*, 1994; Leopold *et al.*, 1978). O produto da biotransformação do PRZ é o PRZ monohidroxilado que, embora praticamente inativo, possui uma meia vida maior (4 horas) (Steiner *et al.*, 1976; Cioli *et al.*, 1995; Groll, 1984; El-Subbagh & Al-Badr, 1998).

Além disso, o PRZ é mais eficiente para as formas juvenis do *Schistosoma*. Assim, o parasito é mais susceptível à ação do fármaco principalmente durante a fase de esquistossômulo nos primeiros dois dias de penetração na pele (Stelma *et al.*, 1995), e também entre a 3ª e 4ª semanas após a infecção (Pica-Mattocia & Cioli, 2003). Ao redor da 6ª e 7ª semanas a susceptibilidade é reduzida e o parasito pode continuar seu desenvolvimento (Sabah *et al.*, 1986; Gönner & Andrews, 1977; Pica-Mattocia & Cioli, 2003).

Essa ação dependente da idade do parasito é provavelmente o motivo de muitos tratamentos com o PRZ fracassarem (Picquet *et al.*, 1998; Pica-Mattocia & Cioli, 2003). Assim, a eficiência da terapia com este fármaco depende não só da intensidade da infecção, mas também do tempo da infecção (Cioli *et al.*, 1995).

Outra desvantagem do PRZ é que seu uso extensivo poderia manter processos de pressão seletiva o que levaria na resistência do *S. mansoni* a esse fármaco e, dessa forma, seria possível o estabelecimento de endemias. A suposição de que o *S. mansoni* poderia desenvolver resistência a doses terapêuticas de determinados fármacos surgiu em 1987 (Kinoti, 1987), quando a grande variação na suscetibilidade a fármacos encontrada no parasito, mesmo naqueles provenientes de uma mesma região, já era conhecida.

O uso extensivo do fármaco, dessa maneira, aumentou a preocupação sobre o potencial emergente de resistência ao PRZ. O desenvolvimento de *Schistosoma* sp. resistente ao tratamento foi demonstrado experimentalmente, mostrando-se que doses sub-terapêuticas de PRZ sobre várias gerações produziam parasitos menos sensíveis ao fármaco (Fallon & Doenhoff, 1994).

Os trabalhos que evidenciam a ocorrência de resistência ao PRZ, tanto em indivíduos em tratamento quanto em cobaias, induziram análises sobre seus possíveis mecanismos de ação (Cioli, 2000; Doenhoff *et al.*, 2002).

Na verdade o mecanismo de ação do PRZ sobre o parasito não foi totalmente esclarecido. Sabe-se, contudo que a exposição do fármaco *in vitro* e *in vivo* causa uma rápida contração muscular do parasito, deixando-o paralisado

(Pax *et al.*, 1978). A contração é provavelmente causada por um rápido influxo de Ca^{2+} no parasito (Wold-Mussie *et al.*, 1982; Pax *et al.*, 1978).

Outro efeito consiste em provocar alterações morfológicas no tegumento e membranas sarcoplasmáticas do parasito que é acompanhado por um aumento da exposição de antígenos na superfície do mesmo.

O PRZ, portanto, expõe os antígenos do *Schistosoma* sp. que são identificados e conectados com a resposta imune do hospedeiro requerida para complementar a atividade do fármaco (Doenhoff *et al.*, 1987; Brindley *et al.*, 1989). Acredita-se, então, que o PRZ “interaja” com o sistema imune do hospedeiro para matar o parasito. Isso porque segundo Montero & Ostrosky (1997), a IL1 sofre aumento em três meses após o tratamento com o PRZ e essa resposta é inibida em pacientes infectados por *S. mansoni* sendo, contudo, restaurada logo após o tratamento com PRZ.

Finalmente, o último efeito do fármaco consiste no rompimento da superfície do parasito, seguido de sua morte (Brickes *et al.*, 1983).

A administração de um fármaco tem por objetivo tornar possível a ação a que ele se destina. No entanto, conforme dito anteriormente, muitas vezes uma grande fração do fármaco é eliminada sem exercer nenhuma atividade. Sendo assim, atualmente, há o desenvolvimento de várias alternativas para tornar um fármaco mais disponível para determinados alvos e com taxas de liberação mais adequadas a fim de produzir o efeito pretendido.

Algumas dessas alternativas seriam os sistemas transdérmicos, pró-fármacos, nanopartículas, micropartículas, lipossomas entre outras. Tais alternativas visam aumentar a eficácia, diminuir os efeitos colaterais, direcionar os fármacos a locais específicos do organismo, reduzir sua toxicidade, liberar a fármaco de maneira controlada, melhorar sua biodisponibilidade, alterar sua farmacocinética e aumentar a solubilidade do fármaco em sistemas aquosos (Juliano, 1981; Ranson *et al.*, 1996; Siler-Marinkovic *et al.*, 1997).

Dentre as novas alternativas terapêuticas propostas nas últimas décadas, o estudo com lipossomas encontra-se em destaque. Estudos pré-clínicos e

clínicos demonstraram que a encapsulação de fármacos em lipossomas fornecem todas as vantagens vistas no parágrafo anterior, atuando, então como um sistema de liberação controlada (Ranson *et al.*, 1996; Siler-Marinkovic *et al.*, 1997).

Lipossomas (ou lipossomos) são agregados constituídos por compostos anfifílicos com duas cadeias carbônicas que, quando disperso em água, tendem a se organizar formando uma ou mais bicamadas esféricas e concêntricas separadas por compartimentos aquosos (Fendler, 1982; Gremião & Castro, 1999; Weiner *et al.*, 1989). Segundo Hrková *et al.* (1998), lipossomas constituem em vesículas sintéticas formadas por uma bicamada lipídica contínua que delimita uma cavidade interna preenchida por solvente. Foi descoberto por Bagham *et al.* em 1965, sendo extremamente útil como modelo de membranas em estudos experimentais (Gregoriadis, 1976). O principal componente dos lipossomas são os fosfolipídios (Vemuri & Rhodes, 1995).

Os lipossomas apresentam-se na forma de bicamadas concêntricas e, devido à sua característica estrutural, fármacos de diferentes graus de hidrolipofilia podem ser incorporados a ele. As substâncias podem ser incorporadas no meio aquoso, na bicamada ou, ainda, se particionar entre esses dois compartimentos produzindo, com isso, sistemas com características (como liberação do conteúdo interno, quantidade de fármaco incorporado e eficiência) bastante distintas (Weiner *et al.*, 1989; Lasic, 1993).

Estudos *in vitro* demonstraram que em cultura de *S. mansoni* da linhagem LE, quando em contato com o PRZ incorporado a lipossomas (LPZ+PRZ), ocorre a separação dos casais e alteração na atividade motora do parasito. Estudos *in vivo*, feitos com camundongos infectados com a mesma linhagem de *S. mansoni*, demonstraram uma diminuição da eliminação de ovos viáveis nas fezes, além de diminuição do número de parasitos adultos. Assim, acredita-se que o lipossoma aumente a atividade do PRZ (Mourão *et al.*, 2005).

A associação do PRZ com sistemas visa aumentar o índice terapêutico, diminuir os efeitos colaterais, direcionar o fármaco a locais específicos do organismo, reduzir sua toxicidade, liberar o fármaco de maneira controlada,

melhorar sua biodisponibilidade, alterar sua farmacocinética e aumentar a solubilidade em sistemas aquosos que permitam sua maior permanência. Assim, o entendimento do comportamento dos lipossomas em sistemas biológicos e dos mecanismos físico-químicos envolvidos na interação dos lipossomas com o fármaco e local de ação, é essencial para sua viabilização futura (Lasic, 1997; Siler-Marinkovic *et al.*, 1997).

II. OBJETIVOS

- **Objetivo Geral**

Analisar a ação do Praziquantel incorporado a lipossomas em camundongos “Swiss” SPF, infectados por *S. mansoni* da linhagem BH.

- **Objetivos Específicos**

- Analisar o efeito do Praziquantel incorporado a lipossomas pela sua ação na sobrevivência dos vermes adultos e alteração da postura de ovos;
- Analisar a ação do Praziquantel associado a lipossomas na formação de granulomas no fígado, através de observações histológicas.

III. MATERIAL E MÉTODOS

- **Linhagem do *Schistosoma mansoni***

A linhagem de *S. mansoni* utilizada foi a BH (oriunda de Belo Horizonte, MG), mantida no Departamento de Parasitologia do Instituto de Biologia da Unicamp em moluscos *Biomphalaria glabrata*.

- **Hospedeiro Intermediário**

Os moluscos planorbídeos *Biomphalaria glabrata* foram mantidos em tanques (50 L) e alimentados, diariamente, com folhas de alface frescas e ração para roedores triturada com adição de carbonato de cálcio 10% (Souza *et al.*, 1987), até que atingissem o tamanho ideal para poderem ser infectados (6 a 10 mm de diâmetro).

Para a infecção dos hospedeiros intermediários, foram utilizados dez miracídios (linhagem BH) obtidos pelo método da tamisação das fezes (coletaram-se as fezes de camundongos, infectados há sessenta dias, e macerou-as com água; em seguida essas fezes foram peneiradas duas vezes, primeiro utilizando-se uma malha de 100 e posteriormente, de 400 micras). O conteúdo obtido com a tamisação foi retido em uma placa de Petri e exposto a luz e temperatura de 28 °C durante uma hora, para eclosão das larvas. Os miracídios foram pipetados e colocados em um frasco de vidro do tipo “snap-cap”, juntamente com um único exemplar de *B. glabrata*. Foram utilizados dez miracídios por molusco.

Os moluscos foram expostos por duas horas ao calor e à iluminação. Após o período de exposição, os mesmos foram mantidos em aquários de vidro para obtenção de cercárias (Souza *et al.*, 1987). Para cada ciclo de infecção foram expostos oitenta moluscos para que fornecessem uma quantidade razoável de

indivíduos positivos (aproximadamente 30) a fim de se obter equilíbrio entre os sexos do parasito no camundongo (Pellegrino & Katz, 1968).

Decorridos 35 a 40 dias de infecção, cerca de cinco moluscos foram colocados por recipiente, com água filtrada e decolorada e submetido a calor e iluminação (utilizando-se uma lâmpada incandescente) por duas horas, a fim de eliminar cercárias. As cercárias foram recolhidas em uma placa de Petri, separadas e colocadas em tubos de ensaio, contendo setenta cercárias cada.

- **Hospedeiro Definitivo**

Os camundongos (*Mus musculus*) utilizados foram da linhagem Swiss-SPF, fêmeas, com 30 dias de idade, fornecidos pelo Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica (CEMIB) da Unicamp.

Os animais foram mantidos em caixas plásticas com tampas metálicas e alimentados com ração de animal de laboratório e água “*ad libitum*”. Uma hora antes do tratamento com o fármaco a ração era retirada para facilitar a gavagem. No manejo, os animais recebiam maravalha autoclavada, em três trocas semanais.

- **Infecção do Hospedeiro Definitivo**

As fêmeas de camundongos “Swiss” SPF foram infectadas aos 30 dias de idade individualmente com setenta cercárias da linhagem BH. A infecção foi realizada utilizando-se a técnica de imersão da cauda do animal em suspensão cercariana, durante duas horas com exposição de luz e temperatura de 28°C (Olivier & Stirewalt, 1952). Para conter os camundongos durante esse período, foram utilizados dispositivos de contenção de camundongos.

Para cada infecção foram utilizados 30 animais distribuídos em seis gaiolas, com cinco camundongos em cada uma. No final do processo de infecção, o conteúdo de cada tubo de ensaio referente a cada camundongo, foi analisado para contar quantas cercárias não penetraram no animal.

O protocolo deste experimento de infectividade foi submetido para a Comissão de Ética em Experimentação Animal/CEEA – IB – Unicamp (protocolo nº 1117-1), e aprovado por estar de acordo com os princípios éticos na experimentação animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

- Incorporação do PRZ ao LPZ

O LPZ foi preparado pelo método de sonicação. A partir de uma solução clorofórmica de fosfatidilcolina foi obtido um filme pela evaporação do solvente em rotaevaporador e, posteriormente, em vácuo por uma hora. Ao filme formado foi acrescentada solução tampão Tris/HCl 20 mM pH 7,5, deixando hidratar por 45 minutos. Terminado este tempo, a dispersão foi agitada até o desprendimento total do filme e sonicada, em seguida, utilizando banho de gelo e pulso de um minuto com intervalo de um minuto entre eles formando-se LPZ unilamelares.

Para incorporação do PRZ ao LPZ, ambos foram pesados (proporção de 1:6) e dissolvidos em clorofórmio por meio de agitação manual. Posteriormente obteve-se um filme a partir da evaporação do solvente em nitrogênio. Em seguida, hidratou-se com tampão Tris/HCl por 40 minutos. Após esse período a dispersão foi sonicada utilizando banho de gelo e pulso de um minuto com intervalo de um minuto entre eles.

- Tratamento dos camundongos

Os animais foram tratados por via oral, através de tubagem esofágica.

Os camundongos foram divididos em dois grandes grupos (um deles foi tratado após 30 dias de infecção e o outro após 45 dias) sendo que em cada grupo, dez animais receberam uma determinada dose de PRZ a ser testada, para os outros dez a mesma dosagem, dessa vez com o PRZ incorporado ao LPZ e para os dez restantes, Tampão Tris. Foram administrados 0,3 mL de cada solução do fármaco por animal da maneira mostrada abaixo.

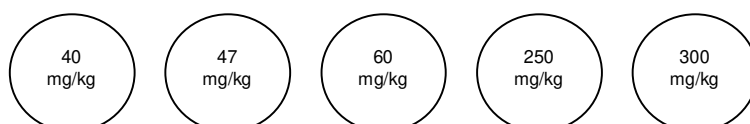
Grupos de camundongos:

- 1) **Grupo Controle Positivo (CONTROLE):** Tampão Tris - 10 camundongos.
- 2) **Grupo Praziquantel-Lipossoma (PRZ+LPZ):** 10 camundongos.
- 3) **Grupo Praziquantel (PRZ livre):** 10 camundongos.

O esquema abaixo mostra as infecções e as dosagens utilizadas:

BH:

30 dias:



45 dias:

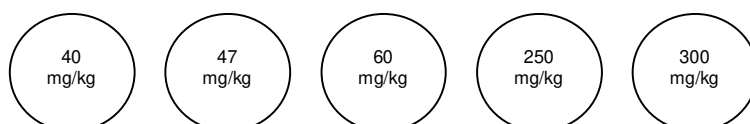


Figura 1: Esquema do cronograma das infecções. Cada círculo corresponde a uma infecção de 30 animais e a dose do fármaco que foi utilizada para o tratamento. Foram administradas cinco dosagens diferentes. Os círculos da parte superior indicam aquelas infecções que foram tratadas com 30 dias (para analisar o efeito do fármaco nos parasitos jovens) e as da parte inferior, aquelas que foram tratadas com 45 dias (para analisar o efeito do fármaco nos parasitos adultos).

- **Análise do Tratamento**

Depois de 15 dias do tratamento ter sido efetuado, período correspondente à eliminação dos parasitos, os camundongos foram sacrificados por meio de deslocamento cervical. Os vermes foram coletados através da perfusão do sistema porta-hepático (Yolles *et al.*, 1947) e foram contados os números de machos, fêmeas e casais encontrados.

Em seguida, foi retirada uma pequena porção do fígado para a obtenção de cortes histológicos, com o intuito de observar como o fármaco agiu na formação dos granulomas. Este foi fixado em formol 10%. O restante desse órgão, mais o intestino, baço e os pulmões, foram comprimidos em placas de vidro (Delgado *et al.*, 1992) e tiveram anotados: **1.** a quantidade de granulomas por meio de uma escala visual, vista nas figuras 2 a 5, (“+” poucos granulomas; “++” uma quantidade intermediária; “+++” muitos granulomas e “-” ausência de granuloma/órgão limpo); **2.** a presença ou ausência de vermes nesses órgãos, para a verificação do deslocamento do verme no sistema porta-hepático para outros locais e **3.** quando possível, o sexo dos vermes ou a formação de casais.

Do intestino delgado foram retirados fragmentos para realização do oograma onde foram contados os ovos nos seus diferentes estágios de maturidade (1º a 5º estágio e ovos mortos), a fim de saber se o fármaco interferiu na viabilidade dos mesmos (Hermeto *et al.*, 1994). Para tanto, eram analisados 10 campos aleatórios, no microscópio óptico com o aumento de 100 vezes. A classificação dos estágios de desenvolvimento seguiu o critério proposto por Pellegrino *et al.* (1962): 1º estágio: o embrião ocupa um terço do diâmetro transversal do ovo; 2º estágio: o embrião tem tamanho aproximadamente igual ao diâmetro do ovo; 3º estágio: o embrião ocupa dois terços do diâmetro longitudinal do ovo; 4º estágio: o embrião ocupa praticamente todo o ovo; 5º estágio ou maduro: o miracídio já está completamente desenvolvido.

As fezes dos camundongos também foram analisadas, após 15 dias de tratamento, utilizando-se o método quantitativo de Kato & Miura (1954) modificado por Katz *et al.* (1972) para a contagem de ovos.

Todos os procedimentos acima relatados foram também realizados para os grupos de animais Controle, ou seja, aqueles que receberam somente o Tampão Tris.

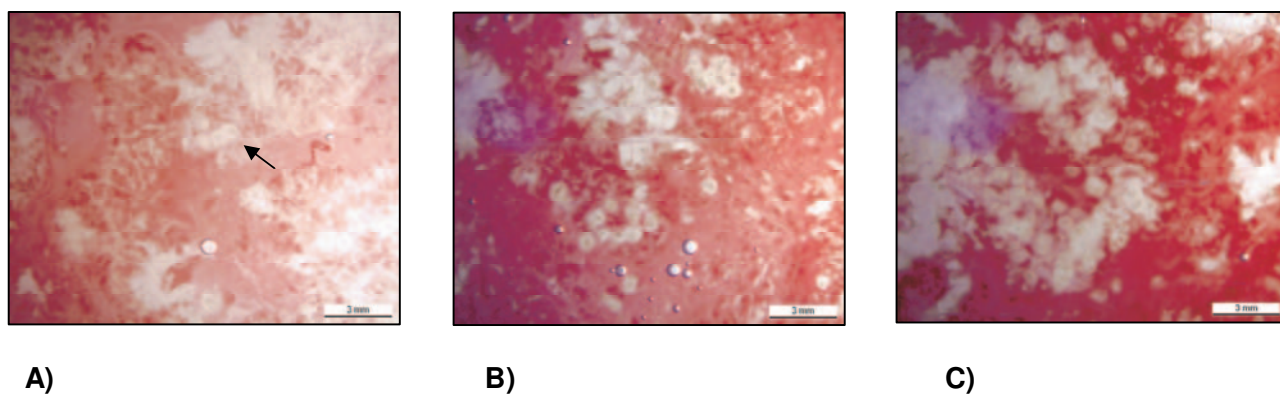


Figura 2: Escala visual de granulomas no baço. A) granuloma +, B) granuloma ++, C) granuloma +++. A seta aponta para um granuloma.

