SECRETARIA
DE
PÓS-GRADUAÇÃO
I. B.

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

CLAUDINEIDE NASCIMENTO FERNANDES DE OLIVEIRA

"Estudo da atividade de *Phyllanthus amarus L.* contra o *Schistosoma mansoni* linhagem BH"

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato (a) Claudineide Nascimento F. de Oliveira e aprovada pela Comissão Julgadora.

Dissertação apresentada ao Instituto de Biologia para obtenção do Título de Mestre em Parasitologia.

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

Campinas, 2008

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA

BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP

Oliveira, Claudineide Nascimento Fernandes de

Ol41e Estudo da atividade de *Phyllanthus amarus L.* contra o *Schistosoma mansoni* linhagem BH / Claudineide Nascimento Fernandes de Oliveira. – Campinas, SP: [s.n.], 2008.

Orientadora: Silmara Marques Allegretti.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. *Phyllanthus amarus*. 2. *Schistosoma mansoni*. 3. Extrato etanólico. 4. Extrato hexânico. 5. Lignanas. I. Allegretti, Silmara Marques, 1963-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.

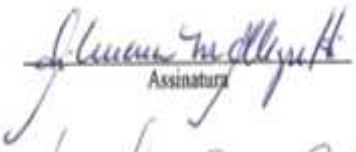
(pbg/ib)

Título em inglês: Study of *Phyllanthus amarus L*. activity against *Schistosoma mansoni* strain BH.
Palavras-chave em inglês: *Phyllanthus amarus*; *Schistosoma mansoni*; Ethanolic extract; Hexane extract; Lignans.
Área de concentração: Parasitologia.
Titulação: Mestre em Parasitologia.
Banca examinadora: Silmara Marques Allegretti, Vera Lúcia Garcia Rehder, Mara Cristina Pinto.
Data da defesa: 18/12/2008.
Programa de Pós-Graduação: Parasitologia.

Campinas, 18 de dezembro de 2008

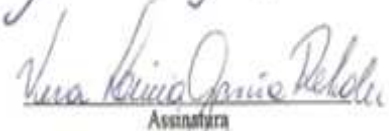
BANCA EXAMINADORA

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



Assinatura

Profa. Dra. Vera Lúcia Garcia Rehder



Assinatura

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

Assinatura

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

Assinatura

Prof(a). Dr(a) . Marili Villa Nova Rodrigues

Assinatura

À Júlio César meu marido (grande incentivador de tudo).

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Silmara Marques Allegretti, pela orientação, dedicação, disponibilidade e paciência ao longo do mestrado e principalmente pela amizade e carinho que sempre demonstrou desde a minha chegada ao Departamento.

À Coordenação da subcomissão de Pós-Graduação em Parasitologia, na pessoa da Profa. Dra. Regina Maura Bueno Franco, pelo auxílio prestado.

Aos membros da banca de exame prévio Profa. Dra. Marlene Tiduko Ueta, Profa. Dra.Vera Lúcia Garcia Rehder, Profa. Dra. Mara Cristina Pinto e Profa. Dra. Marili Villa Nova Rodrigues que com suas considerações e críticas me auxiliaram na conclusão dessa dissertação.

Ao Dr. Rubens Riscala Madi ("Rubensnildo") pelas análises estatísticas, amizade e paciência.

Aos técnicos do Departamento de Parasitologia da Unicamp, João Batista Alves de Oliveira e Ivo Gonçalves Pereira, que me ajudaram sempre, facilitando a minha vida de estudante e farmacêutica.

As minhas amigas e companheiras de experimentos Luciana ("Lúcia"), Tamy ("Tamisnilda") e Tarsila ("Ervilha"), pela ajuda e apoio técnico e também pelo companheirismo e demonstração de amizade nos momentos mais difíceis, sempre trazendo palavras de entusiasmo e conforto. Com certeza sem isso a realização deste trabalho teria sido muito mais difícil. Obrigada meninas, a amizade de vocês foi fundamental!!!!!

A todos os amigos que fazem parte do L3, que com o bom humor e muitas risadas sempre deixaram o trabalho mais gostoso de ser realizado. E aos professores que compartilharam os seus conhecimentos nas suas aulas durante todo o curso.

À Taline e Helen, pelo companheirismo, amizade e por sempre demonstrar felicidade com as minhas conquistas durante esse tempo de curso. Essa amizade será eterna.