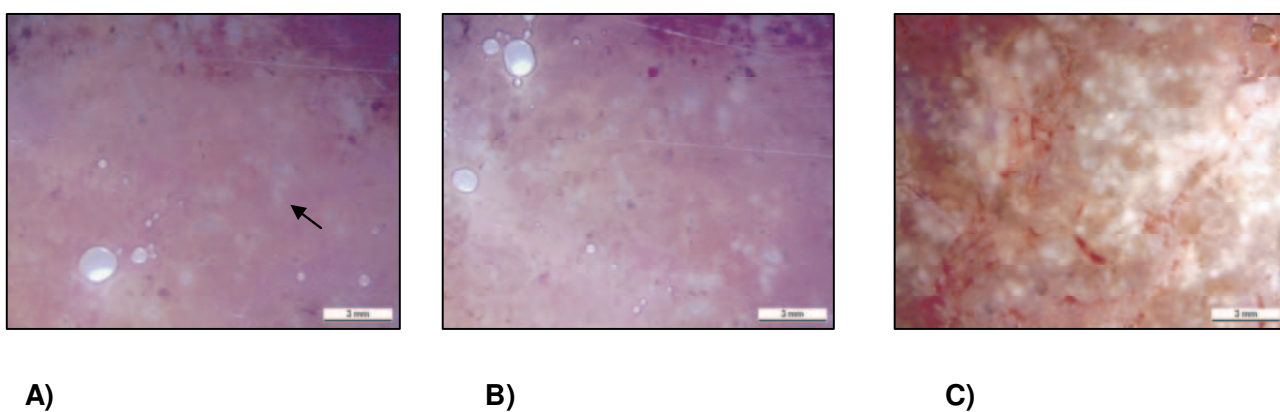


Figura 3: Escala visual de granulomas no fígado. A) granuloma +, B) granuloma ++, C) granuloma +++. A seta aponta para um granuloma.

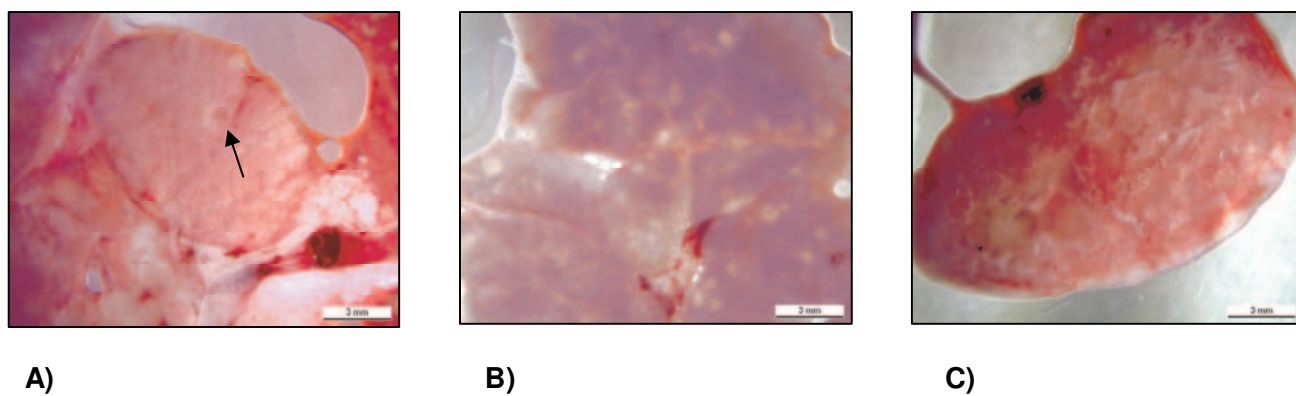


Figura 4: Escala visual de granulomas nos pulmões. A) granuloma +, B) granuloma ++, C) granuloma +++. A seta aponta para um granuloma.

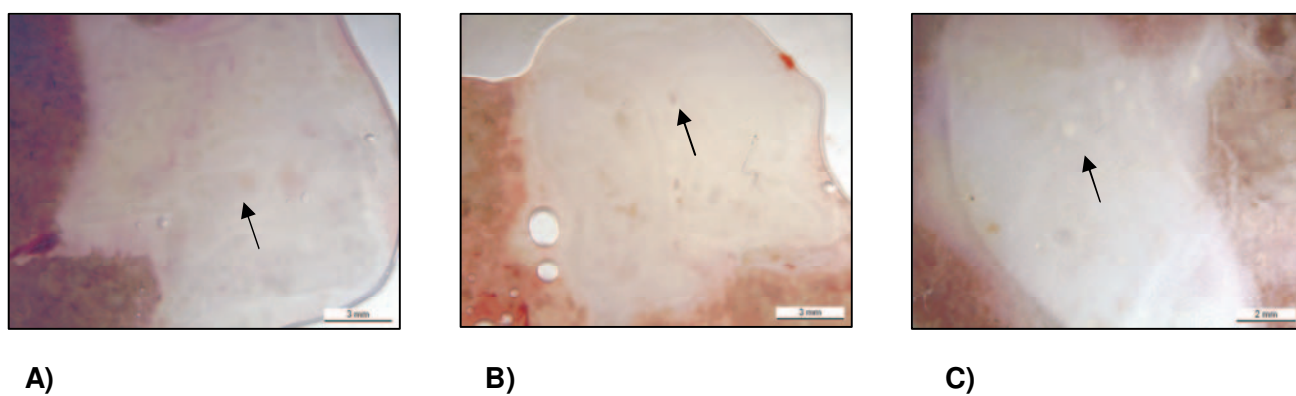


Figura 5: Escala visual de granulomas em fragmento do intestino delgado. A) granuloma +, B) granuloma ++, C) granuloma +++. A seta aponta para um granuloma.

- **Observações Histológicas**

As porções do fígado retiradas e fixadas em formol 10% foram submetidas a cortes histológicos. Para tanto foram escolhidas aleatoriamente três fígados correspondente a cada tratamento (PRZ livre, PRZ+LPZ e Tampão Tris) em cada dosagem para fazer os cortes. A coloração foi feita pela Hematoxilina de Ehrlich e Eosina Y 0,5% e a espessura dos cortes foi de 5 μ m. Posteriormente os granulomas foram medidos com o auxílio do programa "Image Manager 50".

- **Análises Estatísticas**

Para análises estatísticas dos dados obtidos foram aplicados o Teste de Comparação Múltipla de Médias de Duncan e a Análise da Variância.

O Teste de Comparação Múltipla de Médias de Duncan (considerando-se estatisticamente significativos os valores comparados ao nível de significância de $p \leq 0,05$) foi utilizado para:

- Comparação entre os dois dias de tratamento e as diferentes doses testadas (por exemplo: comparação do grupo PRZ livre 40 mg/kg com tratamento feito no 30º dia de infecção com o PRZ livre 40 mg/kg tratado no 45º dia de infecção; PRZ+LPZ 40 mg/kg tratado no 30º dia de infecção com o PRZ+LPZ 40 mg/kg tratado no 45º dia de infecção);

- Comparação entre as diferentes doses para tratamentos feitos no mesmo período (por exemplo: comparação do grupo PRZ livre 40 mg/kg, PRZ livre 47 mg/kg, PRZ livre 60 mg/kg, PRZ livre 250 mg/kg e PRZ livre 300 mg/kg com tratamentos feitos no 30º dia de infecção; PRZ+LPZ 40 mg/kg, PRZ+LPZ 47 mg/kg, PRZ+LPZ 60 mg/kg, PRZ+LPZ 250 mg/kg e PRZ+LPZ 300 mg/kg tratados no 30º dia de infecção);
- Comparação entre as diferentes preparações contendo PRZ e as suas respectivas doses, para tratamentos feitos no mesmo período (por exemplo: comparação do grupo PRZ livre 40 mg/kg com o grupo PRZ+LPZ 40 e CONTROLE deste grupo para tratamento feito no 30º dia de infecção; PRZ livre 40 mg/kg com PRZ+LPZ 40,35 e CONTROLE deste grupo para tratamento feito no 45º dia de infecção).

O teste de Duncan foi o escolhido por ser mais detalhado, indicando resultados significativos em casos em que o teste de Turkey não permite obter significação estatística (Pimentel-Gomes, 2000).

Os testes estatísticos foram realizados com o auxílio do programa SAS (SAS Inc., 1996).

A razão relativa ao sexo (RRS) foi calculada conforme a fórmula abaixo (Delgado *et al.*, 1992):

$$RRS = \frac{\text{Vermes adultos Macho/Fêmea no grupo tratado}}{\text{Vermes adultos Macho/Fêmea no grupo Controle Positivo}}$$

A eficácia dos tratamentos foi avaliada pelo porcentual de redução no número de vermes (RV) dos grupos tratados em relação aos grupos controles

positivos. A RV foi calculada através da quantidade média de vermes vivos encontrados durante a perfusão do sistema porta-hepático, como mostra a fórmula seguinte (Delgado *et al.*, 1992):

$$RV = \frac{\text{Grupo Controle Positivo} - \text{Grupo Tratado}}{\text{Grupo Controle Positivo}} \times 100$$

A fórmula acima também se aplica para o cálculo da redução do número de ovos (RO), através da quantidade média de ovos encontrados nas fezes.

IV - RESULTADOS

Efeito dos tratamentos nos vermes adultos de *Schistosoma mansoni*.

- O dia de tratamento (30 ou 45 dias após a infecção), para cada dose das preparações contendo Praziquantel (PRZ) livre e incorporado a lipossomas (PRZ+LPZ) testadas, alterou a quantidade de vermes adultos dentro do sistema porta-hepático e nas vísceras (fígado, intestino, baço e pulmões)? (Figura 6; Tabelas 1 e 2)

O dia de tratamento alterou a quantidade de vermes adultos dentro do sistema porta hepático e nas vísceras, dependendo da dose e da preparação contendo PRZ administradas. Assim, o grupo de camundongos tratados com PRZ livre na dose de 40 mg/kg apresentou menor quantidade de vermes nas vísceras quando o tratamento foi efetuado aos 45 dias de infecção, tendo em média 0,3 vermes por camundongo, enquanto que aos 30 dias apresentou média de 6 vermes ($p=0,0048$). Já o grupo tratado com PRZ+LPZ, não apresentou diferença estatística significativa quanto à média de vermes dentro do sistema porta hepático e nas vísceras em relação aos dias de tratamento, apesar de ter sido encontrado, conforme as tabelas 1 e 2, 0,6 vermes nas vísceras no grupo tratado no 30º dia de infecção e 1,9 vermes, no grupo tratado no 45º dia.

O grupo tratado com PRZ livre na dose de 60 mg/kg apresentou menor quantidade de vermes no sistema porta hepático no tratamento feito aos 30 dias (14,7 vermes por camundongo e 21,4 vermes no grupo tratado aos 45 dias de infecção; $p=0,0096$). Não houve diferença significativa para o grupo PRZ+LPZ.

O grupo tratado aos 30 dias com PRZ livre na dose de 250 mg/kg apresentou menor quantidade de vermes dentro do sistema porta hepático (9,8 vermes) do que o grupo que recebeu o tratamento aos 45 dias de infecção (14 vermes; $p=0,0494$). Não houve diferença significativa para o grupo PRZ+LPZ.

O grupo tratado com PRZ+LPZ na dose de 300 mg/kg, aos 45 dias de infecção teve menor quantidade de vermes no sistema porta hepático (3,3 vermes por camundongo e 7,3 vermes no grupo tratado aos 30 dias de infecção; $p=0,0424$). O grupo tratado com PRZ livre não apresentou diferença significativa para a quantidade de vermes dentro do sistema porta hepático e nas vísceras.

- A dose, para cada preparação contendo PRZ (PRZ livre ou PRZ incorporado a lipossomas – PRZ+LPZ) testada, alterou a quantidade de vermes adultos dentro do sistema porta hepático e nas vísceras? (Figura 6; Tabelas 1 e 2)

As doses alteraram a quantidade de vermes dentro do sistema porta hepático e nas vísceras. Assim, para o grupo tratado com PRZ livre aos 30 dias de infecção as doses alteraram a quantidade de vermes dentro do sistema porta hepático e nas vísceras ($p=0,0138$ e $p=0,0004$ respectivamente), apresentando menor número de vermes por camundongo dentro desse sistema a dose de 40 mg/kg (8,8 vermes) e nas vísceras a dose de 300 mg/kg (0,4 vermes). A dose de 47 mg/kg apresentou 13,5 vermes dentro do sistema porta hepático, a de 60 mg/kg, 14,7 vermes, a de 250 mg/kg, 9,8 vermes e a de 300 mg/kg, 9,7 vermes. Nas vísceras a dose de 40 mg/kg apresentou 6 vermes, a de 47 mg/kg 1,7 vermes, a de 60 mg/kg, 1,2 vermes e a de 250 mg/kg, 0,8 vermes.

Para o grupo tratado com PRZ+LPZ aos 30 dias de infecção, não houve alteração na quantidade de vermes encontrados nas vísceras. No entanto em relação à quantidade de vermes dentro do sistema porta-hepático, a dose de 300

mg/kg apresentou a menor quantidade (7,3 vermes por camundongo; $p<0,0001$) do que as demais (40 mg/kg com 12 vermes, 47 mg/kg com 21,4 vermes, 60 mg/kg com 17,7 vermes e 250 mg/kg com 8,5 vermes).

O grupo tratado com PRZ livre aos 45 dias de infecção, não apresentou alteração na quantidade de vermes nas vísceras. A quantidade de vermes dentro do sistema porta-hepático foi menor para a dose de 300 mg/kg (média de 8,7 vermes por camundongo, $p=0,0002$). As demais doses apresentaram: 40 mg/kg, 8,7 vermes, 47 mg/kg, 11,1 vermes, 60 mg/kg, 21,4 vermes e 250 mg/kg, 14 vermes.

O grupo tratado com PRZ+LPZ aos 45 dias de infecção apresentou alteração tanto na quantidade de vermes dentro do sistema porta hepático como nas vísceras. A dose de 250 mg/kg apresentou menor quantidade de vermes nas vísceras (0,3 vermes por camundongo; $p=0,0079$). A dose de 300 mg/kg apresentou menor quantidade de vermes dentro do sistema (3,3 vermes, $p<0,0001$). As demais doses apresentaram: 40 mg/kg, 0,6 vermes fora e 11,8 vermes dentro, 47 mg/kg, 0,9 vermes nas vísceras e 15,5 vermes dentro, 60 mg/kg, 1,4 vermes nas vísceras e 21 vermes dentro e 250 mg/kg, 0,3 vermes nas vísceras e 5,6 vermes dentro.

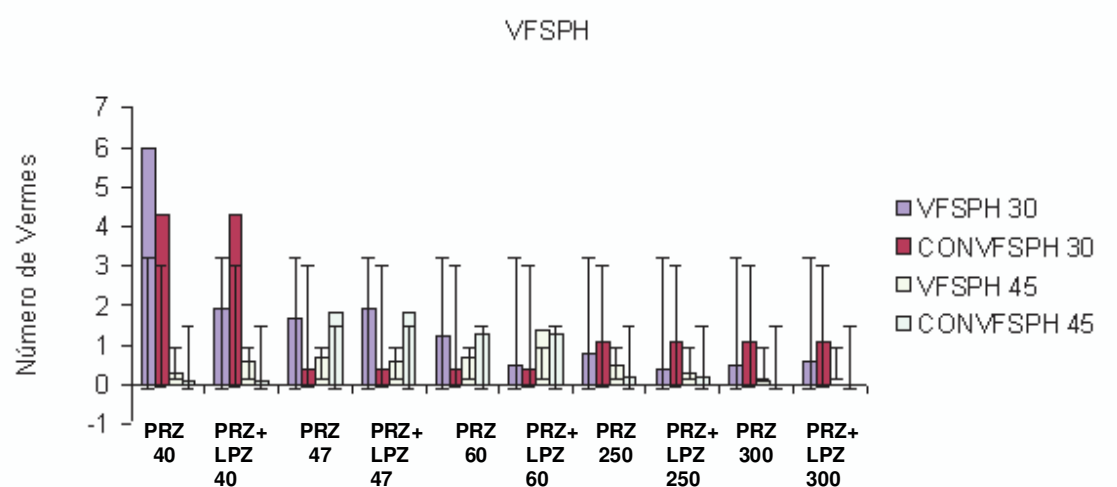
- As preparações contendo PRZ (PRZ livre ou PRZ incorporado a lipossomas – PRZ+LPZ) utilizadas alteraram a quantidade de vermes adultos dentro do sistema porta hepático e nas vísceras? (Figura 6; Tabelas 1 e 2)

O tipo de preparação administrada interferiu na quantidade de vermes encontrados no sistema porta-hepático, mas não na quantidade de vermes nas vísceras.

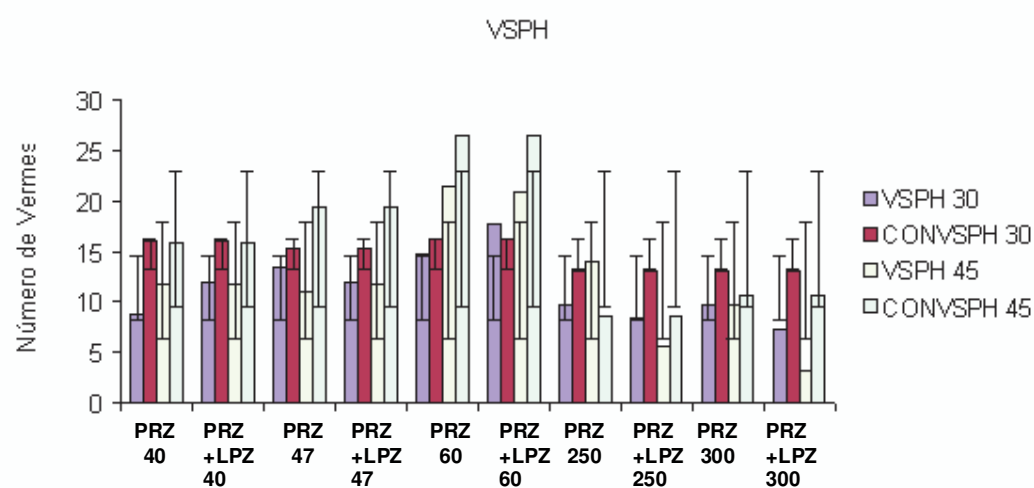
Dessa forma, o grupo tratado com PRZ livre na dose 47 mg/kg aos 30 e aos 45 dias de infecção apresentou menor quantidade de vermes no sistema porta hepático (13,5 e 11,1 vermes por camundongo respectivamente; $p=0,0381$) do que o grupo PRZ+LPZ (21,4 vermes no grupo tratado aos 30 dias e 15,5 aos 45 dias) e o Controle Positivo (15,4 vermes no grupo tratado aos 30 dias com Tampão Tris e 19,5 aos 45 dias).

O grupo tratado com PRZ+LPZ na dose de 250 mg/kg aos 45 dias de infecção apresentou menor quantidade de vermes no sistema porta hepático (5,6 vermes por camundongo; $p=0,0081$) do que o grupo PRZ livre (14 vermes) e o Controle Positivo (8,6 vermes).

O grupo tratado com PRZ livre 300 mg/kg aos 30 dias de infecção apresentou menor quantidade de vermes no sistema porta hepático (9,7 vermes por camundongo; para o grupo tratado com PRZ+LPZ e o Controle positivo a quantidade foi de 7,3 e 13 vermes respectivamente; $p=0,0249$). Já o grupo tratado com PRZ+LPZ nessa mesma dose, mas aos 45 dias, teve menor quantidade de vermes dentro do sistema porta hepático (3,3 vermes por camundongo, $p=0,0112$) do que o grupo tratado com PRZ livre (8,7 vermes) e o Grupo Controle Positivo (10,6 vermes).



A.



B.

Figura 6: A. Quantidade de Vermes Adultos nas Visceras – Vermes fora do Sistema Porta-Hepático e no Fígado (VFSPH). B. Quantidade de Vermes Adultos no Sistema Porta Hepático (VSPH).

30/45 - Referente ao dia da administração do fármaco. CON – Referentes aos Grupos Controles Positivos. PRZ 40...300 – Grupo Praziquantel 40 mg/kg...300 mg/kg. PRZ+LPZ 40...300 – Grupo Praziquantel-Lipossoma 40 mg/kg ... 300 mg/kg.

- As preparações contendo PRZ (PRZ livre ou PRZ incorporado a lipossomas – PRZ+LPZ) testadas, suas referidas doses e dias de tratamento, alteraram a proporção entre vermes adultos, machos e fêmeas (Razão Relativa ao Sexo)?

Nos grupos de camundongos tratados com PRZ livre aos 30 dias houve um decréscimo no número de fêmeas. Já os grupos tratados com PRZ+LPZ aos 30 dias de infecção, nas doses 40 mg/kg, 60 mg/kg e 250 mg/kg houve uma diminuição no número de machos e para as outras doses 47 e 300 mg/kg, uma diminuição no número de fêmeas (Tabela 1).

Nos grupos de camundongos tratados com PRZ livre aos 45 dias de infecção, houve um decréscimo de fêmeas para as doses de 40 mg/kg, 47 mg/kg e 60 mg/kg. Já os grupos tratados com essa mesma preparação, porém, nas doses 250 e 300 mg/kg houve uma diminuição no número de machos. Nos grupos tratados com PRZ+LPZ nas doses de 40 mg/kg, 47 mg/kg e 60 mg/kg aos 45 dias de infecção, houve decréscimo de fêmeas e as doses de 250 e 300 mg/kg apresentaram diminuição dos vermes machos (Tabela 2).

- As preparações contendo PRZ (PRZ livre ou PRZ incorporado a lipossomas – PRZ+LPZ) testadas reduziram o número de vermes adultos no interior do sistema porta hepático, em relação ao Grupo Controle Positivo?

De acordo com as Tabelas 1 e 2 a redução dos vermes adultos no sistema porta hepático dependeu da preparação e dosagens utilizadas, além do dia em que o tratamento ocorreu.

Não apresentaram redução na quantidade de vermes em relação ao Grupo Controle Positivo os grupos PRZ+LPZ 47mg/kg e PRZ+LPZ 60 mg/kg com

tratamento aos 30 dias de infecção e PRZ livre 250 mg/kg com tratamento aos 45 dias de infecção.

Tabela 1: Efeito das doses de Praziquantel livre (PRZ) e incorporado ao lipossoma (PRZ+LPZ) sobre a população de vermes adultos de *Schistosoma mansoni*. Tratamento aos 30 dias de infecção.

30 dias		Preparação		VSPH						VFSPH		RRS	RV
Dose (mg/kg)				Casal		Macho		Fêmea		Total			
		$\bar{X}$	%	$\bar{X}$	%	$\bar{X}$	%	$\bar{X}$	%	$\bar{X}$	%		%
40	CON	0,6	3,7	15,1	93,8	0,4	2,4	16,1	78,9	4,3	21	1	-
	PRZ	1,3	14,7	7,4	84,1	0,1	1,1	8,8	59,4	6	40,5	1,9	45,3
	PRZ+LPZ	3,8	28,3	1,2	60	2,2	11,6	12	88,2	1,9	11,7	0,1	25,4
47	CON	9,2	59,7	3,4	22	2,8	18,1	15,4	97,4	0,4	2,5	1	-
	PRZ	9,8	74,8	3	21,4	1,2	3,7	13,5*	89,4	1,7	10,6	4,8	12,3
	PRZ+LPZ	5,7	26,6	10,5	49	5,2	24,3	21,4	96,4	0,8	3,6	1,6	-
60	CON	8,6	49,1	4,4	39,5	2,8	11,3	16,2	97,6	0,4	2,3	1	-
	PRZ	6,8	46,5	6,4	43,8	1,4	9,6	14,7	92,4	1,2	7,6	1,3	9,2
	PRZ+LPZ	8,5	48,9	3,1	35,7	1,8	15,3	17,7	97,3	0,5	2,6	0,6	-
250	CON	6,5	52	4	28	2,5	20	13	91,4	1,1	8,5	1	-
	PRZ	4,8	49,3	3,1	31,6	1,8	18,9	9,8	91,8	0,8	8,1	1,1	24,6
	PRZ+LPZ	3,6	50,5	1,2	16,4	3,4	32,9	8,5	95,5	0,4	4,5	0,3	34,6
300	CON	6,5	66,6	4	14,4	2,5	18,8	13	99,3	1,1	0,6	1	-
	PRZ	6,3	64,9	1,9	19,5	1,5	15,4	9,7	96	0,4	3,9	1,6	43,8
	PRZ+LPZ	3,8	54,9	1,2	14	2,2	30,9	7,3*	92,2	0,6	7,8	1,1	25

VSPH – Vermes no Sistema Porta Hepático. VFSPH – Vermes Fora do Sistema Porta Hepático e no Fígado – Referente ao Encontro de Vermes nas Visceras. RRS – Razão Relativa ao Sexo. RV – Redução do Número de Vermes. CON – Grupo Controle Positivo. $\bar{X}$ – Média. * - $p \leq 0,05$.

Tabela 2: Efeito das doses de Praziquantel livre (PRZ) e incorporado ao lipossoma (PRZ+LPZ) sobre a população de vermes adultos de *Schistosoma mansoni*. Tratamento aos 45 dias de infecção.

45 dias	Preparação	VSPH								VFSPH		RRS	RV
	Dose (mg/kg)	Casal		Macho		Fêmea		Total					
		$\bar{X}$	%	$\bar{X}$	%	$\bar{X}$	%	$\bar{X}$	%	$\bar{X}$	%		%
40	CON	0,6	66,6	15,1	14,4	0,4	18,8	16,1	99,3	6	0,6	1	-
	PRZ	5	42,3	5,1	43,2	1,7	14,4	8,7	98,3	0,3	1,6	3,9	25,7
	PRZ+LPZ	8,5	72	1,7	14,4	1,6	13,5	11,8	95,1	0,6	4,8	1,3	25,7
47	CON	9	45,3	5,2	27,3	5,5	27,3	19,5	91,4	1,8	8,5	1	-
	PRZ	5,2	44,2	3,8	32,8	2	22,9	11,1*	91,6	0,7	8,4	1,4	43
	PRZ+LPZ	6,9	44,1	4,9	38,3	3,8	17,4	15,5	94,5	0,9	5,5	2,2	20,5
60	CON	8,4	33	11,1	43,7	5,9	23,2	26,4	92,3	1,3	7,6	1	-
	PRZ	12	56	6,6	30,8	2,8	13	21,4	92,7	0,7	4	1,2	18,9
	PRZ+LPZ	8,5	46,3	6,9	42,7	2,5	10,9	21	95,9	1,4	7,2	2	20,4
250	CON	5,6	59,3	2	21,1	1,6	19,5	8,6	96,8	0,2	3,1	1	-
	PRZ	8,1	55,6	2	19	3,8	25,3	14	95,3	0,5	4,7	0,6	-
	PRZ+LPZ	3,2	75,7	0,5	12,1	0,5	12,1	5,6*	93,4	0,3	6,6	0,9	34,8
300	CON	7,6	44,2	1,3	32,7	1,6	22,9	10,6	100	0	0	1	-
	PRZ	4,8	53,9	1	14,1	2,8	31,9	8,7	99,4	0,1	0,6	0,3	17,9
	PRZ+LPZ	1,4	42,4	1,1	33,3	0,8	24,2	3,3*	82,5	0,6	17,5	0,9	68,8

VSPH – Vermes no Sistema Porta Hepático. VFSPH – Vermes Fora do Sistema Porta Hepático e no Fígado – Referente ao Encontro de Vermes nas Visceras. RRS – Razão Relativa ao Sexo. RV – Redução do Número de Vermes. CON – Grupo Controle Positivo. $\bar{X}$ – Média. * - $p \leq 0,05$.

Efeito dos tratamentos nos ovos de *Schistosoma mansoni*.

- O dia de tratamento (30 ou 45 dias após a infecção) alterou a quantidade de ovos por grama de fezes (OPG)? (Figura 7; Tabelas 3 e 4)

Somente para o grupo tratado com a dose de 40 mg/kg houve OPG alterada em relação ao dia de tratamento (Tabelas 3 e 4). Dessa forma, o grupo tratado com PRZ livre, teve menor OPG (3,8 ovos/grama de fezes; $p=0,0099$) que o tratamento feito aos 45 dias (86,5 ovos/grama de fezes) e o grupo tratado com PRZ+LPZ, aos 30 dias de infecção, apresentou menor OPG (30 ovos/grama de fezes; $p=0,0029$) em relação ao tratamento feito aos 45 dias (200,3 ovos/grama de fezes).

- A dose, para cada preparação contendo PRZ (PRZ livre ou PRZ incorporado a lipossomas – PRZ+LPZ) testada, alterou a quantidade de ovos por grama de fezes (OPG)? (Figura 7; Tabelas 3 e 4)

Sim, as doses alteraram a quantidade de ovos por grama de fezes em todos os tratamentos, tendo sido menos acentuado nos grupos tratados com PRZ livre aos 45 dias de infecção. Assim, no tratamento feito aos 30 dias de infecção com PRZ livre, o grupo de camundongos tratados com a dose de 40 mg/kg foi a que apresentou menor OPG (3,8 ovos/grama de fezes; $p=0,0224$) em relação às outras (a dose de 47 mg/kg apresentou 645,9 ovos/grama de fezes, a de 60 mg/kg, 393,3 ovos/grama de fezes, a de 250 mg/kg, 166,8 ovos/grama de fezes e a de 300 mg/kg, 258,3 ovos/grama de fezes).

Os tratamentos feitos com PRZ+LPZ aos 30 dias de infecção também apresentaram alteração na OPG, sendo que a dose de 250 mg/kg teve a menor OPG (6,3 ovos/grama de fezes; $p<0,0001$). A dose de 40 mg/kg apresentou 30 ovos/grama de fezes, a de 47 mg/kg, 316,5 ovos/grama de fezes, a de 60 mg/kg, 230 ovos/grama de fezes e a de 300 mg/kg, 13,9 ovos/grama de fezes. Para os tratamentos feitos com PRZ+LPZ aos 45 dias de infecção, a menor OPG ocorreu no grupo que recebeu a dose de 300 mg/kg (5 ovos/grama de fezes; $p=0,0123$), enquanto que as outras doses apresentaram 200,3 ovos/grama de fezes, para a dose de 40 mg/kg, 441 ovos/grama de fezes, para a de 47 mg/kg, 220 ovos/grama de fezes, para a de 60 mg/kg e 36,6 ovos/grama de fezes, para a de 250 mg/kg.

- As preparações contendo PRZ (PRZ livre ou PRZ incorporado a lipossomas – PRZ+LPZ) testadas alteraram a quantidade de ovos por grama de fezes (OPG)? (Figura 7; Tabelas 3 e 4)

Para os tratamentos feitos aos 30 dias de infecção, apenas as doses de 250 e 300 mg/kg apresentaram diferenças significativas quanto a OPG em relação às preparações testadas. Dessa forma, os tratamentos feitos com PRZ+LPZ foram os que apresentaram menor OPG (para a dose de 250 mg/kg a OPG foi de 6,3 ovos/grama de fezes; $p=0,0008$; para a dose de 300 mg/kg a OPG foi de 13,9 ovos/grama de fezes; $p=0,0019$) em relação ao feito com PRZ livre (para a dose de 250 mg/kg a OPG foi de 166,8 ovos/grama de fezes e para a de 300 mg/kg a OPG foi igual a 258,3 ovos/grama de fezes) e ao Grupo Controle Positivo (o Grupo Controle dos tratamentos feitos com 250 e 300 mg/kg apresentaram 760 ovos/grama).

Para os tratamentos feitos aos 45 dias de infecção, a dose de 40 mg/kg apresentou alteração na OPG em relação às preparações testadas. Neste caso, o grupo tratado com PRZ livre foi o que apresentou menor OPG (86,5 ovos/grama de fezes; $p=0,0056$) em comparação ao PRZ+LPZ (200,3 ovos/grama de fezes) e

ao Grupo Controle Positivo (441,9). Já para a dose de 250 mg/kg, o grupo tratado com PRZ+LPZ foi o que apresentou menor OPG (36,6 ovos/grama de fezes; $p=0,0002$). O grupo tratado com PRZ livre nessa mesma dose apresentou 290,6 ovos/grama de fezes e o Controle Positivo, 341 ovos/grama de fezes. O grupo tratado com PRZ+LPZ 300 mg/kg foi o que apresentou menor OPG (5 ovos/grama de fezes; $p=0,0231$) em comparação ao grupo PRZ livre (200,5 ovos/grama de fezes) e Grupo Controle Positivo (259 ovos/grama de fezes).

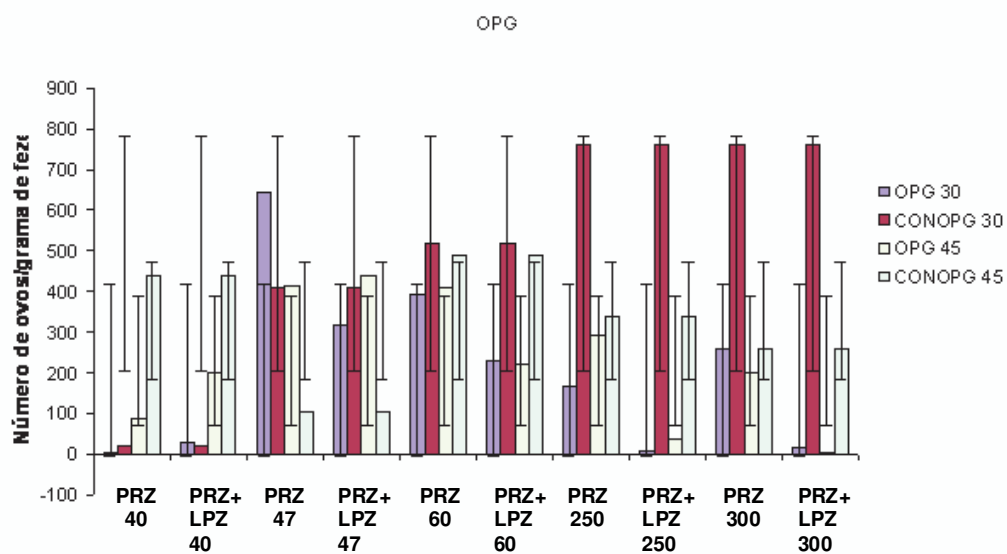


Figura 7: Quantidade de ovos por grama de fezes.

OPG 30/45 – Ovos/grama de fezes nos grupos tratados aos 30/45 dias de infecção. CONOPG 30/45 – Ovos/grama de fezes nos Grupos Controles Positivos dos grupos tratados aos 30/45 dias de infecção. PRZ 40...300 mg/kg – Grupo Praziquantel livre 40...300 mg/kg. PRZ+LPZ 40...300 mg/kg – Grupo Praziquantel-Lipossoma 40...300mg/kg.

- O dia de tratamento (30 ou 45 dias após a infecção) alterou a quantidade de ovos imaturos, maduros e mortos no intestino? (Figura 8: A e B; Tabelas 3 e 4)

O dia de tratamento alterou a quantidade de ovos nos diferentes estágios, dependendo da dose e das preparações utilizadas. Assim, para o tratamento feito com PRZ livre na dose de 40 mg/kg aos 30 dias de infecção, não houve ovos nos primeiros estágios de desenvolvimento (ovos imaturos ou de 1º a 4º estágios) e ovos mortos no intestino. Já no grupo tratado aos 45 dias apresentaram 20,6 ovos imaturos ($p < 0,0001$) e 0,8 ovos mortos ($p = 0,0248$).

Para a dose de 47 mg/kg, o grupo tratado com PRZ livre aos 30 dias de infecção apresentou menor quantidade de ovos maduros (6,7 ovos; $p = 0,0358$) do que aquele que recebeu tratamento aos 45 dias de infecção (7,1 ovos). O grupo tratado com essa mesma dosagem, mas com a preparação contendo PRZ+LPZ aos 30 dias de infecção, apresentou menor quantidade de ovos imaturos e maduros (5,8 e 4 ovos; $p < 0,0001$ e $p = 0,025$ respectivamente) em relação ao grupo que recebeu tratamento aos 45 dias (31,5 e 11,6 ovos).

Para a dose de 60 mg/kg houve alteração na quantidade de ovos maduros no grupo tratado com PRZ livre, sendo menor quando o tratamento foi feito aos 30 dias de infecção (3,1 ovos aos 30 dias e 20,3 ovos aos 45 dias; $p = 0,0013$). Para o grupo tratado com PRZ+LPZ nessa mesma dose, houve menor quantidade de ovos maduros no grupo tratado aos 30 dias de infecção (8,5 ovos; $p = 0,0418$) em relação ao que recebeu tratamento aos 45 dias de infecção (17,7 ovos).

No grupo tratado com PRZ livre na dose de 250 mg/kg aos 30 dias de infecção, a quantidade de ovos maduros foi menor (3 ovos; $P = 0,003$) que aos 45 dias (14,6 ovos). No grupo tratado com PRZ+LPZ nesta mesma dose, a quantidade de ovos imaturos foi menor para o tratamento aos 45 dias (8,5 ovos e aos 30 dias 16,7 ovos; $p = 0,0116$).

No tratamento feito com a dose de 300 mg/kg com a preparação contendo PRZ livre, a quantidade de ovos nos primeiros estágios foi menor no grupo tratado aos 45 dias de infecção (10,5 ovos; $p=0,008$) do que aos 30 dias (24,7 ovos).

- A dose, para cada preparação contendo PRZ (PRZ livre ou PRZ incorporado a lipossomas – PRZ+LPZ) testada, alterou a quantidade de ovos imaturos, maduros e mortos no intestino? (Figura 8; Tabelas 3 e 4)

Para os grupos tratados com PRZ livre aos 30 dias de infecção, houve alteração na quantidade de ovos em todos os estágios de desenvolvimento. Sendo assim, a menor quantidade de ovos imaturos, maduros e mortos ocorreram na dose de 40 mg/kg (0 e $p=0,0016$; 0,1 e $p=0,183$; 0 e $p=0,0018$, respectivamente). As doses 47, 60, 250 e 300 mg/kg apresentaram respectivamente 12,7 ovos imaturos, 6,7 ovos maduros e 2,7 ovos mortos; 18,1 imaturos, 3,1 maduros e 2,9 mortos; 15,5 imaturos, 3 maduros e 1,1 mortos; 24,7 imaturos, 5 maduros e 4 mortos.

Para os grupos tratados com PRZ+LPZ aos 30 dias de infecção, houve alteração na quantidade de ovos imaturos e maduros. As doses 47 e 300 mg/kg apresentaram menor quantidade de ovos imaturos com 5,8 ovos cada ($p=0,0095$) em relação às doses 40 mg/kg (17,6 ovos), 60 mg/kg (17,3 ovos) e 250 mg/kg (16,7 ovos). Quanto aos ovos maduros, apresentou menor quantidade destes a dose de 300 mg/kg, com 0,9 ovos ($p=0,0082$) enquanto que a de 40 mg/kg apresentou 7,9 ovos, a de 47, 4 ovos, a de 60 mg/kg, 8,5 ovos, a de 250 mg/kg, 5,9 ovos. Não houve alteração na quantidade de ovos mortos.

Os grupos tratados com PRZ livre aos 45 dias de infecção, apresentaram alteração apenas para a quantidade de ovos maduros. A dose 47 mg/kg apresentou menor quantidade de ovos maduros (7,1 ovos; $p=0,05$) em seguida da

de 300 mg/kg (8,8 ovos). A dose de 40 mg/kg apresentou 13,7 ovos; a de 60 mg/kg, 20,3; a de 250 mg/kg, 14,6 ovos e a de 300 mg/kg, 8,8.

Os grupos tratados com PRZ+LPZ aos 45 dias de infecção, tiveram alteradas as quantidades de ovos imaturos e maduros. A quantidade de ovos mortos não foi alterada. Assim, a dose que apresentou menor quantidade de ovos imaturos foi a de 300 mg/kg, com 3,1 ovos ($p<0,0001$) em relação às outras (40 mg/kg com 21,7 ovos; 47 mg/kg com 31,5 ovos; 60 mg/kg com 25 ovos e 250 mg/kg com 8,5 ovos). A dose de 250 mg/kg apresentou menor quantidade de ovos maduros (4,5 ovos; $p=0,0036$) em seguida da de 300 mg/kg com 5 ovos. As demais doses apresentaram: 40 mg/kg, 7,4 ovos; 47 mg/kg, 11,6 ovos e 60 mg/kg, 17,7 ovos.