Ao meu marido Dr. Júlio César R. F. de Oliveira, maior incentivador desta minha conquista, um exemplo de amor à ciência e incansável busca da disseminação do saber. Obrigada marido pela sua paciência (e quanta paciência), companheirismo e incondicional apoio, sem os quais seria impossível a realização deste trabalho.

À Papai, Mamãe e meus irmãos, Fá, Lela e Júnior pelo amor e mesmo longe sempre me incentivaram a lutar pelos meus ideais.

Ao meu cunhado Juliano (Juliné), por ter feito companhia ao meu marido durante as minhas ausências e por ser tão prestativo sempre que precisei.

Ao Ruy Donizetti e Renato Masteguin, meus patrões da Farlog, que sempre confiaram no meu trabalho e permitiram as minhas idas à Unicamp durante os horários de expediente.

À Divis por ter sido mais que uma amiga, uma verdadeira mãe, sempre me incentivando.

À Carol, por ter sido amiga e companheira durante esse período de tanto trabalho, e por ter feito os meus dias mais alegres me fazendo rir muito nas nossas "aventuras alimentícias".

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS vii

LISTA DE FIGURAS viii

RESUMO ix

ABSTRACT x

I. INTRODUÇÃO 1

II. OBJETIVOS 14

III. MATERIAL E MÉTODOS 15

IV. RESULTADOS 27

V. DISCUSSÃO 43

VI. CONCLUSÕES 56

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 58

VIII. ANEXOS 72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Efeito das concentrações dos Extratos Hexânico, Etanólico e fração de Lignanas sobre a população de vermes adultos de *Schistosoma mansoni*. Tratamento no 30º dia de infecção.....32

Tabela 2: Efeito das concentrações dos Extratos Hexânico, Etanólico e fração de Lignanas sobre a população de vermes adultos de *Schistosoma mansoni*. Tratamento no 45º dia de infecção.....33

Tabela 3: Efeito das concentrações dos Extratos Hexânico (EH), Etanólico (EE) e fração de Lignanas (LIG) sobre a oviposição do *Schistosoma mansoni*. Tratamentos no 30º e 45° dia de infecção.....35

Tabela 4: Efeito das concentrações dos Extratos Hexânico (EH), Etanólico (EE) e fração de Lignanas (LIG) sobre o oograma. Tratamentos no 30 º e 45º dia de infecção.....37

Tabela 5: Efeito das concentrações dos extratos hexânico, etanólico e fração de Lignanas nos granulomas dos órgãos analisados (fígado, baço, intestino e pulmão) e efeito sobre a área dos granulomas no fígado. Tratamentos realizados aos 30 dias de infecção.....41

Tabela 6: Efeito das concentrações dos extratos hexânico, etanólico e fração de Lignanas nos granulomas dos órgãos analisados (fígado, baço, intestino e pulmão) e efeito sobre a área dos granulomas no fígado. Tratamentos realizados aos 45 dias de infecção.....42

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Verme adulto fêmea (A); Verme adulto macho (B).....3

Figura 2: Ciclo de vida *Schistosoma mansoni*.....5

Figura 3: Foto de *P. amarus L.* cultivada no Campo Experimental do CPQBA – UNICAMP.....15

Figura 4: Vista das plantas na Casa de Vegetação do CPQBA.....16

Figura 5: Frações obtidas da coluna seca do EH.....17

Figura 6: Lignanas isoladas de *P. amarus*.....18

Figura 7: Esquema de cronograma das infecções.....22

Figura 8: Escala visual de granulomas no baço.....24

Figura 9: Escala visual de granulomas no fígado.....24

Figura 10: **A.** Quantidade de vermes recuperados das veias mesentéricas e veia porta. **B.** Quantidade de vermes recuperados das vísceras.....29

Figura 11: **A.** Redução do número de vermes no 30° dia de infecção. **B.** Redução do número de vermes no 45° dia de infecção.....30

Figura 12: Quantidade de ovos por grama de fezes.....36

Figura13: Oograma dos grupos tratados aos: **A.** 30 dias de infecção; **B.** 45 dias de infecção.....38