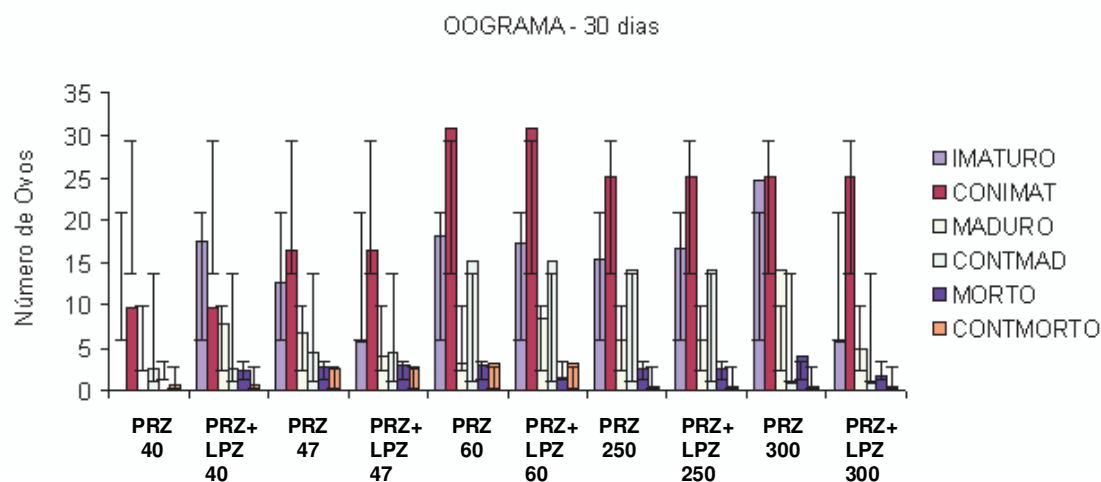
- As preparações contendo PRZ (PRZ livre ou PRZ incorporado a lipossomas – PRZ+LPZ) testadas alteraram a quantidade de ovos imaturos, maduros e mortos no intestino? (Figura 8; Tabelas 3 e 4)

As preparações utilizadas alteraram a quantidade de ovos nos diferentes estágios de desenvolvimento no intestino, dependendo da dose administrada. Dessa forma, o grupo tratado com a dose de 40 mg/kg, aos 30 dias de infecção, a quantidade de ovos maduros foi menor para a preparação contendo PRZ livre (0,1 ovos; $p=0,0026$). Não houve ovos imaturos e mortos no grupo tratado com esta preparação. A quantidade de ovos imaturos, maduros e mortos (respectivamente) para as demais doses foi: 17,6 ovos, 7,9 e 2,4 para a preparação contendo PRZ+LPZ e 9,8 ovos, 2,5 e 0,7 para o Grupo Controle Positivo. Para os grupos tratados aos 45 dias de infecção a quantidade de ovos maduros foi menor para a preparação contendo PRZ+LPZ (7,4 ovos; $p=0,129$). A preparação contendo PRZ livre apresentou 13,7 ovos maduros e o Grupo Controle Positivo, 25.

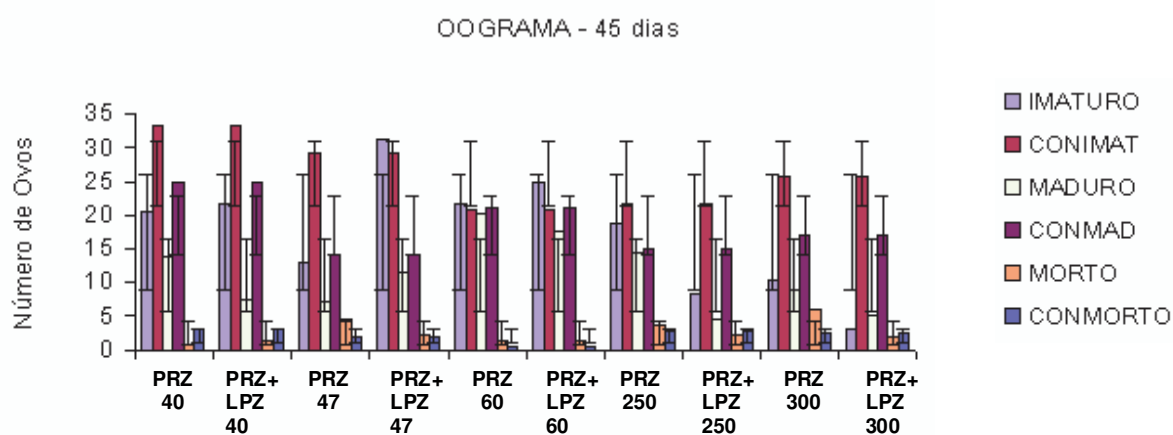
Os grupos tratados com a dose de 60 mg/kg após 30 dias de infecção, apresentaram alteração na quantidade de ovos maduros, sendo menor para a preparação contendo PRZ livre (3,1 ovos; $p=0,0161$) em comparação ao PRZ+LPZ (8,5 ovos) e ao Grupo Controle Positivo (15,1 ovos).

Para os grupos tratados com a dose de 250 mg/kg, aos 30 dias de infecção, houve alteração na quantidade de ovos maduros, sendo menor para a preparação contendo PRZ livre (3 ovos; $p=0,0093$) enquanto que o PRZ+LPZ apresentou 5,9 ovos e o Grupo Controle Positivo, 14,1 ovos. Para os grupos tratados com essa mesma dose, mas aos 45 dias de infecção, a quantidade de ovos imaturos e maduros foi alterada sendo menores para o PRZ+LPZ (8,5 ovos imaturos e 4,5 maduros; $p=0,0007$ e $0,0021$ respectivamente). O grupo tratado com PRZ livre apresentou 18,8 ovos imaturos e 14,6 maduros e o Grupo Controle Positivo, 21,7 e 15,2 ovos, respectivamente.

Para a dose de 300 mg/kg, administrada aos 30 dias de infecção, a quantidade de ovos imaturos foi menor para a preparação contendo PRZ+LPZ (5,8 ovos; $p=0,0043$) do que para o PRZ livre (24,7 ovos) e o Grupo Controle Positivo (25,1 ovos). Já para a quantidade de ovos maduros, o Grupo PRZ+LPZ apresentou menor número desses (0,9 ovos) em relação ao Grupo PRZ livre (5 ovos) e ao Grupo Controle Positivo (14,1 ovos). Nos grupos tratados com 45 dias de infecção, a quantidade de ovos imaturos e maduros foi menor para a preparação contendo PRZ+LPZ (3,1 ovos imaturos e 5 ovos maduros; $p=0,004$ e $0,0356$ respectivamente) em comparação ao PRZ livre (10,5 e 8,8 ovos, respectivamente) e ao Grupo Controle Positivo (25,8 e 17,1 ovos, respectivamente).



A.



B.

Figura 8: Oograma dos grupos tratados aos: **A.** 30 dias de infecção; **B.** 45 dias de infecção.

IMATURO – Ovos de primeiro a quarto estágio de desenvolvimento. MADURO – Ovos de quinto estágio. MORTO – Ovos mortos. CONIMAT – Ovos imaturos no Grupo Controle Positivo. CONTMAD – Ovos maduros no Grupo Controle Positivo. CONTMORTO – Ovos mortos no Grupo Controle Positivo. PRZ 40...300 – Grupo tratado com PRZ livre na dose de 40 mg/kg...300 mg/kg. PRZ+LPZ – Grupo Praziquantel-Lipossoma na dose de 40...300 mg/kg. CON40...300 mg/kg – Grupo Controle Positivo dos grupos tratados com as doses de 40...300 mg/kg.

- As preparações contendo PRZ (PRZ livre ou PRZ incorporado a lipossomas – PRZ+LPZ) testadas reduziram o número de ovos nas fezes, em relação ao Grupo Controle Positivo?

De acordo com a Tabela 3 (tratamento feito 30 dias após a infecção), as maiores reduções no número de ovos nas fezes ocorreram para as doses de PRZ+LPZ 250 e 300 mg/kg (99 e 98% respectivamente). A dose de 40 mg/kg só apresentou redução para o grupo tratado com PRZ livre e a de 47 mg/kg não apresentou redução para nenhuma das preparações. As doses de 60, 250 e 300 mg/kg apresentaram maior redução nos grupos tratados com PRZ+LPZ do que com PRZ livre.

A Tabela 4 mostra que a redução no número de ovos nas fezes, em relação ao Grupo Controle Positivo, ocorre a partir da dose de 60 mg/kg, sendo que houve maior redução para os grupos tratados com PRZ+LPZ. A partir dessa dose, a maior redução de ovos ocorreu no grupo tratado com 300 mg/kg de PRZ+LPZ (98%).

Tabela 3: Efeito das doses de Praziquantel livre (PRZ) e incorporado ao lipossoma (PRZ+LPZ) sobre os ovos de *Schistosoma mansoni*. Tratamento aos 30 dias de infecção.

30 dias	Preparação	OPG	RO	OOGRAMA		
				IMAT	MAD	MORTOS
Dose (mg/kg)		$\bar{X}$	%	$\bar{X}$	$\bar{X}$	$\bar{X}$
40	CON	20,4	-	9,8	2,5	0,7
	PRZ	3,8	81,3	0*	0,1*	0*
	PRZ+LPZ	30	-	17,6	7,9	2,4
47	CON	409,2	-	16,6	4,6	2,6
	PRZ	645,9	-	12,7	6,7	2,7
	PRZ+LPZ	316,5	-	5,8	4	2,9
60	CON	517,3	-	30,9	15,1	3,1
	PRZ	393,3	24	18,1	3,1*	2,9
	PRZ+LPZ	230	55	17,3	8,5	1,5
250	CON	760	-	25,1	14,1	0,5
	PRZ	166,8	78	15,5	3*	1,1
	PRZ+LPZ	6,3*	99	16,7	5,9	2,5
300	CON	760	-	25,1	14,1	0,5
	PRZ	258,3	66	24,7	5	4
	PRZ+LPZ	13,9*	98	5,8*	0,9*	1,7

OPG – Ovos por Grama de Fezes. RO – Redução do Número de Ovos nas Fezes. IMAT – Ovos imaturos (de 1º a 4º estágios de desenvolvimento). MAD – Ovos maduros (ou de 5º estágio). MORTOS – Ovos Mortos.

CON – Grupo Controle Positivo. $\bar{X}$ – Média. * - $p \leq 0,05$.

Tabela 4: Efeito das doses de Praziquantel livre (PRZ) e incorporado ao lipossoma (PRZ+LPZ) sobre os ovos de *Schistosoma mansoni*. Tratamento aos 45 dias de infecção.

45 dias	Preparação	OPG	RO	OOGRAMA		
				IMAT	MAD	MORTOS
Dose (mg/kg)		$\bar{X}$	%	$\bar{X}$	$\bar{X}$	$\bar{X}$
40	CON	441,9	-	33,3	25	3,1
	PRZ	86,5	-	20,6	13,7	0,8
	PRZ+LPZ	200,3	-	21,7	7,4*	1,3
47	CON	104,5*	-	29,1	14	1,8
	PRZ	412,1	-	12,9*	7,1	4,7
	PRZ+LPZ	441	-	31,5	11,6	2,2
60	CON	490	-	20,9	21,1	0,5
	PRZ	408	16,7	21,6	20,3	1,3
	PRZ+LPZ	220	55,1	25	17,7	1,5
250	CON	341	-	21,7	15,28	2,9
	PRZ	290,6	17,7	18,8	14,68	3,6
	PRZ+LPZ	36,6*	89,2	8,58*	4,5	2,2
300	CON	259,6	-	25,8	17,1	2,6
	PRZ	200,5	22,7	10,5	8,8	5,8
	PRZ+LPZ	5*	98	3,1*	5*	1,9

OPG – Ovos por Grama de Fezes. RO – Redução do Número de Ovos nas Fezes. OG1 – Ovos imaturos (de 1º a 4º estágios de desenvolvimento). OG5 – Ovos maduros (ou de 5º estágio). OGM – Ovos Mortos. CON – Grupo Controle Positivo. $\bar{X}$ – Média. * - $p \leq 0,05$.

Efeito dos tratamentos nos granulomas

- As preparações contendo PRZ (PRZ livre ou PRZ incorporado a lipossomas – PRZ+LPZ) utilizadas alteraram o tamanho dos granulomas no fígado? (Tabelas 5 e 6)

De acordo com o Teste de Comparação Múltipla de Médias de Duncan, o tamanho dos granulomas no fígado pode ter sido alterado dependendo não só da preparação, mas também da dose testada e o dia em que o tratamento ocorreu. Dessa forma, a área dos granulomas mostrou-se alterada nos tratamentos feitos aos 30 dias de infecção para as doses 40, 47 e 300 mg/kg. A dose de 40 mg/kg apresentou granulomas menores para o tratamento feito com PRZ+LPZ ($230,9 \mu\text{m}^2$; $p=,0214$) do que com PRZ livre ($372,9 \mu\text{m}^2$) e o Grupo Controle Positivo ($1080 \mu\text{m}^2$).

A dose 47 mg/kg apresentou granulomas menores no grupo de camundongos tratados com PRZ livre ($313,5 \mu\text{m}^2$; $p=0,0323$) enquanto que os camundongos tratados com PRZ+LPZ e o Controle Positivo apresentaram granulomas com área de 510 e $460,5 \mu\text{m}^2$, respectivamente.

No tratamento feito com PRZ+LPZ 300 mg/kg não houve granulomas no fígado dos grupos que foram separados para observações histológicas ($p<0,0001$). Os granulomas do grupo tratado com PRZ livre nessa mesma dose e o Grupo Controle Positivo apresentaram área de 787,6 e $816 \mu\text{m}^2$, respectivamente.

Para os tratamentos feitos aos 45 dias de infecção, apenas a dose de 250 mg/kg apresentou alteração no tamanho dos granulomas, sendo que a preparação contendo PRZ livre apresentou granulomas menores ($408,8 \mu\text{m}^2$; $p=0,0159$) que o grupo tratado com PRZ+LPZ ($505,1 \mu\text{m}^2$) e o Grupo Controle Positivo ($598,5 \mu\text{m}^2$).

- As preparações contendo PRZ (PRZ livre ou PRZ incorporado a lipossomas – PRZ+LPZ) utilizadas alteraram o aspecto dos órgãos internos (fígado, intestino, baço e pulmões) em relação ao Grupo Controle Positivo?

De acordo com as Tabela 5 e 6, algumas doses para determinadas preparações apresentaram alteração na aparência dos órgãos em relação ao grupo controle. Assim, a preparação contendo PRZ+LPZ na dose de 47 mg/kg, administrado aos 30 dias de infecção, apresentou melhora visual (menor quantidade de granulomas) no intestino, no baço e nos pulmões, em relação ao Grupo Controle Positivo. O grupo tratado com PRZ livre nessa mesma dose, também apresentou menos granulomas que o Grupo Controle Positivo no intestino e pulmões.

A dose de 60 mg/kg de PRZ livre e de PRZ+LPZ apresentou melhora nos pulmões em relação ao Controle. O grupo tratado com PRZ+LPZ também apresentou melhora no aspecto do baço.

Para as doses de 250 mg/kg e 300 mg/kg, o grupo tratado com PRZ+LPZ apresentou melhora visual no fígado, em comparação ao Grupo Controle Positivo.

Em relação aos tratamentos feitos aos 45 dias de infecção, a dose de 40 mg/kg apresentou melhora no intestino e pulmões, em comparação ao Grupo Controle Positivo, para as preparações contendo PRZ livre e PRZ+LPZ.

A dose de 47 mg/kg apresentou melhora no intestino e pulmões, para tratamento feito com PRZ livre e PRZ+LPZ. O grupo tratado com a preparação contendo PRZ+LPZ também apresentou melhora no baço.

Para a dose de 60 mg/kg, o grupo que recebeu o tratamento com PRZ+LPZ apresentou menor quantidade de granulomas nos pulmões em relação ao Grupo Controle Positivo.

O grupo tratado com PRZ livre na dose de 250 mg/kg, teve melhora no aspecto de todos os órgãos analisados em relação ao Grupo Controle Positivo. Já o grupo tratado com PRZ+LPZ apresentou melhora no intestino, baço e pulmões.

A dose de 300 mg/kg apresentou melhora no intestino e pulmão em relação ao Grupo Controle Positivo tanto para o tratamento feito com PRZ livre como para PRZ+LPZ.

Tabela 5: Efeito das doses de Praziquantel livre (PRZ) e incorporado ao lipossoma (PRZ+LPZ) sobre os granulomas no fígado, em relação à alteração no tamanho (área) desses, e no aspecto dos órgãos analisados. Tratamentos feitos aos 30 dias de infecção.

30 dias		Área (μm^2)		Granulomas – aspecto do órgão analisado			
Dose (mg/kg)	PRZ $\bar{X}$	PRZ+LPZ $\bar{X}$	CON $\bar{X}$	Órgãos	PRZ	PRZ+LPZ	CON
40	372,9*	230,9*	1080*	Fígado	+	+++	-
				Intestino	-	-	-
				Baço	+	-	-
				Pulmão	-	-	-
47	313,5*	510*	460,5*	Fígado	+++	+++	+++
				Intestino	+	-	++
				Baço	++	-	+
				Pulmão	-	-	+
60	525,3	422,5	446,6	Fígado	+++	+++	+++
				Intestino	+	+	++ e -
				Baço	++	+	++
				Pulmão	+	+ e -	++
250	416,8	512,4	816	Fígado	+++	++	+++
				Intestino	-	-	-
				Baço	-	+	+ e -
				Pulmão	-	-	-
300	787,6*	0*	816*	Fígado	+++	+	+++
				Intestino	-	-	-
				Baço	++	+	+ e -
				Pulmão	-	-	-

CON – Grupo Controle Positivo. +++ Órgão com muitos granulomas; ++ órgão com quantidade intermediária de granulomas; + órgão com poucos granulomas e – órgão limpo/sem granulomas. $\bar{X}$ - média. * $p \leq 0,05$. Em destaque: melhora em relação ao Grupo Controle Positivo.

Tabela 6: Efeito das doses de Praziquantel livre (PRZ) e incorporado ao lipossoma (PRZ+LPZ) sobre os granulomas no fígado, em relação à alteração no tamanho (área) desses, e no aspecto dos órgãos analisados. Tratamentos feitos aos 45 dias de infecção.

45 dias		Área (μm^2)		Granulomas – aspecto do órgão analisado			
Dose (mg/kg)	PRZ $\bar{X}$	PRZ+LPZ $\bar{X}$	CON $\bar{X}$	Órgãos	PRZ	PRZ+LPZ	CON
40	491,2	541,8	921,3	Fígado	+++	+++	+++
				Intestino	-	-	+
				Baço	+++	++	+
				Pulmão	-	+	+++
47	523,6	741,8	428,1	Fígado	+++	+++	+++
				Intestino	-	-	++
				Baço	++	+	++
				Pulmão	-	+ e -	++
60	412,7	441,1	466,8	Fígado	+++	+++	+++
				Intestino	-	-	-
				Baço	+++	+++	+++ e ++
				Pulmão	+++ e ++ e -	+	++
250	408,8*	505,1*	598,5*	Fígado	+	+++	+++
				Intestino	-	-	+
				Baço	-	+	++
				Pulmão	-	-	+
300	453,7	421,4	472,3	Fígado	+++	+++ e ++	+++
				Intestino	-	-	+
				Baço	+ e ++	++	++
				Pulmão	-	-	+

CON – Grupo Controle Positivo. +++ Órgão com muitos granulomas; ++ órgão com quantidade intermediária de granulomas; + órgão com poucos granulomas e – órgão limpo/sem granulomas. $\bar{X}$ - média. * $p \leq 0,05$. Em destaque: melhora em relação ao Grupo Controle Positivo.

V. DISCUSSÃO

Muito tem se estudado sobre a quimioterapia da esquistossomose mansônica, que representa hoje uma das mais importantes doenças parasitárias mundiais e, embora a distribuição da doença tenha modificado ao longo do tempo, não houve redução no número de pessoas infectadas ou que vivem em áreas de risco (Chitsulo *et al.*, 2000). Apesar disso, nos últimos 30 anos, não ocorreu nenhuma grande mudança em relação à terapêutica da esquistossomose mansônica (Cioli, 1998).

A Oxamniquine (OXA) foi por muito tempo o fármaco escolhido para o tratamento nos esquemas de controle de endemias, fosse ele administrado individualmente ou em massa (Bonesso-Sabadini, 1995). No entanto, casos de resistência a este fármaco foram documentados (Dias *et al.*, 1978; Yeang *et al.*, 1987), levando ao Praziquantel (PRZ) o papel de substituto da OXA nos tratamentos desta parasitose (Bonesso-Sabadini, 1995). Atualmente, porém, sabe-se que o PRZ apresenta falhas em tratamentos em massa, fato atribuído a resistência do parasito a este fármaco (Xiaonong *et al.*, 2001) e, portanto, o estudo de novos ou da combinação de diferentes fármacos (Ribeiro-dos-Santos *et al.*, 2006) ou ainda da melhoria dos já existentes (como a incorporação do PRZ a lipossomas – LPZ), faz-se necessário (Mourão *et al.*, 2005).

Neste trabalho a avaliação da atividade do PRZ livre e do PRZ encapsulado (PRZ+LPZ) seguiu alguns critérios quantitativos propostos por Pellegrino & Katz (1968), tais como quantidade/porcentagem de vermes dentro do sistema porta hepático e nas vísceras, proporção entre machos e fêmeas, redução no número de vermes e de ovos eliminados para o ambiente externo ou retidos nos tecidos. Segundo esses autores, tais critérios são fundamentais para avaliar a atividade de um fármaco contra o *Schistosoma mansoni*.

Assim, de acordo com Schubert (1948) e Standen (1963), uma das ações de fármacos anti *S. mansoni* consiste em alterar a distribuição dos vermes no órgão do hospedeiro.

Normalmente, segundo Pellegrino & Katz (1968), em infecções maduras 60 a 70% dos vermes estão localizados nas veias mesentéricas, 20 a 30% na veia porta e 0 a 20% no fígado. Após a administração, muitos agentes esquistossomicidas afetam profundamente essa distribuição, fazendo com que o verme se solte das paredes do sistema porta-hepático, sendo levados passivamente pela corrente sangüínea até o fígado (Pellegrino & Katz, 1968; Woolhouse, 1979). O PRZ, por exemplo, induz a uma rápida saída do verme do sistema porta-hepático para o fígado (cinco minutos à uma hora após a administração do fármaco), enquanto que a OXA induz a uma saída moderada (oito horas a seis dias) e o Artemether, a uma saída lenta (depois de sete dias ou mais) (Pellegrino *et al.*, 1977; Mehlhorn *et al.*, 1981; Utzinger *et al.*, 2003).

De acordo com Silva & Noël (1995), o desprendimento do verme da parede do sistema porta-hepático, ocorre devido ao efeito que o PRZ produz tanto nas ventosas, inibindo a sucção, como também na musculatura lisa do corpo do parasito, responsável pela contração do verme, induzindo a esta contração. Esse efeito é uma consequência dos danos que o PRZ provoca no tegumento do parasito.

Shuhua *et al.* (2000), testaram *in vivo* a ação do PRZ sobre o tegumento de *S. mansoni* de uma linhagem proveniente da Libéria, constatando grandes danos na ventosa oral, quatro horas após a administração do fármaco.

Mourão *et al.* (2005), ao testarem *in vitro* ação do PRZ, PRZ+LPZ e LPZ, sobre *S. mansoni* linhagem LE, observaram a contração do parasito e alterações no tegumento para o PRZ e PRZ+LPZ, e alteração no aspecto geral da cultura para o LPZ sozinho, sem PRZ. Resultados semelhantes foram encontrados em testes *in vitro* para larvas do cestódeo *Mesocostoides vogae* (sin. *M. corti*), que demonstraram alterações no tegumento, no tamanho e na motilidade dos vermes quando em contato com PRZ, PRZ+LPZ e LPZ. Os danos provocados pelo

PRZ+LPZ foram maiores, mas, apesar disso, o fármaco não provocou a morte dos vermes, ao contrário dos vermes em contato com PRZ.

O encontro de vermes no fígado, contudo, não é necessariamente, uma comprovação da atividade esquistossomicida de um fármaco (Pellegrino & Katz, 1968) já que, em alguns casos, a migração dos vermes das veias mesentéricas e porta para o fígado é reversível e, em outros casos, essa passagem é irreversível, quando ocorre morte do verme, formação de reação granulomatosa e reabsorção do mesmo (Mehlhorn *et al.*, 1981). Isso porque a contração induzida pelo fármaco na musculatura do verme - e responsável pela liberação deste nas paredes do sistema porta-hepático - é reversível, segundo Pax *et al.* (1978) e Coles (1979), cessando quando o fármaco é retirado.

No presente trabalho foi observado que nos dois esquemas de tratamento a quantidade de vermes nas vísceras ficou entre 0 e 20%, tanto para os grupos tratados, como para os grupos controles positivos (essa porcentagem ficou abaixo da obtida por Delgado *et al.*, 1992, que testaram *in vivo* a dose de PRZ 250 mg/kg em *S. mansoni* - linhagem BH, tratamento administrado no quadragésimo segundo dia de infecção - e chegou a uma porcentagem de 60% de vermes encontrados no fígado e 0% no grupo controle positivo).

O tratamento administrado no 30º dia de infecção, para a dose de 40 mg/kg, constituiu numa exceção já que o grupo PRZ livre apresentou 40,5% de vermes nas vísceras ($\bar{X}=6$) e o grupo controle (para essa dose) 21% ($\bar{X}=4,3$).

É importante salientar, no entanto, que neste grupo houve um grande número de infecções unissexuais por vermes machos (40% dos camundongos infectados apresentaram infecção unissexual), tanto nos grupos tratados, como no grupo controle positivo, o que pode ter contribuído para a alteração da distribuição dos vermes. A tendência das infecções unissexuais serem por vermes machos já foi relatada por Boissier & Moné (2000), indicando que a infectividade das cercárias machos e fêmeas são iguais quando a infecção é bissexual (o que permite igual proporção entre machos e fêmeas no hospedeiro definitivo), porém, quando a infecção é unissexual, a infectividade e o tempo de vida das cercárias

machos é maior do que as das fêmeas. Boissier *et al.* (1999) e Zanotti-Magalhães *et al.* (1991), sugeriram que vermes machos e fêmeas de *S. mansoni* possuem estratégias de transmissão diferentes, ou seja, cercárias macho apresentam maior infectividade enquanto que as fêmeas apresentam maior longevidade, em condições experimentais.

Considerando que o encontro de vermes fora do sistema porta-hepático e no fígado é um sinal de resposta à ação do fármaco, pode-se afirmar que o melhor tratamento para este parâmetro foi o PRZ+LPZ na dose 300 mg/kg administrada no 45º dia de infecção (se não considerar o grupo tratado com 40 mg/kg), já que correspondeu à maior porcentagem de vermes nas vísceras (17,5% e $\bar{X}=0,6$).

O *S. mansoni* é capaz de capturar lipídios externos através de um processo ativo de absorção e metabolismo (Browers *et al.*, 1998). Por isso, a composição dos lipossomas pode modificar a composição lipídica do tegumento do verme (Hrcková *et al.*, 1998). Já foi observado que em testes *in vitro*, a composição lipídica do esquistossômulo pode ser alterada conforme os lipídios existentes no meio (Rumjanek & McLaren, 1981). Além disso, em altas concentrações de lipossomas, pode provocar danos na superfície, mas sem erosão do tegumento do verme (Lima *et al.*, 1994). Assim, quando os lipossomas levam consigo o PRZ, os danos provocados são muito mais extensos e invasivos, e as lesões se estendem nos tecidos mais profundos do parasito (Lima *et al.*, 1994). É, então, possível imaginar que os lipossomas possam alterar a fluidez do tegumento, fazendo com que ele, juntamente com o PRZ, passem pela membrana mais facilmente, promovendo um aumento na eficácia do PRZ (Hrcková *et al.*, 1998).

Essas observações podem explicar porque no grupo tratado com PRZ+LPZ na dose 300 mg/kg, aos 45 dias, foi encontrado maior quantidade de vermes nas vísceras, já que, conforme visto anteriormente, os vermes são levados para fora do sistema porta-hepático e para o fígado por causa dos danos que os fármacos provocam em seu tegumento e musculatura.

Em relação à proporção entre vermes machos e fêmeas, foi possível observar que para os tratamentos feitos aos 30 dias de infecção com PRZ livre nas doses 40; 60; 250 e 300 mg/kg, e aos 45 dias nas doses 40; 47 e 60 mg/kg, houve maior quantidade de machos, supondo então que este fármaco agiu, na maioria das doses, preferencialmente nas fêmeas. Para o PRZ+LPZ isso também ocorreu, nos tratamentos feitos aos 45 dias de infecção. Nos tratamentos administrados no 30º dia com PRZ+LPZ, ocorreu o inverso, e o fármaco atuou preferencialmente sobre os vermes machos, porque talvez, machos adultos jovens sejam mais susceptíveis a este fármaco.

A ação do PRZ sobre machos e fêmeas é controversa. Gönnert & Andrews (1977), Pellegrino *et al.* (1977) e Mehlhorn *et al.* (1981) afirmam que doses subterapêuticas de PRZ atuam em vermes de ambos os sexos, matando-os igualmente. No entanto, Delgado *et al.* (1992) observaram que a dose de 250 mg/kg de PRZ atuou preferencialmente nas fêmeas, alterando a Razão Relativa ao Sexo (RRS). Esse mesmo autor afirma que nas infecções bissexuais é interessante que o fármaco tenha ação preferencial em fêmeas, pois com isso a eliminação de ovos é diminuída e, por consequência, as lesões provocadas nos órgãos ocasionadas pelos ovos do parasito, é menor.

Pica-Mattoccia & Cioli (2004), por sua vez, relataram maior sobrevivência de fêmeas em seus experimentos (linhagem Porto Rico, dose de 81 mg/kg e tratamento no quadragésimo nono dia de infecção), relacionando o fato dos vermes machos, em infecções bissexuais, serem mais susceptíveis ao PRZ que as fêmeas. Shaw & Erasmus (1983) ao descreverem o mecanismo de ação do PRZ em *S. mansoni*, notaram através da microscopia eletrônica de varredura, em experimentos feitos *in vivo*, que os vermes machos apresentam danos no tegumento muito mais rápido que as fêmeas.

Shuhua *et al.* (2000), que testaram *in vivo* a dose de PRZ 300 mg/kg, administrado no 49º dias de infecção por meio de tubagem esofágica, observou por meio da microscopia eletrônica de varredura que os vermes machos apresentaram grandes alterações no tegumento (após quatro horas da

administração do fármaco), como a perda dos “espinhos” e forte vacuolização, enquanto que nas fêmeas esses danos ou não ocorreram, ou eram mais brandos. Depois de 24 horas da administração do fármaco, os danos foram severos e generalizados nos machos, e mais suaves nas fêmeas.

Outro critério de avaliação da atividade terapêutica de um fármaco testado é em relação à sua atividade sobre os casais de *S. mansoni*, já que uma de suas ações pode ser a separação dos casais (Pellegrino & Katz, 1968). Os testes *in vitro* realizados por Mourão *et al.* (2005) sobre cultura de *S. mansoni*, demonstraram não só a perda de mobilidade como também a separação dos casais para PRZ+LPZ, sendo esse mesmo resultado obtido com altas concentrações de LPZ sozinho, sem PRZ.

Neste trabalho, foram encontrados um número razoável de vermes acasalados durante a perfusão. O tratamento que apresentou menor quantidade de casais foi para o fármaco PRZ+LPZ na dose 47 mg/kg administrado no 30º dia de infecção (26,6% e $\bar{X}=5,7$). Mesmo assim pode-se dizer que neste trabalho, os fármacos testados não atuaram na separação dos casais.

Para avaliar a atividade do fármaco contra *S. mansoni*, dados sobre a redução do número de vermes (RV) no grupo teste em relação ao controle positivo é de fundamental importância (Pellegrino & Katz, 1968).

No presente trabalho foi observada redução de 9,2 a 45,3% nos grupos tratados com PRZ livre aos 30 dias de infecção e de 17,9% a 25,7% aos 45 dias. Já os testes com PRZ+LPZ mostraram redução entre 25 a 34,6% nos grupos tratados no 30º dia de infecção e de 20,4 a 68,8% no 45º dia, propondo que para este parâmetro, o melhor tratamento foi com PRZ+LPZ na dose de 300 mg/kg no 45º dia de infecção com redução de 68,8% (Mourão *et al.*, 2005, observou *in vivo* que PRZ+LPZ foi mais eficiente do que PRZ livre para matar os vermes, da linhagem LE). Esse resultado foi superior ao obtido por Delgado *et al.* (1992), que testaram a dose PRZ 250 mg/kg, em que observou redução de 54 a 59%. Apesar disso, quando comparada com taxas de redução de vermes para outras linhagens, pode-se pensar que as reduções obtidas com os fármacos PRZ livre e PRZ+LPZ

em ambos os dias de tratamento, foram baixas. Sendo assim, a porcentagem de eficácia (ou redução de vermes) foi baixa, indicando que para a linhagem estudada, os tratamentos tiveram menor poder esquistossomicida.

Liang *et al.* (2001) compararam a redução de vermes em camundongos infectados entre linhagens resistentes e susceptíveis ao PRZ, na dose de 3x200 mg/kg. As linhagens susceptíveis (Porto Rico, Queniana – de campo e de laboratório –, Egípcia e uma mistura dessas linhagens) apresentaram redução entre 91,8 a 100%, enquanto que as resistentes (Linhagem Resistente selecionada em Laboratório, Senegalês-1, Senegalês-2, Senegalês-3 e uma mistura dessas linhagens) apresentaram redução - considerada baixa - na ordem de 59,6 a 74,4%.

A linhagem Ouh, testada por Bonesso-Sabadini (1995), que apresentou 90% de redução no tratamento feito com 100 mg/kg de PRZ (administrado cinquenta dias após infecção) foi considerada baixa, e para os tratamentos feitos com 150, 200 e 250 mg/kg a eficácia foi maior (a redução foi considerada alta) havendo 97,6; 92,8 e 96,1% respectivamente. Esses dados, juntamente com a retomada da oviposição dias após o tratamento, levaram esta autora a concluir que a linhagem Ouh é resistente ao tratamento com PRZ.

A resistência pode acontecer quando o verme sofre uma pressão pela presença de fármacos. Segundo Doenhoff (1998), doses subterapêuticas para a esquistossomose mansônica, proporciona sérias conseqüências a longo prazo, já que, uma das razões do verme sobreviver ao tratamento é porque ele se mostra mais tolerante ao fármaco do que aqueles que morrem. Dessa forma, ocorrerá uma seleção de fenótipos tolerantes ao fármaco (a tolerância é uma característica inerente ao verme, que o confere vantagem seletiva). Caso pacientes tratados se reinfectem e os novos vermes se acasalem com os sobreviventes, um grande número de ovos com fatores associados à tolerância ao fármaco serão eliminados no ambiente. Quando a prática terapêutica continuar, haverá um aumento na produção de vermes tolerantes tornando, com o passar do tempo, a linhagem em questão resistente ao fármaco. Pode-se considerar, portanto, que a tolerância é

precursora da resistência. Assim como relatam Liang *et al.* (2001), linhagens resistentes representam um problema para tratamentos feitos em massa, em que não haverá 100% de cura. Dessa forma, os vermes sobreviventes irão contribuir para manter a resistência da próxima geração.

Acredita-se que alterações no canal de Ca^{2+} (local de ação do fármaco) estão relacionadas com as mudanças que resultam na resistência ao PRZ (Greenberg *et al.*, 2005), mas ainda não se sabe exatamente que tipo de alteração molecular resulta nessa resistência (Liang *et al.*, 2001). Pereira *et al.* (1998) relataram uma alteração na expressão da enzima citocromo-c-oxidase (enzima transmembrana, presente nas mitocôndrias, relacionada ao processo de produção de ATP), sendo excessivamente expressada nas linhagens de *S. mansoni* resistentes ao PRZ.

A linhagem BH, utilizada neste trabalho, nunca passou por pressão de fármacos e, portanto, não se pode afirmar que é resistente - o que garante a fidedignidade dos resultados obtidos. Diante desses resultados, como a redução de vermes, pode-se pensar que essa linhagem seja tolerante aos fármacos testados.

O uso de lipossomas para reduzir a quantidade de vermes foi pesquisado por Frézard & Melo (1997). Nesse caso, foi comparada a atividade esquistossomicida da Oxamniquina livre (OXA) com a incorporada ao lipossoma (LOXA), administradas subcutaneamente um dia antes da infecção, contra *S. mansoni* - linhagem LE – atestando a superioridade da LOXA para a redução no número de vermes (97%), tanto em relação ao grupo tratado com OXA e ao grupo controle positivo. O motivo dessa superioridade, segundo esses autores, está relacionado também pela habilidade dos lipossomas de formarem um depósito subcutâneo, no local da inoculação, afetando o parasito durante a adaptação no processo de migração no hospedeiro vertebrado. Então, a alta taxa de redução de vermes refletiu a morte das larvas antes de atingir outros órgãos e, por esse motivo, a LOXA poderia ser utilizada preventivamente, quando inoculada subcutaneamente.

Outro critério, que segundo Pellegrino & Katz (1968) é um dos mais importantes para a avaliação da atividade de um fármaco anti *S. mansoni*, é o efeito que este apresenta sobre a eliminação dos ovos pelo verme. De acordo com Kikuth & Gönnert (1948), essa avaliação da atividade é principalmente baseada na diminuição ou na completa interrupção da oviposição nos camundongos tratados. Martinez *et al.* (2003) sugerem que a contagem de ovos é um indicador da fecundidade dos vermes adultos mantidos *in vivo* e *in vitro*.

No presente trabalho foi encontrada redução da oviposição, para os tratamentos feitos com PRZ livre, na ordem de 24 a 81% administrados no 30º dia de infecção, e 16,7 a 22,7% no 45º dia. Para tratamentos feitos com PRZ+LPZ a redução ficou entre 55 a 99%, quando administrado no 30º dia de infecção, e entre 55,1 a 98%, no 45º dia. As melhores reduções foram encontradas para os tratamentos feitos com PRZ+LPZ 250 e 300 mg/kg, no 30º dia de infecção, e para PRZ+LPZ 300 mg/kg, no 45º dia de infecção. Em vista disso, é possível propor que o melhor tratamento para este parâmetro foi o PRZ+LPZ 300 mg/kg, administrado aos 45 dias de infecção. Isso porque, no 45º dia de infecção, a oviposição é superior ao 30º dia.

Segundo Martinez *et al.* (2003), o padrão de eliminação dos ovos se inicia com uma baixa oviposição, havendo um aumento progressivo entre 45 e 72 dias após a infecção. Estudos *in vitro* evidenciaram que a oviposição é caracterizada por três etapas: uma fase inicial em que as fêmeas produzem poucos ovos, um período de máxima oviposição e, finalmente, uma redução progressiva no número de ovos eliminados (Barth *et al.*, 1996; El-Ridi *et al.*, 1997), cerca de três semanas após o período pré-patente (Barth *et al.*, 1996; El-Ridi *et al.*, 1997).