RESUMO

A esquistossomose mansônica é uma doença crônica e debilitante. Estima-se que mais de 200 milhões de pessoas estejam infectadas no mundo pela doença, e no Brasil estima-se que existe de 8 a 10 milhões de pessoas infectadas. O tratamento da esquistossomose é baseado na quimioterapia com o praziquantel, principalmente devido a sua atividade contra todas as espécies de *Schistosoma* patogênicas ao homem. Infelizmente, o uso extensivo e inapropriado desse fármaco pelo mundo, culminou com o aparecimento de esquistossomas tolerantes, gerando uma preocupação sobre a seleção da resistência a esse medicamento. Então, para se controlar a esquistossomose, há necessidade de se desenvolver novas opções de fármacos, como alternativa ao praziquantel. As plantas medicinais vêm sendo aplicadas e testadas como novas alternativas medicamentosas para o tratamento de parasitoses. Este estudo teve por objetivo avaliar a atividade esquistossomicida da planta *Phyllanthus amarus L.* sobre *Schsistosoma mansoni*, linhagem BH em camundongos *Swiss.* Foram testados os extratos hexânico e etanólico nas concentrações 100, 150 e 250mg/Kg, e a fração de Lignanas 50 e 100mg/Kg, administrados em dose única por tubagem esofágica. Os animais foram divididos em dois grupos de acordo com o período de tratamento (30 ou 45 dias após a infecção para avaliar a ação dos extratos nos vermes jovens e adultos, respectivamente). Foram analisados os seguintes parâmetros: quantidade/ porcentagem de vermes adultos nas veias mesentéricas, porta e nas vísceras; proporção entre machos e fêmeas; redução no número de vermes; redução no número de ovos eliminados para o ambiente externo e retidos no tecido intestinal; alteração no oograma; aspecto visual dos granulomas nas vísceras; alteração no tamanho dos granulomas encontrados no fígado. De acordo com os resultados obtidos, o tratamento feito com o extrato etanólico 250mg/Kg no 30° dia de infecção, foi o que apresentou maior redução do número de vermes (63%), e o grupo tratado com o extrato hexânico 100mg/Kg nesse mesmo período foi o que apresentou maior quantidade de vermes nas vísceras (n=3,1). Já os tratamentos feitos com o extrato etanólico 100mg/Kg e a fração de Lignanas 50mg/Kg após 30 dias de infecção, conseguiram cessar a postura de ovos, o que fez com que os órgãos desses grupos fossem pouco lesados. Ocorreu ausência de granulomas nos fígados observados histologicamente para o grupo tratado com o extrato etanólico 100mg/Kg. No 45° dia após a infecção o grupo tratado com o extrato hexânico 150mg/Kg foi o que apresentou resultado mais significativo, uma vez que ele conseguiu reduzir o número de ovos imaturos e aumentar o de ovos maduros, indicando que este tratamento alterou a oviposição do verme. Os resultados obtidos para os extratos hexânico e etanólico e fração de Lignanas demonstraram potencial atividade nos diferentes parâmetros avaliados, evidenciando que a planta *P. amarus* possui efeito contra o *S. mansoni* linhagem BH.

Palavras-chave: *Schistosoma mansoni; Phyllanthus amarus;* extrato etanólico; extrato hexânico; Lignanas.