Neste trabalho, os exames parasitológicos foram feitos anteriormente ao período da diminuição da oviposição, entre a sexta e oitava semana de infecção. Sendo assim, essa alta redução (98%) mostrou a eficácia do fármaco em diminuir, quase cessar, a oviposição. Além disso, esse tratamento (300 mg/kg de PRZ+LPZ, administrado no 45º dia de infecção) também apresentou a menor quantidade de ovos/grama, em relação a todos os demais tratamentos ($\bar{X}=5$).

Esse resultado foi superior aos obtidos por Delgado *et al.* (1992), que conseguiram redução de ovos no intestino entre 86 a 90% em tratamento feito com PRZ 250 mg/kg contra *S. mansoni* linhagem BH, 85 a 94% para a linhagem YT e 89 a 95% para a linhagem SM (essas últimas de origem venezuelana).

Testes *in vivo*, feitos por Shaw & Erasmus (1988), indicaram que o PRZ atua não apenas no tegumento e na musculatura da fêmea, mas também em estruturas internas, particularmente na diferenciação das células vitelínicas e nos ovários. Xiao *et al.* (1981) encontraram grande quantidade de PRZ nas glândulas vitelínicas, mais que em outros tecidos, no *S. japonicum* (testes *in vivo*) sugerindo que este tecido é mais susceptível a ação deste fármaco. Além disso, as glândulas vitelínicas de *S. mansoni* são capazes de seqüestrar o cálcio (Erasmus & Davies, 1979). Como o PRZ promove alterações nos canais de cálcio e, portanto, na quantidade interna de cálcio, as células vitelínicas podem com isso sofrer certas modificações (Shaw & Erasmus, 1982). Associando essa informação ao fato dos lipossomas poderem alterar a fluidez do tegumento (Hrcková *et al.*, 1998), então ao incorporar o PRZ ao lipossoma, ocorre um aumento da absorção do fármaco e, por consequência, aumento nas alterações sofridas pelas glândulas vitelínicas, o que pode justificar a superioridade do tratamento com PRZ+LPZ.

Carneiro-Leão *et al.* (2002), também observaram superioridade nos tratamentos feitos com fármaco incorporado a lipossomas. Os autores testaram o efeito do polissacarídeo da goma de *Anacardium occidentale* (P-JU) livre e encapsulado em lipossomas, administrados intraperitonealmente, após 24 horas ou 42 dias da infecção, em *S. mansoni*, linhagem BH. Enquanto o P-JU livre apresentou redução de ovos entre 19,6 a 58%, o P-JU encapsulado apresentou redução entre 82,1 a 98,8%. A superioridade deste tratamento foi atribuída ao sinergismo entre a atividade imunomoduladora do P-JU associada a sua absorção aumentada pelos lipossomas.

Alguns tratamentos (como 47 mg/kg, para a preparação contendo PRZ livre, 30º dia; 40 e 47 mg/kg, para a preparação contendo PRZ livre, 45º dia; 40 e 47 mg/kg, para a preparação contendo PRZ+LPZ, 30º dia; 40 e 47 mg/kg, para a

preparação contendo PRZ+LPZ, 45º dia) não apresentaram redução no número de ovos, em relação aos seus grupos controles positivos.

No caso de ser desconsiderada a redução de 81,3% do grupo tratado com PRZ livre, na dose 40 mg/kg, no 30º dia de infecção, então foi possível afirmar que só começa haver redução de ovos a partir da dose 60 mg/kg, para ambas as preparações, em ambos os dias de tratamento, talvez porque, essas doses sejam muito baixas e insuficientes para promover essa redução. Vale lembrar que os camundongos que receberam tratamento com a dose 40 mg/kg, apresentaram grande número de infecções unissexuais, principalmente o grupo PRZ livre, e por essa razão, não foi possível considerar que houve realmente uma redução de ovos.

Conforme Kikuth & Gönnert (1948), a eficácia de um fármaco anti *S. mansoni* pode ser classificada de quatro formas: os fármacos que não têm ação sobre os vermes, ou seja, aqueles que não impedem a eliminação dos ovos pelo parasito; os fármacos que apresentam ação moderada, que são os que interrompem definitivamente ou momentaneamente a eliminação dos ovos pelo parasito, porém, durante a autópsia do camundongo, são encontrados vermes adultos vivos, mortos ou debilitados; os fármacos que exibem ação superior, ou seja, aqueles que interrompem definitivamente a eliminação dos ovos pelo verme e, durante a autópsia são encontrados vermes mortos (principalmente) e em estado de desintegração; por fim, os fármacos que promovem a cura da doença, que são aqueles em que não aparecem ovos nas fezes e na autópsia não são encontrados vermes ou ovos vivos até quatorze dias após o tratamento. De acordo com essa classificação, pode-se afirmar o melhor tratamento PRZ+LPZ 300 mg/kg, administrado no 45º dia de infecção, teve uma ação moderada.

Os resultados mostraram que, aparentemente, os efeitos do fármaco sobre a oviposição, a alteração na distribuição dos vermes, dos casais de vermes e a redução na quantidade de vermes adultos são fenômenos separados, já que o fármaco não atuou alterando drasticamente a distribuição dos vermes, separando os casais ou reduzindo bastante a quantidade de vermes. Em contrapartida, houve

diminuição drástica na oviposição. Essa conclusão também foi apresentada por Delgado *et al.* (1992).

Doenhoff (1998), recomenda doses que reduzam os ovos de *S. mansoni* a valores próximos a 100%. Apesar disso, a prática dos tratamentos tem demonstrado que em humanos, a redução fica bem abaixo desse valor. Isso não constitui num problema para o indivíduo, mas sim para a população. Por essa razão, fármacos que atinjam quase 100% de redução na eliminação dos ovos são benéficas para a população, reduzindo a transmissão da doença. Doses subterapêuticas, por sua vez, induzem não só a continuidade da transmissão como também casos de resistência à fármaco, a longo prazo.

O exame parasitológico Kato-Katz (Kato & Miura, 1954; Katz *et al.*, 1972) é bastante empregado na detecção de ovos de duas espécies hepato-intestinais de esquistossomose, o *S. mansoni* e *S. japonicum*. Entretanto, métodos parasitológicos (particularmente os que detectam ovos nas fezes) são freqüentemente insensíveis.

Cunha *et al.* (1987), encontraram divergências nos resultados ao comparar os exames Kato-Katz (Kato & Miura, 1954; Katz *et al.*, 1972), Hoffman Pons & Janer (1934), e o oograma, sendo que o primeiro exame apresentou maiores taxas de cura. Por essa razão é importante fazer não só o exame das fezes como também o método do oograma.

O oograma é o método de maior fidedignidade para avaliar a eficácia terapêutica dos fármacos, na esquistossomose mansônica (Cunha, 1992). De acordo com Pellegrino & Faria (1965), fármacos anti *S. mansoni* produzem na parede do intestino, uma mudança progressiva na porcentagem de ovos viáveis em diferentes estágios de maturidade, e isso pode ser observado por meio do oograma. Essa mudança é produzida pela interrupção da oviposição na parede intestinal ou por alterações no processo de maturação dos ovos. Esses autores sugerem, então, que modificações no oograma constituem num critério simples, sensível e seguro para avaliar a ação de fármacos contra este verme.

Segundo Giboda & Smith (1994), a eficácia de fármacos esquistossomicidas, é normalmente avaliada por critérios como a carga parasitária e presença ou ausência de ovos nas fezes. Entretanto, é também importante conhecer a viabilidade dos ovos excretados, para assim avaliar corretamente a eficácia do tratamento (a viabilidade dos ovos, neste trabalho, foi determinada através da morfologia dos ovos no tecido intestinal). Pellegrino & Katz (1968), afirmam que a parede intestinal de camundongos que foram submetidos a tratamento, apresenta uma mudança progressiva na porcentagem de ovos viáveis nos diferentes estágios de desenvolvimento.

Neste trabalho, foi possível observar que os tratamentos feitos no 30º dia de infecção mostraram diminuição na quantidade de ovos imaturos (em comparação aos grupos controles positivos referentes a cada dose e as diferentes dosagens para as duas preparações testadas) nos tratamentos feitos com PRZ livre na dose de 40 mg/kg ($\bar{X}=0$) e com PRZ+LPZ na dose de 300 mg/kg ($\bar{X}=5,8$) e de ovos maduros para os tratamentos feitos com PRZ livre nas doses 40 ($\bar{X}=0,1$), 60 ($\bar{X}=3,1$), 250 mg/kg ($\bar{X}=3$) e PRZ+LPZ na dose de 300 mg/kg ($\bar{X}=0,9$), e de ovos mortos para o tratamento feito com PRZ livre na dose de 40 mg/kg ($\bar{X}=0$). Nos tratamentos feitos no 45º dia de infecção, houve diminuição da quantidade de ovos imaturos para as doses 47 mg/kg de PRZ livre ($\bar{X}=12,9$); 250 ($\bar{X}=8,5$) e 300 mg/kg ($\bar{X}=3,1$) de PRZ+LPZ; de ovos maduros para a dose 40 ($\bar{X}=7,4$) e 300 mg/kg ($\bar{X}=5$) de PRZ+LPZ.

Os resultados obtidos para o tratamento feito com PRZ livre na dose de 40 mg/kg administrada no 30º dia de infecção, indicaram grande quantidade de infecção unissexual, e não que realmente houve uma diminuição na quantidade desses ovos.

Sabe-se que os ovos de *S. mansoni* no intestino levam de seis a sete dias para se desenvolver completamente, ou seja, passar do primeiro estágio para o quinto, quando há formação de um miracídio - ovo maduro (Prata, 1957; Pellegrino *et al.*, 1962). Os ovos maduros permanecem viáveis no intestino por cerca de doze dias (Prata, 1957), portanto, se a oviposição diminuir com a administração do

fármaco, o oograma deverá apresentar maior quantidade de ovos maduros - em decorrência de oviposições anteriores ao tratamento - do que de ovos imaturos.

Neste trabalho, foi visto que os grupos controles positivos referentes a todas as doses, apresentaram na grande maioria dos oogramas, quantidade maior de ovos imaturos do que de ovos maduros, indicando que a oviposição, para este grupo, ocorreu até a época da análise. O mesmo aconteceu com o grupo tratado com PRZ livre e com PRZ+LPZ, exceto para a dose PRZ+LPZ 300 mg/kg (45º dia).

Dessa maneira, a dose PRZ+LPZ 300 mg/kg, mostrou-se mais eficaz em relação às outras já que houve diminuição na quantidade dos ovos imaturos e também maduros em ambos os dias de tratamento. Por outro lado, a quantidade de ovos imaturos no grupo tratado aos 45 dias de infecção foi menor que a de ovos maduros. Isso mostra que a oviposição foi menor, já que ovos recentes (nos primeiros estágios) foram encontrados em menor quantidade comprovando que essa dose, quando administrada nesse dia, é superior em relação às outras testadas e nos outros dias de administração.

Segundo Pellegrino & Katz (1968), fármacos anti *S. mansoni*, podem atuar de diferentes formas, por exemplo, fazendo os vermes perderem o tônus muscular e migrarem para o fígado e outros órgãos, ou então os matando, ou ainda atuando nos órgãos reprodutores dos vermes. Quando o fármaco atua nos órgãos reprodutores do parasito, a interrupção da postura dos ovos é percebida. Assim, a porcentagem de ovos maduros aumenta progressivamente depois da administração do fármaco e a de ovos imaturos decai. Um fármaco é considerado ativo, portanto, se um ou mais estágios imaturos estão ausentes ou diminuíram, o que mais uma vez comprova a superioridade do tratamento feito com PRZ+LPZ 300 mg/kg, no 45º dia de infecção.

Esse resultado é muito importante já que, conforme as observações de Richards *et al.* (1989), o PRZ atua apenas nos ovos maduros, matando-os, e os imaturos continuam se desenvolvendo até serem eliminados, podendo ainda eclodir no meio ambiente. Isso porque, os ovos em embriogênese sofrem pouca toxicidade relacionada ao fármaco, sendo que se o tratamento não for continuado

acima do tempo requerido para a maturação dos ovos, os mais jovens (ou seja, os últimos a serem depositados antes da interrupção da oviposição) sobrevivem e atingem, saudavelmente, a maturidade eclodindo naturalmente (Richards *et al.*, 1989).

Giboda & Smith (1994), testaram a ação do PRZ em camundongos infectados com 200 cercárias da linhagem Porto Rico, administrando através da tubagem esofágica, 800 mg/kg em duas doses, uma no 60º dia de infecção e outro no 69º, sobre os ovos de *S. mansoni*. Esses autores também observaram que o PRZ matou apenas os ovos maduros sendo que, nove dias após o primeiro tratamento, 90,7% dos ovos maduros representaram os ovos imaturos que sobreviveram à primeira dose do fármaco, e que se tornaram maduros. Além disso, a eclosão desses ovos foi de 90%, indicando sua viabilidade.

Katz *et al.* (1989), observaram oogramas alterados em relação ao grupo controle positivo, em todas as semanas de tratamento, nos grupos tratados com PRZ 200 e 400 mg/kg, via oral, em camundongos infectados com *S. mansoni*, linhagem LE. No entanto, recidivas foram detectadas a partir da terceira semana do tratamento. No presente trabalho não foi possível perceber se houve recidivas, já que a necropsia foi feita duas semanas após o tratamento.

A superioridade do tratamento com PRZ+LPZ, pode ter sido por dois motivos: ou pelo fato do PRZ, quando incorporado ao LPZ, atuar nos ovos imaturos, ou então pelo fato do PRZ tornar-se mais disponível com essa associação. Nesse último caso, então o PRZ seria eliminado mais lentamente pelo organismo e, dessa forma, teria mais tempo de agir sobre os vermes, particularmente nos seus órgãos reprodutores, o que culminaria com a redução da oviposição. Resultados obtidos por Akbarieh *et al.* (1992), indicaram que enquanto o PRZ livre desapareceu do fígado do camundongo uma hora após a administração, o PRZ incorporado a LPZ foi encontrado até 10 dias depois.

Além do efeito que o fármaco apresenta sobre a eliminação dos ovos pelo verme, outro critério importante para avaliar a ação deste sobre o *S. mansoni*, é a redução no número de ovos retidos nos tecidos, como o do fígado, por exemplo (Luttermoser, 1954; Thompson *et al.*, 1962; Lambert & Stauffer, 1964).

O estudo da ação que um fármaco tem sobre a reação granulomatosa que se forma ao redor dos ovos do *S. mansoni*, principalmente no fígado e no intestino, é muito importante, já que ela é a responsável pela principal causa da patologia nesse tipo de infecção (Warren, 1963; Cheever, 1965). Inicialmente a reação tende a proteger o hospedeiro, impedindo que produtos tóxicos dos ovos, como o antígeno hepatotóxico ômega-1, capazes de matar o hospedeiro, sejam liberados (Modha *et al.*, 1998). No entanto, produz seqüelas, sendo que a principal são as varizes esofagianas causadas pela hipertensão portal. Essas varizes são originárias da deposição de colágeno e fibrose de vasos sangüíneos do fígado (Bennet, 1997). Segundo Burt (1993), as fibroses também alteram profundamente a capacidade metabólica e funcional do parênquima hepático.

Interferências no curso da infecção com quimioterapia específica podem modular a reação imune e assim, o estudo dos granulomas é útil na avaliação de fármacos esquistossomicidas e da resposta do hospedeiro aos ovos do *S. mansoni* (Botros *et al.*, 1984).

A reversibilidade dos granulomas, depois de curada a infecção, é discutível (Warren, 1962; Schiller & Haese, 1973). Segundo Morcos *et al.* (1985), a reversibilidade da reação granulomatosa e da fibrose depois do tratamento, já foi relatada. Esse mesmo autor também sugere que o tempo em que o tratamento ocorre é importante para a reversão da fibrose. A diminuição no tamanho do granuloma nos pulmões, após tratamento com PRZ e com o Tártaro Emético, também já foi observada por Botros *et al.* (1984). De acordo com Stone (2000) e Singh *et al.* (2004), nas infecções murinas por *S. mansoni*, o tratamento com PRZ resulta em baixa reabsorção do tecido fibroso no fígado e diminuição do tamanho dos granulomas, meses após o tratamento. Morcos *et al.* (1985), conseguiram reversão das reações granulomatosas e fibroses provocadas pelo *S. mansoni* – linhagem Egípcia - após tratamento com PRZ, na dose de 250 mg/kg, administrado por via oral. Esse resultado está de acordo com o obtido neste trabalho, pois a dose 250 mg/kg de PRZ livre, quando administrada no 45º dia de infecção, apresentou diminuição no tamanho do granuloma em relação ao grupo controle positivo e ao grupo tratado com PRZ+LPZ.

No presente trabalho os órgãos mais lesados, quando analisados na lupa, foram o fígado e o intestino, em seguida do baço e dos pulmões, nos grupos controles positivos e nos grupos tratados. Esse resultado foi semelhante ao observado por Carneiro-Leão *et al.* (2002). A melhora visual apareceu para o grupo de camundongos tratados com 300 mg/kg de PRZ+LPZ no 30º dia de infecção, quando comparados a todos os outros tratamentos. Em relação às observações histológicas, não foram encontrados granulomas nos fígados separados para análise, neste mesmo grupo, o que mostra, para este critério, a superioridade desse tratamento.

Segundo Mahmoud & Warren (1974), certos fármacos esquistossomicidas, como o Tártaro Emético e o Niridazole, são capazes de inibir a formação do granuloma, então seria possível acreditar que outros fármacos anti *S. mansoni*, também poderiam apresentar esse mesmo efeito.

Essa inibição, segundo Botros *et al.* (1984), pode acontecer devido a uma diminuição da capacidade das células T e da resposta imune humoral. Isso pode ser causado por um envolvimento direto de linfócitos B ou um efeito do fármaco nas subpopulações de células T, que regulam a função dos linfócitos B. As reações de hipersensibilidade imediata são mediadas pelas imunoglobulinas IgE ou IgG, sendo que a produção de IgE é regulada pelos sinais derivados das células T (tanto os supressores com os “helpers”), assim como a direta estimulação antigênica estimulada pelas células B (Tada, 1975).

A superioridade do tratamento com PRZ+LPZ 300 mg/kg, administrado no 30º dia de infecção, pode ser explicada, então, pela inibição da reação granulomatosa pelo fármaco. Nesse dia de tratamento, a oviposição ainda não é máxima, então, junta-se a isso com o fato da fármaco inibir ou minimizar a reação granulomatosa, culminado no resultado obtido, com poucos granulomas visíveis e com ausência desses nos cortes histológicos.

Hrcková *et al.* (2006), que testaram o efeito do PRZ e de imunomoduladores incorporados em LPZ contra larvas de *Mesocostoides vogae* (sin. *M. corti*) nos granulomas no fígado de camundongos, observou que o LPZ, sozinho, estimula a fibrogênese. Não apenas a síntese de colágeno, como

também a síntese de mastócitos, foram mais intensas depois da administração de LPZ durante o período experimental, o que resultou nessa estimulação. No entanto, quando administrado juntamente com o PRZ, este aboliu a síntese de colágeno e mastócitos que seriam estimulados pelo LPZ.

No presente trabalho, foi observado que o melhor tratamento foi justamente aquele que combinou PRZ com LPZ (dose de 300 mg/kg, administrada no 30º dia de infecção), e essa combinação pode então ter diminuído ou até mesmo inibido a formação dos granulomas.

Após a análise de todos esses critérios quantitativos, necessários para a avaliação de um fármaco anti *S. mansoni*, pode-se perceber que o tratamento feito com PRZ+LPZ, em especial a dose 300 mg/kg, administrada no 45º dia de infecção, mostrou-se superior para a maioria desses parâmetros (apesar de 300 mg/kg ser uma dose alta, é importante salientar que não foram observados efeitos colaterais que comumente aparecem após a administração do PRZ, tais como diarreia ou urticárias - Stelma *et al.*, 1995).