ABSTRACT

The schistosomiasis is a chronic and debilitating disease. It is estimated more than 200 million people worldwide are infected by the disease, and in Brazil is estimated 8 to 10 million people infected. The treatment of schistosomiasis is based on praziquantel chemotherapy, mainly due to its activity against all species of pathogenic *Schistosoma* to humans. The inappropriate and extensive use of this drug in the world culminated in the appearance of tolerant worms, generating a concern about the selection of resistance this drug. So, to control schistosomiasis, there is need to develop new options for drugs, as an alternative to the praziquantel. Medicinal plants have been implemented and tested as a new alternative drug for the treatment of parasitic. The objective of this study was to assess the presence of antichistosomal activity of the plant *Phyllanthus amarus L*. using *Schistosoma mansoni* infected mice of BH strain. The hexane and ethanolic extracts with 100, 150 and 250mg/Kg, concentrations and the Lignans fraction 50 and 100mg/kg, were administered with single oral dose by esophageal intubation. The animals were divided into two groups according to the treatment period (30 or 45 days after infection to evaluate the effect of the extracts in young and adult worms respectively). Analyzes performed consists in a set of parameters: quantity / percentage of adult worms in the veins mesenteric, port and the viscera; proportion of male and female worms, worms reduction; eggs reduction eliminated environment and retained in the intestinal tissue; change in oograma; visual aspect of granulomas in the viscera; change in the size of granulomas found in the liver. According to the results, the treatment with ethanolic extract 250mg/Kg in 30^{th} days of infection, presented the greatest reduction in the number of worms (63%), and the group treated with the hexane extract 100mg/kg in same period presented the highest number of worms in the viscera (n=3.1). The treatments made with ethanolic extract 100mg/kg and the Lignans fraction 50mg/kg after 30 days of infection managed to stop the egg laying. So that the organs of these groups were slightly injured. There was absence of granulomas in the liver observed histological for the group treated with ethanolic extract 100mg/kg. In the 45^{th} days after infection the group treated with the hexane extract 150mg/Kg presented the most significant result, as to reduced the number of immature eggs, and increased of mature eggs, indicating that this treatment has changed the worm oviposition. The results for the ethanol, hexane extracts and fraction of Lignans demonstrated potential activity in the various parameters measured, suggesting that the plant *P. amarus* has effect against *S.mansoni* strain BH.

Key words: *Schistosoma mansoni*; *Phyllanthus amarus*; ethanolic extract; hexane extract; Lignans.

I. INTRODUÇÃO

A esquistossomose é uma das infecções parasitárias mais prevalentes no mundo. É uma doença endêmica, que afeta mais de 200 milhões de pessoas distribuídas em 76 países da África, Ásia, América do Sul e Central. É a segunda doença tropical mais prevalente, depois da malária, causando morbidade e mortalidade em extensas áreas de todo o mundo (Jiagang, 2003, Mendes *et al*., 1999, Mott, 1992, WHO, 1998). Do total de pessoas infectadas 120 milhões são sintomáticos, e estima-se que 20 milhões tenham a forma grave da doença, e em torno de 650 milhões de pessoas estão em áreas de risco (Capron, 1998, Jiagang, 2003; Ramos, 2004).

A maioria dos estudos indica que a esquistossomose tenha sido introduzida no Brasil pelos escravos, originários da costa ocidental da África que ingressaram no país pelos portos de Recife e Salvador. Os escravos foram ocupados como mão-de-obra em lavouras de cana de açúcar, onde existiam condições bioecológicas para que se completasse o ciclo evolutivo do parasita assinalando assim, que a expansão da esquistossomose em território brasileiro acompanhou as correntes de migração interna, sendo condicionada pela presença do molusco hospedeiro intermediário suscetível. No século XVII, surge movimento migratório orientado para o interior dos Estados da Paraíba, Rio Grande do Norte, Ceará, Alagoas, Sergipe e Bahia, destinado a implementar criação de gado, com a finalidade de abastecer o mercado aberto com a colonização do litoral nordestino, decorrente da exploração de cana-de-açúcar. É possível que o translado de mão-de-obra escrava, fixada inicialmente na orla litorânea, para o interior, tenha iniciado o deslocamento da área endêmica de esquistossomose para regiões onde, até hoje, são elevados os índices de infecção autóctone, como alguns municípios dos Estados da Paraíba, Pernambuco, Sergipe e Alagoas (Chief & Waldman, 1998; Passos, 1998).

No século XVIII, criaram-se condições para que a esquistossomose viesse a atingir áreas no interior de Minas Gerais e Bahia, como decorrência de deslocamentos populacionais para essas regiões, atraídos pela descoberta de jazidas auríferas e de outros minerais preciosos. No Estado de São Paulo a introdução da cultura cafeeira na região do

Vale do Paraíba determinou, em meados do século XIX, a introdução da parasitose no Estado (Chief & Waldman, 1998).

O Parasito

Em 1852, no Cairo, Teodore Bilharz, ao fazer necropsia, encontrou, pela primeira vez, em veias mesentéricas, os vermes que ficaram conhecidos como "esquistossomos". Deve-se a este fato a denominação de "bilharziose" ou "bilharzíase" como sinonímia para esquistossomose, mas é também conhecida como xistose, barriga d' água, doença dos caramujos e outras designações menos usuais (Passos, 1998).

O parasito causador da esquistossomose é um trematódeo digenético que pertence ao filo Platyhelminthes. Na família Schistosomatidae, apenas os vermes pertencentes ao gênero *Schistosoma* têm como característica a existência de sexos separados, com nítido dimorfismo sexual e também é o único de interesse médico (Coelho, 1970; Passos, 1998; Ramos, 2004). Pertencente a este gênero existem cinco espécies que parasitam o homem, de forma eventual ou sistemática, são elas: *S. haematobium* que causa a esquistossomose urinária e *S. mansoni* e *S. japonicum*, que causam a esquistossomose intestinal, sendo essas três espécies responsáveis por 95% dos casos humanos e ainda há *S. intercalatum* e *S. mekongi*, bem menos freqüentes (Coura & Amaral, 2004; Jiagang, 2003; Mott, 1992; Olds & Daranthy, 2000).

No Brasil, até o momento, apenas a espécie *Schsitosoma mansoni* (Figura 1) é encontrada, porém, uma vez introduzida em nosso território, encontrou condições favoráveis à transmissão como a presença de um hospedeiro intermediário, favorecendo o ciclo biológico heteroxênico. O molusco pulmonado, que vive em água doce, é o principal responsável pela alta prevalência da infecção principalmente nas regiões tropicais, onde a utilização desta água é de grande importância para populações locais. Três espécies de moluscos do gênero *Biomphalaria,* são os hospedeiros intermediários do *S. mansoni* no Brasil: *B. glabrata, B. tenagophila e B. straminea* (Valença, 2000; Passos, 1998; Ramos, 2004).

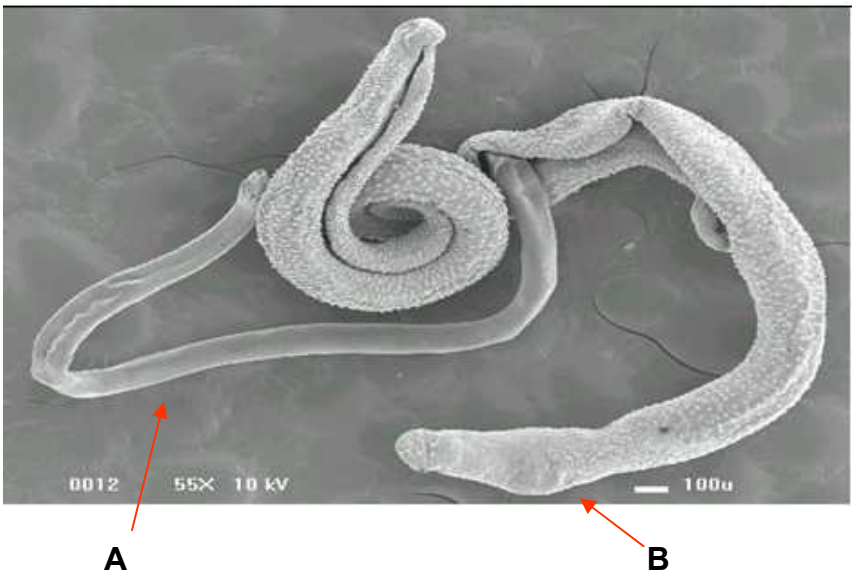


Figura 1: Verme adulto fêmea (A); Verme adulto macho (B). Fonte: Tamy Midori Banin, 2007.

Ciclo Biológico

Os casais adultos de *S. mansoni* vivem nas vênulas do plexo hemorroidário e no sistema porta. Nesses locais as fêmeas fazem a oviposição de aproximadamente 300 ovos/fêmea/dia. Esses ovos contêm embriões ciliados, os miracídios, os quais eclodem dos ovos, quando estes são eliminados na água doce juntamente com as fezes de portadores de esquistossomose, então nadam ativamente em busca do hospedeiro intermediário, o molusco do gênero *Biomphalaria.* Quando o encontra, penetra ativamente nos tecidos do molusco, efetuam poliembrionia, e transformam-se nos esporocistos primários, em tecidos localizados na proximidade do local de penetração, estes por sua vez em alguns dias vão originar os esporocistos secundários. Quando maduros os esporocistos secundários darão origem as cercárias que são as larvas infectantes para o hospedeiro vertebrado (o tempo necessário para maturação dos esporocistos e formação das primeiras cercárias é de três a quatro semanas, variando com a temperatura do ambiente). As cercárias sob o estímulo da luz e do calor abandonam ativamente o caramujo permanecendo no meio aquático até encontrarem um hospedeiro definitivo, em cujo tegumento penetrará ativamente. Nesse processo, apenas o corpo da cercária penetra ocorrendo a perda da cauda bifurcada, formando assim os esquistossômulos. Os esquistossômulos entram na corrente circulatória e chegam aos pulmões, onde ficam por alguns dias até a maturação. Chegam até o coração, de onde são