Vários fatores podem estar relacionados a essa superioridade já que, segundo Frézard & Melo (1997), o LPZ tem a habilidade de modificar *in vivo* o destino do fármaco encapsulado.

Ainda conforme Frézard & Melo (1997), essa eficácia aumentada pode estar relacionada a três fatores. Primeiramente, o LPZ protege a fármaco encapsulada do rápido metabolismo e conseqüente eliminação pelo organismo, prolongando os níveis do fármaco no sangue, o que resulta no aumento de sua atividade. O segundo fator que pode explicar a superioridade dos fármacos encapsulados é a habilidade que o LPZ possui de ter o fígado como alvo, onde podem ser encontrados os ovos e também o próprio parasito; além disso, esse fato também garante proteção aos demais tecidos do hospedeiro não afetados pela doença (Akbarieh *et al.*, 1992). Finalmente, o terceiro fator proposto pelos autores é que o *S. mansoni* apresenta afinidade por fosfolipídios, fazendo com que o fármaco seja diretamente ingerido pelo verme.

Alguns autores sugerem que fármacos encapsulados são superiores, pois o LPZ aumenta a disponibilidade do fármaco no organismo. Akbarieh *et al.* (1992),

mostraram que o PRZ quando incorporado ao LPZ, teve sua circulação aumentada no plasma sanguíneo, permanecendo após 7 a 10 dias da administração subcutânea, enquanto que o PRZ sozinho teve meia vida de apenas algumas horas, quando administrado intravenosa ou oralmente. El-Ridi *et al.* (1989), demonstraram aumento da farmacocinética do PRZ quando incorporado ao LPZ, aumentando a eficácia do PRZ contra o *S. mansoni*.

Esse aumento na disponibilidade do PRZ quando incorporado ao LPZ, pode ser devido ao fato do LPZ constituir num carreador apropriado para fármacos pouco solúveis em água (Cullins *et al.*, 1987). Segundo Mourão *et al.* (2005), a incorporação do PRZ em LPZ permite a administração do PRZ em meio aquoso sem diminuir o efeito que o fármaco teria contra o *S. mansoni*. De acordo com Mourão (2001), apesar do PRZ ser o fármaco de escolha para o tratamento da esquistossomose mansônica, sua baixa solubilidade restringe sua liberação por via oral e inviabiliza a sua administração por outras vias. Dessa forma, o aumento da solubilidade pode aumentar a biodisponibilidade do PRZ, melhorando sua biodisponibilidade.

A superioridade da ação dos fármacos encapsulados em LPZ já foi descrita para outras parasitoses como a leishmaniose (fármacos antimoniais incorporadas ao LPZ) e a mesocetoidíase (provocada pelo *Mesocetoides vogae*).

Por fim, em relação à linhagem de *S. mansoni* (linhagem BH) utilizada nesse estudo, vale salientar que diversos autores demonstraram que passagens sucessivas deste verme em laboratório produzem diminuição da sua variabilidade genética, mudanças na infectividade para hospedeiros intermediários e para os definitivos (Fletcher *et al.*, 1981; Loverde *et al.*, 1985; Rocha *et al.*, 1995). No entanto, segundo Martinez *et al.* (2003), as diferenças naturais (biológicas e morfológicas nos vermes adultos) das linhagens são expressas, mesmo com a sua manutenção prolongada em condições de laboratório, o que garante a fidedignidade dos resultados obtidos neste estudo, em relação a esta linhagem.

VI. CONCLUSÕES

- Os tratamentos não alteraram profundamente a distribuição, proposta por Pellegrino & Katz (1968), dos vermes adultos no organismo, ou seja, a maioria dos vermes não foi deslocada para outros órgãos após o tratamento. O tratamento que mais apresentou vermes nas vísceras foi o PRZ+LPZ na dose de 300 mg/kg, administrado no 45º dia de infecção.
- Os tratamentos alteraram a proporção entre vermes machos e fêmeas. A maioria das doses para os tratamentos feitos com PRZ livre, administrados no 30º e 45º dia de infecção e PRZ+LPZ, administrados no 45º dia de infecção, teve ação preferencialmente nas fêmeas. Já os feitos com PRZ+LPZ, no 30º dia de infecção, atuou preferencialmente nos vermes machos.
- Os tratamentos provavelmente não atuaram na separação dos casais, já que foram encontrados um número razoável de vermes acasalados.
- A redução de vermes foi baixa para os tratamentos feitos tanto com PRZ livre como com o incorporado ao LPZ. A maior redução, mesmo assim considerada baixa, ocorreu para o tratamento feito com PRZ+LPZ na dose de 300 mg/kg, administrado no 45º dia de infecção. Assim, pode-se pensar que as dosagens estudadas, tanto para o PRZ livre como para o PRZ+LPZ, tem baixo poder esquistossomicida para a linhagem BH.

- Os tratamentos feitos com PRZ+LPZ na dose de 300 mg/kg, administrados tanto no 30º como no 45º dia, apresentaram maiores reduções (quase 100%) da oviposição, em relação aos seus referentes grupos controles positivos e também aos outros tratamentos. A redução mais importante foi para o grupo tratado no 45º dia de infecção, já que, nesse período, a oviposição é maior.
- O oograma mostrou-se bastante alterado para o tratamento feito com 300 mg/kg de PRZ+LPZ, administrados tanto no 30º como no 45º dia de infecção. Porém, no grupo tratado no 45º dia, houve diminuição dos ovos imaturos em relação aos maduros, indicando que a oviposição diminuiu drasticamente. Esse resultado constata que o PRZ+LPZ nessa dosagem teve ação também sobre os ovos imaturos, sendo que o PRZ livre atua preferencialmente sobre os maduros.
- O PRZ+LPZ na dose de 300 mg/kg, provavelmente agiu no sistema reprodutor do verme, o que fez diminuir a oviposição.
- O fígado, intestino, baço e pulmões foram menos lesados no tratamento feito com PRZ+LPZ 300 mg/kg administrado no 30º dia de infecção.
- Os órgãos separados para observações histológicas, no tratamento feito com PRZ+LPZ 300 mg/kg administrado no 30º dia de infecção não apresentaram granulomas, propondo que o PRZ+LPZ pode estar diminuindo ou até mesmo inibindo a reação granulomatosa.

- Para a maioria dos parâmetros analisados, o tratamento feito com PRZ+LPZ na dose de 300 mg/kg, administrado no 45º dia de infecção, mostrou-se superior. Apesar de ser uma dose alta, não foram observados certos efeitos colaterais.
- O tratamento feito com PRZ+LPZ foi superior provavelmente porque aumentou a disponibilidade do fármaco no organismo assim como a sua solubilidade em meios aquosos. Além disso, o fármaco, quando incorporado, pôde ter sido absorvido com mais facilidade pelo verme (que tem afinidade por fosfolipídios), fazendo com que os danos provocados pelo PRZ, sejam mais profundos, não restringindo ao tegumento.

VII. REFRÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKBARIEH, M.; BESNER, J. G.; GALAL, A.; TAWASHI, R. Liposomal delivery system for the targetins and controlled release of praziquantel. **Drug Development and Industrial Pharmacy**. 18 (3): 303-317. 1992.

ANWAR, W. A.; AU W. W.; RAMANUJAM, V. M. S.; LEGATOR, M. S. Enhancement of benzene clastogenicity by praziquantel in mice. **Mutat. Res.** 222: 283-289. 1989.

ANWAR, W. A. & ROSIN, M. P. Reduction in chromossomal damage in schistosomiasis patients after treatment with praziquantel. **Mutat. Res.** 298: 179-185. 1993.

ANWAR, W. A. Praziquantel (antischistosomal drug): is it clastogenic, co-clastogenic or anticlastogenic? **Mutat. Res.** 305: 165-173. 1994.

BANGHAM, A. D.; STANDISH, M. M.; WATKINS, J. C. Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. **J. Mol. Biol.** 13: 238-252. 1965.

BARBERATO, S. **Novos derivados de oxamniquine potencialmente esquistossomicidas**. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, USP, São Paulo, 1996.

BARTH, L. R.; FERNANDES, A. P. M.; RODRIGUES, V. Oviposition by *Schistosoma mansoni* during *in vitro* cultivation. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**. 38: 423-426. 1996.

BASSILY, S.; FARID, Z.; DUNN, M.; EL-MARSY, N. A.; STEK, M. Jr. Praziquantel for treatment of schistosmiasis in patients with advanced splenomegaly. **Ann. Trop. Med. Parasitol.** 79: 629-634. 1985.

BENNET, J. L. Schistosomiasis: fibrosis and oesophageal varices. **Parasitol. Today**. 13: 39. 1997.

BLANCHARD, T. J.; MILNE, L. M.; POLLOK, R.; COOK, G. C. Early chemotherapy of imported neuroschistosomiasis. **Lancet**. 341 (8850): 959. 1993.

BOISSIER, J.; MORAND, S.; MONÉ, H. A review of performance and pathogenicity of male and female *Schistosoma mansoni* during the life cycle. **Parasitology**. 119: 447-454. 1999.

BOISSIER, J. & MONÉ, H. Experimental observations on the sex ratio of adult *Schistosoma mansoni*, with comments on the natural male bias. **Parasitol**. 121: 379-383. 2000.

BONESSO-SABADINI, P. I. P. **Avaliação da suscetibilidade da linhagem Ouh (Ourinhos, Vale do Paranapanema – SP) de *Schistosoma mansoni* ao oxamniquine e praziquantel**. Dissertação de Mestrado, Instituto de Biologia, UNICAMP, Campinas, São Paulo, 1995.

BOUREE, P. Successful treatment of *Taenia saginata* and *Hymenolepis nana* by single oral dose of praziquantel. **J. Egypt Soc. Parasitol**. 21: 303-307. 1991.

BRICKES, C. S.; DEPENBUSCH, J. W.; BENETT, J. L.; THOMPSON, D. F. The relationship between tegumental disruption and muscle contraction in *Schistosoma mansoni* exposed to various compounds. **Z. Parasit**. 69: 61-67. 1983.

BRINDLEY, P. J.; STRAND, M.; NORDEN, A. P.; SHER, A. Role of host antibody in the chemotherapeutic action of praziquantel against *Schistosoma mansoni*: identification of target antigens. **Mol. Biochem. Parasitol**. 34: 99-108. 1989.

BROWERS, J. F. H. M.; HELLEMOND, J. J. V.; VAN GOLDE, L. M. G.; TIELENS, A. G. M. Ether lipids and their possible physiological function in adult *Schistosoma mansoni*. **Mol. Biochem. Parasitol**. 96: 49-58. 1998.

BOTROS, S. S.; METWALLY, A. A.; KHAYYAL, M. T. The immunological aspects of praziquantel in unsensitized mice with experimentally induced schistosome pulmonary granuloma. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg**. 78: 569-572. 1984.

BURT, A. D. Cellular and molecular aspects of fibrosis. **J. Pathology**. 170: 105-114. 1993.

CARNEIRO-LEÃO, A. M. A.; GADÊLHA, M. M.; ARAÚJO, R. V. S.; ARAÚJO, F. V. S.; SANTANA, J. V.; IACOMINI, M.; MAGALHÃES, N. S. S. Avaliação do efeito dopolissacarídeo da goma de *Anacardium occidentale* livre e encapsulado em lipossomas sobre a infecção experimental pelo *Schistosoma mansoni*. **Anais do XI Congresso de iniciação Científica da UFRPE – Recife – Brasil**. 11: 557-558. 2002.

CHEEVER, A. W. A comparative study of *Schistosoma mansoni* in mice, gerbils multimammate rats and hamsters. 1 the relation of portal hypertension to size of hepatic granulomas. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 14: 211-226. 1965.

CHITSULO, L.; ENGELS, D.; MONTRESOR, A.; SAVIOLI, L. The global status of schistosomiasis and its control. **Acta Tropica**. 77: 41-51. 2000.

CIONI, D.; PICA-MATTOCIA, L. & ARCHERS, S. Antischistosomal drugs: past, present...and future? **Pharmac. Ther.** 68 (1): 35-85. 1995.

CIONI, D. Chemotherapy of schistosomes: an update. **Parasitol. Today**. 14: 418-422. 1998.

CIONI, D. Praziquantel: is there resistance and there alternatives? **Curr. Opin. Inf. Dis.** 13: 659-663. 2000.

CIONI & PICA-MATTOCIA. Praziquantel. **Parasitol. Res.** 90: S3-S9. 2002.

COLES, G. C. The effect of praziquantel on *Schistosoma mansoni*. **J. Helminthol.** 53: 31-33. 1979.

CULLINS, P. R.; HOPE, M. J.; BALLY, M. B.; MADDEN, T. D.; MAYER, L. D. Liposomes as pharmaceuticals. In: OSTRO, M. J. **Liposomes. From biophysics to therapeutics**. New York: Marcel Dekker. p. 39-72. 1987.

CUNHA, A. S.; CANÇADO, R.; REZENDE, G. L. Therapeutical evaluation of different dose regimens of praziquantel in schistosomes mansoni, based on the quantitative oogram technique. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**. 29: 295-304. 1987.

CUNHA, A. S. Schistosomiasis mansonii – drug therapeutic. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** 87, Suppl. IV. 341-351. 1992.

DELGADO, V. S.; SUÁREZ, D. P.; CESARI, I. M.; HINCAN, R. N. Experimental chemotherapy of *Schistosoma mansonii* 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. 1992.

DIAS, L. C. S.; PEDRO, R. J.; RIGO, E.; GOTO, M. M.; MAFRA, G. L. Linhagem humana de *Schistosoma mansonii* resistente a esquistossomicidas. **Rev. Saúde Pública.** 12: 110. 1978.

DOENHOFF, M. J.; SABAHA, A. A.; FLETCHER, C.; WEBBE, G.; BAIN, J. Evidence for a immune-dependent action of praziquantel on *Schistosoma mansonii* in mice. **Trans. R. soc. Trop. Med. Hyg.** 81: 947-951. 1987.

DOENHOFF, M. J. Is schistosomal chemotherapy sub-curative? Implications for drug resistance. **Parasitol. Today.** 14 (10): 434-435. 1998.

DOENHOFF, M. J.; KUSEL, J. R.; COLES, G. C.; CIOLI, D. Resistance of *Schistosoma mansonii* to praziquantel: is there a problem? **Trans. R. Soc. Trop. Med. Parasitol.** 96: 465-469. 2002.

EL-RIDI, M. S.; AKBARIEH, M.; VENCER, J. G.; KASSEM, M.; SHARKAWI, M.; TAWASHI, R. **Proceedings, 5th international conference on pharmacological technology, Paris.** 2: 228-237. 1989.

EL-RIDI, R.; OZAKI, T.; INABA, T.; ITO, M.; KAMIYA, M. *Schistosoma mansonii* oviposition *in vitro* reflects worm fecundity *in vivo*: individual, parasite age and host dependent variations. **Int. J. Parasitol.** 27: 381-387. 1997.

EL-SUBBAGH, H. & AL-BADR, A. Praziquantel. **Analyt. Profil. Drugs Subst. Excip.** 25: 463-502. 1998.

ERASMUS, D. A. & DAVIS, T. W. *Schistosoma mansonii* and *Schistosoma haematobium*: calcium metabolism of the vitelline cell. **Exp. Parasitol.** 47: 91-106. 1979.

FALLON, P. G. & DOENHOFF, M. J. Drug-resistant schistosomiasis: resistance to praziquantel and oxamniquine induced in *Schistosoma mansoni* in mice is drug specific. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 53: 61-62. 1994.

FENDLER, J. H. **Membrane Mimetic Chemical**. New York: Wiley. 1982.

FLETCHER, M.; LOVERDE, P. T.; WOODRUFF, D. S. Genetic variation in *Schistosoma mansoni*: enzyme polymorphisms in populations from America, Southwest Asia, South America, and the West Indies. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 30: 406-421. 1981.

FOSTER, R. The preclinical development of oxaminiquine. **Rev. Inst. Med. Trop.** 15 (supl. 1): 1-9. 1973.

FRÉZARD, F. & MELO, A. L. Evaluation of the schistomicidal efficacy of liposome – entrapped oxamniquine. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo.** 39 (2): 97-100, 1997.

FROHBURG, H. Results of toxicological studies on praziquantel. **Arzneimittelforschung.** 34: 1137-1144. 1984.

GIBODA, M. & SMITH, M. J. *Schistosoma mansoni* eggs as a target for praziquantel: efficacy of oral application in mice. **J. Trop. Med. Hyg.** 97: 98-102. 1994.

GÖNNERT, R. & ANDREWS P. Praziquantel, a new broad-spectrum antischistosomal agent. **Z. Parasitenkd.** 52: 129-150. 1977.

GREENBERG, R. M. Are Ca^{2+} channels targets of praziquantel action? **Int. J. Parasitol.** 35: 1-9. 2005.

GREGORIADIS, G. The carrier potential of liposomes in biology and medicine. **N. Engl. J. Med.** 295: 704-710. 1976.

GREMIÃO, M. P. D. & CASTRO, A. D. Considerações sobre o processo de dissolução na preparação de dispersões moleculares. **Infarma.** 9 (1/5): 7-11. 1999.

GROLL, E. Praziquantel. **Ad. Pharmacol. Chemother.** 20: 219-237. 1984.

HERMETO, M. V.; BICALHO, R. S.; SILVA, R. E.; MELO, A. L.; PEREIRA, L. H. Oogram studies in mice infected with *Schistosoma mansoni* and treated with dexamethasone. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**. 36 (2): 99-103. 1994.

HERRERA, L. A.; OSTROSKY-WEGMAN, P.; MONTERO, R.; ROJAS, E.; GONSEBATT, M. E.; SCHIFFMAN, D. Evaluation of the carcinogenic and genotoxic potential of praziquantel in the Syrian hamster embryo cell transformation assay. **Mutat. Res.** 305: 175-180. 1994.

HOFFMAN, W. A.; PONS, J. A.; JANER, J. L. The sedimentation concentration method in Schistosomiasis mansoni. **Puerto Rico Journal of Public Health**. 9: 281-298. 1934.

HRCKOVÁ, G.; VELEBNÝ, S.; CORBA, J. Effects of free and liposomized praziquantel on the surface morphology and motility of *Mesocostoides vogae* tetrathyridia (syn. *M. corti*; Cestoda: Cyclophyllidae) *in vitro*. **Parasitol. Res.** 84: 230-238. 1998.

HRCKOVÁ, G.; VELEBNY, S.; DAXNEROVÁ, Z.; SOLÁR, P. Praziquantel and liposomized glucan-treatment modulated liver fibrogenesis and mastocytosis in mice with *Mesocostoides vogae* (*M. corti*, Cestoda) tetrathyridia. **Parasitology**. 132: 581-594. 2006.

JORDAN, P.; WEBBE, G. & STURROCK, R. F. **Human schistosomiasis**. Cambridge University Press. 1993.

JULIANO, R. L. Liposomes as a drug delivery system. **Trends Pharmacol. Sci.** 2: 39-41. 1981.

KATO, K. & MIURA, M. Comparative examinations. **Jap. J. Parasitol.** 3: 35. 1954.

KATZ, N.; CHAVES, A. & PELLEGRINO, J. A simple device for quantitative stool thick-smear technique in schistosomiasis mansoni. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**. 14: 397-400. 1972.

KATZ, N.; DIAS, P. E.; SOUZA, C. P.; BRUCE, J. I.; COLES, G. C. Rate of action of schistosomicides in mice infected with *Schistosoma mansoni*. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** 22 (4): 183-186. 1989.

KATZ, N. & ALMEIDA, K. Esquistossomose, xistosa, barriga d'água. **Ciência e Cultura**. 55: 1-8. 2003.