lançados através das artérias aos pontos mais diversos do organismo, constituindo-se o fígado no órgão preferencial de localização do parasito. No fígado, estas formas jovens se diferenciam sexualmente e crescem, alimentando-se de sangue. Ainda imaturos, os parasitas migram para a veia porta, passando daí às veias mesentéricas, onde geralmente ocorre o acasalamento e se dá início à postura de ovos, completando assim sua evolução (Coelho, 1970; Passos, 1998; Ramos, 2004; Valença, 2000).

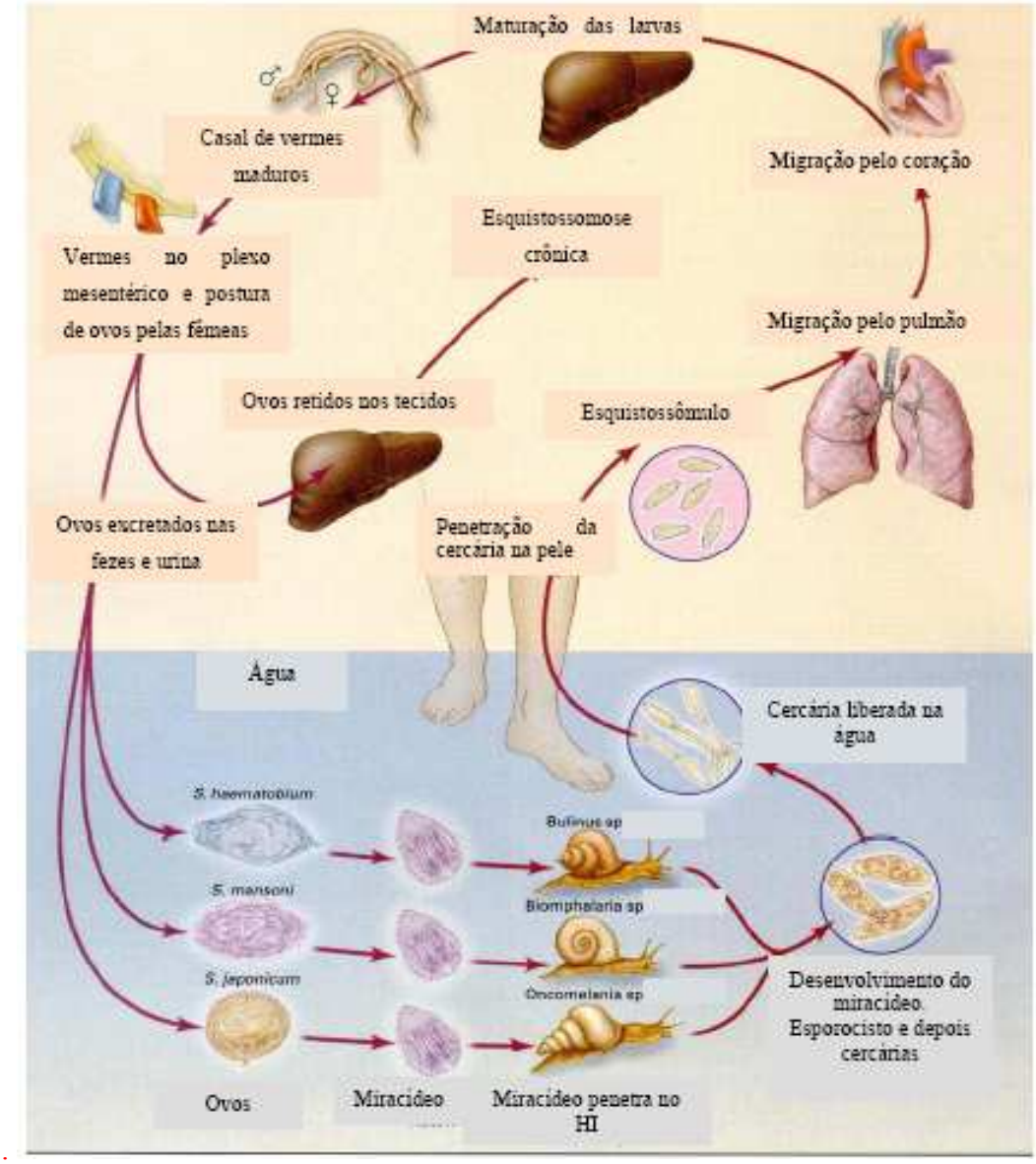


Figura 2: Ciclo de vida *Schistosoma mansoni*. Fonte: Ross *et al*., 2002.

Patologia

A evolução e sintomatologia da esquistossomose dependem da espécie do parasito em questão, da linhagem e da carga parasitária do indivíduo. A freqüência das reinfecções, o estado imunológico e a idade do indivíduo também são fatores importantes no desenvolvimento da doença (Butterworth *et al.*, 1985; Kabatereine *et al.*, 1999).

Estima-se que aproximadamente 50% dos ovos eliminados pelas fêmeas cheguem à luz intestinal, ficando o restante retido nos tecidos provocando reações inflamatórias. A patologia da infecção, mais freqüentemente, advém da deposição dos ovos nos tecidos. No intestino, os ovos induzem a um processo inflamatório com hiperplasia, ulceração, formação de micro abscessos. Contudo, os ovos que não se aderem ao epitélio intestinal são carreados pela veia porta, para o fígado ocasionando o principal e mais importante efeito patológico da infecção (Apenas os ovos maduros provocam a formação de granulomas esquistossomóticos). Inicialmente, devido à presença dos ovos no tecido hepático, tem-se a formação de granulomas, resultantes da resposta imunológica aos antígenos liberados pelos ovos de *S. mansoni*, processo que termina com a formação de uma cicatriz fibrótica (Andrade, 1998; Faria, 1999; Ramos, 2004).

O processo inflamatório granulomatoso, que se desenvolve ao redor dos ovos, tem como base uma hipersensibilidade do tipo celular. Esta reação granulomatosa ocorre em decorrência da eliminação de antígenos do miracídio, chamados genericamente de SEA (*Soluble egg antigens* – Antígenos solúveis do ovo), que atravessam a casca do ovo e estimulam células específicas e citocinas, favorecendo assim, a formação de um infiltrado de células inflamatórias ao redor dos ovos. Com a evolução do processo, os granulomas sofrem mudanças na sua composição celular, fruto das alterações na produção de citocinas e tendem a regredir ficando reduzidos a estruturas fibróticas que posteriormente serão reabsorvidos. Contudo, as alterações hepáticas parecem não decorrer apenas do processo granulomatoso e da fibrose formada posteriormente, mas também da liberação de substâncias hepatotóxicas produzidas pelos ovos do parasito (Ramos, 2004).

Na reação granulomatosa esquistossomótica as primeiras células a chegarem ao foco inflamatório são os macrófagos, que freqüentemente formam células epitelióides e gigantócitos. Logo após a chegada dessas células surgem eosinófilos, linfócitos, neutrófilos e plasmócitos, sendo que os macrófagos e eosinófilos são as células mais abundantes do infiltrado inflamatório. A proporção das populações celulares pode oscilar de acordo com o hospedeiro, com a localização do granuloma e com o tempo pós-infecção estudado. Estima-se que na esquistossomose mansônica, durante a fase aguda da infecção os granulomas hepáticos são composto por cerca de 50% por eosinófilos que tem a função primordial na

neutralização das hepatotoxinas liberadas pelos ovos de *S. mansoni* (Faria, 1999; Ramos, 2004; Valença, 2000).