KIKUTH, W. & GÖNNERT, R. Experimental studies on the therapy of schistosomiasis. **Ann. Trop. Med. Parasit.** 42: 256-267. 1948.

KINOTI G. K. The significance of variation in the susceptibility of *Schistosoma mansoni* to the antischistosomal drug oxamniquine. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**. 82 (Supl. IV): 151-156. 1987.

KRAMERS, P. G. N.; GENTILE, J. M.; GRYSEELS, B. J. M.; JORDAN, P.; KATZ, N.; MOTT, K. E.; MULVIHILL, J. J.; SEED, J. L.; FROHBERG, H. Review of the genotoxicity and carcinogenicity of antischistosomal drugs; is there a case for a study of mutation epidemiology? Report of a task group on mutagenic antischistosomals. **Mutat. Res.** 257: 49-89. 1991.

KUSEL, J. & HAGAN, P. Praziquantel – its use, cost and possible development of resistance. **Parasitol. Today**. 15 (9): 352-354. 1999.

LAMBERT, C. R. & STAUFFER, P. Chemotherapy of experimental *Schistosoma mansoni* infections with a nitrothiazole derivate, CIBA 32, 644-Ba. **Ann. Trop. Med. Parasit.** 58: 292-303. 1964.

LASIC, D. L. **Lipossomes: from physics to applications**. Amsterdam: Elsevier. 1993.

LASIC, D. L. Recent development in medical applications of lipossomes in cancer therapy and gene delivery *in vivo*. **Control. Release**. 48 (2-3): 203-222. 1997.

LEOPOLD, G.; UNGETHUM, W.; GROLL, E.; DIEKMAN, H. W.; NOWAK, H.; WEGNER, D. H. Clinical pharmacology in normal volunteers of praziquantel, a new drug against schistosomes and cestodes. An example of a complex study covering both tolerance and pharmacokinetics. **Eur. J. Clin. Pharmacol.** 14: 281-291. 1978.

LIANG, Y. S.; COLES, G.; DOENHOFF, M. J.; VAUGHAN, R. S. *In vitro* responses of praziquantel-resistant and susceptible *Schistosoma mansoni* to praziquantel. **Int. J. Parasitol.** 31:1227-1235. 2001.

- LIMA, S. F.; VIEIRA, L. Q.; HARDER, A.; KUSEL, J. R. Effects of culture and praziquantel on membrane fluidity parameters of adult *Schistosoma mansoni*. **Parasitology**. 109: 57-64. 1994.
- LOVERDE, P. T.; DEWALD, J.; MINCHELLA, D. J.; BOSSHARDS, S. C.; DAMIAN, R. T. Evidence for host-induced selection in *Schistosoma mansoni*. **J. Parasitol.** 71: 297-301. 1985.
- LUTTERMOSER, G. W. Studies on the chemotherapy of experimental schistosomiasis. I. A method for detecting schistosomicidal activity based on response of *Schistosoma mansoni* infections in mice to Fuadin therapy. **J. Parasit.** 40: 130-137. 1954.
- MADDEN, T. D.; HARRIGAN, P. R. & TAI, L. The accumulation of drugs within large unilamellar vesicles exhibiting a proton gradient. **A Survey. Chem. Phys. Lipids**. 53: 37-46. 1990.
- MAHMOUD, A. A. & WARREN, K. S. Antiinflammatory effects of tartar ermetic and niridazole: suppreton of schistosome egg granuloma. **J. Immunol.** 112: 222-228. 1974.
- MARTINEZ, E. M.; NEVES, R. H.; OLIVEIRA, R. M. F.; MACHADO-SILVA, J. R.; REY, L. Características biológicas e morfológicas de cepas brasileiras de *Schistosoma mansoni* em *Mus musculus*. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** 36 (5): 557-564. 2003.
- MEHLHORN, H.; BECKER, B.; ANDREWS, P.; THOMAS, H.; PRENKEL, J. K. *In vitro* and *in vivo* experiments on the effects of praziquantel on *Schistosoma mansoni*. A light and eletron microscopy study. **Arzneim. Forsch./Drug Res.** 31:544-554. 1981.
- METWALLY, A.; BENETT, J.; BOTROS, S.; EBEID, F.; EL-ATTAR, G. D. M. Impact of drug dosage and bioavailability and efficacy of praziquantel. **Pharmacol. Res.** 31 (1): 53-59. 1995.

- MODHA, J.; REDMAN, C. A.; THORNHILL, J. A.; KUSEL, J. R. unanswered questions on the basic biology of the host-parasite relationship. **Parasitol. Today**. 14 (10): 396-401. 1998.
- MONTERO, R.; FLISSER, A.; MADRAZO, I.; CUEVAS, C.; OSTROSKY-WEGMAN, P. Mutation at the HPRT locus in patients with neurocysticercosis treated with praziquantel. **Mutat. Res.** 305: 181-188. 1994.
- MONTERO, R. & OSTROSKY, P. Genotoxic activity of praziquantel. **Mutat. Res.** 387: 123-139. 1997.
- MORCOS, S. H.; MOHAMED, T. K.; MOUSTAFA, M. M.; SALEH, S.; ISHAK, E. A.; GIRGIS, N. I.; DUNN, M. A. Reversal of hepatic fibrosis after praziquantel therapy of murine schistosomiasis. **Am. J. Med. Hyg.** 34 (2): 314-321. 1985.
- MOURÃO, S. C. **Preparação e caracterização de lipossomas contendo praziquantel**. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, Araraquara, São Paulo, 2001.
- MOURÃO, S. C.; COSTA, P. I.; SALGADO, H. R. N.; GREMIÃO, M. P. D. Improvement of antischistosomal activity of praziquantel by incorporation into phosphatidylcholine-containing liposomes. **Int. J. of Pharmac.** 295: 157-162. 2005.
- OLIVIER, L. & STIREWALT, M. A. An efficient method for exposure of mice to cercariae of *Schistosoma mansoni*. **J. Parasit.** 38: 19-23. 1952.
- PAX, R.; BENETT, J. L. & FETTERER, R. A benzodiazepine derivative and praziquantel: effects on musculature of *Schistosoma mansoni* and *Schistosoma japonicum*. **Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.** 304-309. 1978.
- PELLEGRINO, J.; OLIVEIRA, C. A.; FARIA, J.; CUNHA, A. S. New approach to the screening of drugs in experimental schistosomiasis mansoni in mice. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 11: 201-215. 1962.
- PELLEGRINO, J. & FARIA, J. The oogram method for the screening of drugs in schistosomiasis mansoni. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 14: 363-369. 1965.

PELLEGRINO, J & KATZ, N. Experimental chemotherapy of Schistosomiasis mansonii. **Ad. in Parasitol.** 6: 233-290. 1968.

PELLEGRINO, J.; LIMA-COSTA F. F.; CARLOS M. A.; MELLO, R. T. Experimental chemotherapy of *Schistosoma mansonii*: XIII. Activity of praziquantel, an isoquinoline-pyranzino derivate, on mice, hamsters and cebus monkeys. **Z. Parasitenkd.** 52:151-168. 1977.

PEREIRA, C.; FALLON, P. G.; CONETTE, J.; CAPRON, A.; DOENHOFF, M. J.; PIERCE, R. J. Alterations in cytochrome-c oxidase expression between praziquantel-resistant and susceptible strains of *Schistosoma mansonii*. **Parasitology.** 117: 63-73. 1998.

PICA-MATOCCIA, L. & CIOLI, D. Sex and stage-related sensitivity of *Schistosoma mansonii* to in vitro praziquantel treatment. **Int. J. Parasitol.** 34: 527-533. 2004.

PICQUET, M.; VERCRUYSSSE, J.; SHAW, D. J.; DIOP, M.; LY, A. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** 92: 90-93. 1998.

PIMENTEL-GOMES, F. **Curso de estatística experimental.** 14^a ed. Piracicaba: USP/ESALQ. 477p. 2000.

PRATA, A. Tipos de ovos de *Schistosoma mansonii*. In: **Biópsia retal na esquistossomose mansonii.** Rio de Janeiro: Serviço Nacional de Educação Sanitária. p.15-60. 1957.

RANSON, C. A.; HOWELL, A.; CHESEMAN, S.; MARGISON, J. Liposomal drug delivery. **Cancer Treat. Rev.** 22 (5): 365-379. 1996.

RIBEIRO-DOS-SANTOS, G.; VERJOVSKI-ALMEIDA, S.; LEITE, L. C. C. Schistosmiasis – a century searching for chemotherapeutic drugs. **Parasitol. Res.** 99: 505-521. 2006.

RICHARDS, H. C. & FOSTER, R. A new series of 2-aminomethyltetra hydroquinaline derivatives displaying schistosomicidal activity in rodents and primates. **Nature.** 222: 581-582. 1969.

RICHARDS, F. Jr.; SULLIVAN, J.; RUIZ-TIBEN, E. M.; EBERHARD, M.; BISHOP, H. Effect of praziquantel on the eggs of *Schistosoma mansoni*, with a note on the implications for managing central nervous system schistosomiasis. **Ann. Trop. Med. Parasit.** 83 (5): 465-472. 1989.

ROCHA, R. L.; ROCHA, M. O. C., PEDROSO, E. R. P.; COLOSIMO, E. A., COELHO, P. M. Z. Egg excretion in the initial phase of experimental murine schistosomiasis mansoni: stability and association with worm burden. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo.** 37: 325-329. 1995.

ROSI, D.; PERUZZOTI, G.; DENNIS, E. W.; BERBERIAN, D. A.; FREELE, H. & ACHER, S. A new active metabolite of Miracid D. **Nature.** 208: 1005-1006. 1965.

RUMJANEK, F. D. & McLAREN, D. J. *Schistosoma mansoni*: modulation of schistosomular lipid composition by serum. **Mol. Biochem. Parasitol.** 3: 239-252. 1981.

SABAH, A. A.; FLETCHER, C.; WEBBE, G.; DOENHOFF, M. J. *Schistosoma mansoni*: chemotherapy of infections of different ages. **Exp. Parasitol.** 61: 294-303. 1986.

SALAFSKY, B.; FUSCO, A. C.; LI, L. H.; MUELLER, J.; ELLENBERGER, B. *Schistosoma mansoni*: experimental chemoprophylaxis in mice using oral anti-penetration agents. **Exp. Parasitol.** 69 (3): 263-271. 1989.

SAS INSTITUTE INCORPORATION. **SAS users guide: statistics release 6.12.** North Caroline: Cory. 1098 p. 1996.

SAVIOLI, L.; RENGANATHAN, E.; MONTRESOR, A.; DAVIS, A.; BEHBEHANI, K. Control of schistosomiasis – A global picture. **Parasitol. Today.** 13(11):444-448. 1997.

SCHILLER, E. L. & HAESE, W. H. Histologic processes of the healing in hepatic injury due to eggs of *S. Mansoni* in mice following curative chemotherapy. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 22: 211-214. 1973.

SCHUBERT, M. Conditions for drug testing in experimental schistosomiasis mansoni in mice. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 28:121-136. 1948.

SHAW, M. K. & ERASMUS, D. A. *Schistosoma mansoni*: the presence and ultrastructure of vitelline cells in adult males. **J. Helminthol.** 56: 51-53. 1982.

SHAW, M. K. & ERASMUS, D. A. *Schistosoma mansoni*: dose-related tegumental changes after *in vivo* treatment with praziquantel. **Z. Parasitenkd.** 69:643-653. 1983.

SHAW, M. K. & ERASMUS, D. A. *Schistosoma mansoni*: praziquantel-induced changes to the female reproductive system. **Exp. Parasitol.** 65: 31-42. 1988.

SHUHUA ,X.; BINGGUI, S.; CHOLLET, J.; TANNER, M. Tegumental changes in adult *Schistosoma mansoni* harboured in mice treated with praziquantel enantiomers. **Acta Trop.** 76: 107-117. 2000.

SILER-MARINKOVIC, S.; MOJOVIC, L.; DAVINIC, V.; BUGARSKY, B. Liposomes as carriers of antimicrobial drugs. **Drug. Dev. Pharm.** 23 (5):483-488. 1997.

SILVA, S. P. & NOËL, F. Time course of the effect of praziquantel on *Schistosoma mansoni* attachment *in vitro*: comparison with its effects on worm length and motility. **Parasitol. Res.** 81: 543-548. 1995.

SINGH, K. P.; GERARD, H. C.; HUDSON, A. P.; BOROS, D. L. Expression of matrix metalloproteinases and their inhibitors during the resorption of schistosome egg-induced fibrosis in praziquantel-treated mice. **Immunology.** 111: 343-352. 2004.

SOUZA, C. P.; ARAÚJO, N.; CARVALHO, O. S.; FREITAS, J. R. Potencialidade de *Biomphalaria tenagophila* do Lago da Pampulha, Belo Horizonte, MG, como hospedeira do *Schistosoma mansoni*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** 82: 67-70. 1987.

STANDEN, O. D. Chemotherapy of helminthic infections. *In*: SCHNITZER, R. J. & HAWKING, F. **Experimental Chemotherapy.** London: Academic Press Inc. 892p. 1963.

STEINER, K.; GARBE, A.; DIECKMANN, H. W.; NOVAK, H. The fate of praziquantel in the organism. I: Pharmacokinetics in animals. **Eur. J. Drug. Metab. Pharmacikinet.** 1: 85-95. 1976.

STELMA, F. F.; TALLA, I.; SOW, S.; KONGS, A. Efficacy and side effects of praziquantel in an epidemic focus of *Schistosoma mansoni*. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 53: 167-170. 1995.

STONE, P. J. Potential use of collagen and elastin degradation markers for monitoring liver fibrosis in schistosomiasis. **Acta Trop.** 77: 97-99. 2000.

SUCEN – Superintendência de Controle de Endemias. Esquistossomose Mansônica. <http://www.sucen.sp.gov.br/doencas/index.htm>. 2004.

TADA, A. Regulation of reaginic antibody formation in animals. **Progress in Allergy.** 19: 122-130. 1975.

THOMAS, H.; GÖNNERT, R.; POHLKE, R.; SEUBERT, J. A new compound against adult tapeworms. **Proceedings of the 7th International Conference of the World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology, Thessaloniki.** p. 51. 1975.

THOMPSON, P. E.; MEISENHELDER, J. E.; NAJARIAN, H. Laboratory studies on the joint effects of tris (*p*-aminophenyl)-carbonium salts, tris (*p*-aminophenyl) methanol, and Lucanthone hydrochloride against *Schistosoma mansoni*. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 11: 31-45. 1962.

VALENCIA, C. I.; CATTO, B. A.; WEBSTER, L. T. Jr.; BARCELON, E.; OFENDO-REYES, R. Concentration time course of praziquantel in Filipinos with mild *Schistosoma japonicum* infection. **Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health.** 25: 409-414. 1994.

VEMURI, S. & RHODES, C. T. Preparation and characterization of liposomes as therapeutic delivery systems: a review. **Pharm. Acta Helv.** 70: 95-111. 1995.

UTZINGER, J.; KEISER, J.; SHUHUA, X.; TANNER, M.; SINGER, B. H. Combination chemotherapy of schistosomiasis in laboratory studies and clinical trials. **Antimicrob. Agents Chemother.** 1487-1495. 2003.

WAGNER, D. H. G. The profile of trematodicidal compound praziquantel. **Arzneimittelforschung.** 34: 1132-1136. 1984.

WARREN, K. S. The influence of treatment on the development and course of murine hepato-splenic schistosomiasis mansoni. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** 56: 510-519. 1962.

WARREN, K. S. The contribution of worm burden and host response to the development of hepatoesplenic schistosomiasis mansoni in mice. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 12: 34-39. 1963.

WEBBE G. & JAMES, C. A comparison of the susceptibility to praziquantel of *Schistosoma haematobium*, *S. japonicum*, *S. mansoni*, *S. intercalatum* and *S. mattheei* in hamsters. **J. Parasitenkd.** 52: 169-177. 1977.

WEINER, N.; MARTIN, F. & RIAZ, M. Liposomes as a drug delivery system. **Drug Dev. Ind. Pharm.** 15: 1523-1554. 1989.

WOLD-MUSSIE, E.; VANDE WAA, J.; PAX, R. A.; FETTERER, R. H.; BENETT, J. L. *Schistosoma mansoni* : calcium efflux and effects of calcium-free media on responses of the adult male musculature to praziquantel and other agents inducing contraction. **Exp. Parasitol.** 53: 270-278. 1982.

WOOLHOUSE, N. M. Biochemical and pharmacological affects in relation on the mode of action of antischistosomal drugs. **Biochem. Pharmacol.** 28: 2413-2418. 1979.

XAVIER, E. M.; LUCENA-SILVA, N.; WERKHAUSER, R. P.; FRANCO, G. R.; SANTOS, R. A. A. L.; SIMPSON, A. J. G.; ABATH, F. G. C. The tegument of *Schistosoma mansoni*: genes, antigens and the host-parasite relationship. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** 93: 85-86. 1998.

XIAO, S. H.; YU, Y. G.; WANG, C. Y.; JIAO, P. Y.; YUAN, X. J.; LIANG, Y. The uptake and distribution of [³ H]-pyquitol in *Schistosoma japonicum*. **Chung Kuo Yao Li Hsuch Pao.** 16: 488-493. 1981.

XIAONONG, Z.; MINGGAG, C.; MCMANUS, D.; BERGQUIST, R. Schistosomiasis control in the 21 st century. **Acta Trop.** 82: 95-114. 2001.

YEANG, F. S. W.; MARSHALL, I.; HUGGINS, M. Oxaminiquine resistance in *Schistosoma mansoni*: factor or fiction? **Ann. Trop. Med. Parasitol.** 81: 337-339. 1987.

YOLLES, T. K.; MOORE, P.V.; DE GINSTI, D.L.; RIPSON, C.A. & MELENEY, H.E. A technique for the perfusion of laboratory animals for the recovery of schistosomes. **J. Parasit.** 33: 419-26, 1947.

ZANOTTI-MAGALHÃES E. M.; MAGALHÃES, L. A.; CARVALHO, J. F. Relação entre a patogenicidade de *Schistosoma mansoni* em camundongos e a suscetibilidade do molusco vetor. I- Infeciosidade das cercárias e carga de vermes. **Rev. Saúde Pública.** 25: 359-366. 1991.

ANEXO



Universidade Estadual de Campinas
Instituto de Biologia



CEEA-IB-UNICAMP

Comissão de Ética na Experimentação Animal
CEEA-IB-UNICAMP

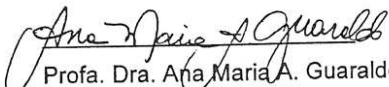
CERTIFICADO

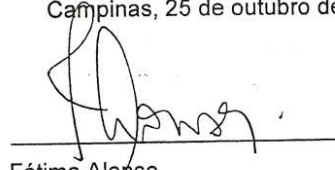
Certificamos que o Protocolo nº 1117-1, sobre "AVALIAÇÃO DO EFEITO DO PRAZIQUANTEL ASSOCIADO A LIPOSSOMA EM SCHISTOSOMA MANSONI IN VIVO", sob a responsabilidade de Profa. Dra. Silmara Marques Allegretti / Tarsila Ferraz Frezza, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA)-IB-UNICAMP em reunião de 25 de outubro de 2006.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 1117-1, entitled "IN VIVO EFFECTS OF LIPOSOME-INCORPORATED PRAZIQUANTEL ON SCHISTOSOMA MANSONI", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - UNICAMP) on October 25, 2006.

Campinas, 25 de outubro de 2006.


Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente


Fátima Alonso
Secretária Executiva

CEEA/IB - Unicamp
Caixa Postal 6109
13083-970 Campinas, SP - Brasil

Telefone: (19) 3788-6359
Telefax: (19) 3788-6356
E-mail: ceea@cemib.unicamp.br
<http://www.ib.unicamp.br/institucional/ceea/index.htm>