Durante o processo granulomatoso as células inflamatórias vão sendo substituídas por células semelhantes a fibroblastos que se orientam em camadas concêntricas e fabricam abundantes quantidades de colágenos. Devido ao aumento da deposição de proteínas da matriz extracelular (Davis & Kresina, 1996), a estrutura do granuloma se completa com a fibrose, que se inicia na periferia desse. Com o curso crônico da infecção, os diversos pontos de fibrose podem se coalescer levando à diminuição da luz dos vasos sangüíneos e à perda da elasticidade e ocorrendo assim um aumento da pressão portal e conseqüentemente as alterações patológicas da esquistossomose na sua fase crônica. A hipertensão portal é uma das causas que proporciona o surgimento da esplenomegalia, além de levar a formação de varizes esofagianas e outras alterações que comprometem e agravam o quadro clínico do indivíduo infectado. Eventualmente, estas varizes esofagianas (ou gástricas) se rompem provocando fortes hemorragias, responsáveis por um número considerável de óbitos. Estas hemorragias são agravadas pelas alterações que a infecção causa ao processo hemostático e por isto é a primeira causa de morte da esquistossomose (Tanabe, 2003).

Além das alterações patológicas, em decorrência da reação granulomatosa, na infecção esquistossomótica alterações hematológicas como anemia são freqüentemente encontradas. Esta anemia parece ser ocasionada por múltiplos fatores, como a esplenomegalia, as hemorragias intestinais e/ou gástricas, pelas alterações na eritropoese medular, ou ainda, pela própria espoliação parasitária. Além disso, se observa uma eosinofilia acompanhada de uma neutropenia, sendo estas alterações mais evidentes na fase crônica da infecção.

Quimioterapia Esquistossomicida

A quimioterapia da esquistossomose começou na época da Primeira Guerra Mundial, com o uso do tártaro emético, que foi administrado a pacientes com esquistossomose hematóbica. Foi classificado como um antimonial trivalente, que apresentava efeitos colaterais. A necessidade de repetidas doses por via parenteral levou a pesquisa de fármacos ativos que fossem livres de metais e administrados por via oral (Arena, 1997). Os

primeiros experimentos quimioterápicos sistemáticos em laboratório foram iniciados na Alemanha em 1932, quando testaram um novo composto, Miracil A, uma aminoxantona alquilada, que pertencia a uma série de xantonas que ficaram conhecidas como compostos da série "Miracil". A partir de então, surgem novos fármacos como Miracil D, cujo nome genérico é lucanthone, o niridazole, que atuava para as três principais espécies de *Schistosoma* que parasitam o homem, o *S. mansoni, S. haematobium e S. japonicum* e o hycanthone, obtido pela ação de *Aspergillus sclerotiorum* sobre o lucanthone. No entanto, tais fármacos por serem muito tóxicos além de outros problemas, não eram considerados seguros o suficiente para serem utilizados em larga escala nas regiões endêmicas (Bonesso-Sabadini, 1995; Cunha, 1992).

De 1960 a 1977, três fármacos para o tratamento da esquistossomose tornaram-se disponíveis: metrifonato, oxamniquina (OXQ) e praziquantel (PZQ). Após a retirada do metrifonato do mercado somente os dois últimos ficaram disponíveis para o tratamento da doença (Andrade, 1998).

A OXQ descrita em 1960 foi o fármaco de escolha no Brasil para o Programa de Controle Nacional da Esquistossomose (WHO, 1998; Utzinger *et al*., 2003). É utilizada na dosagem de 15 a 20 mg/Kg, rapidamente absorvida, possui meia-vida de 1,5 a 2 horas, seus metabólitos são inativos e exclusivamente eliminados pela urina (Ferrari *et al*., 2003; WHO, 1998). Os vermes machos adultos são considerados mais afetados pela OXQ do que as fêmeas adultas. A presença das mesmas nas veias mesentéricas (Kohn *et al.*, 1979) nada acarreta por ter seu sistema reprodutivo atrofiado, devido à regressão da glândula vitelínica, provavelmente por causa da ausência do macho (Popiel *et al*., 1984; Popiel & Erasmus, 1984). Nos últimos anos o preço da OXQ não reduziu como visto com o PZQ e, em contraste com esse mesmo fármaco, que tem atividade em todas as espécies de *Schistosoma,* a atividade da OXQ é restrita ao *S. mansoni.* E assim, devido aos efeitos colaterais, a produção da OXQ foi finalizada na Europa e EUA, o que pode acontecer também aqui no Brasil, como ocorrido com o metrifonato (WHO, 1998).

O PZQ foi descrito em 1970, sendo primeiramente testado na medicina veterinária, o qual mostrou eficácia contra vários cestódeos (Utzinger, *et al*., 2003). Esse fármaco é hoje considerado de escolha para o tratamento da esquistossomose, devido principalmente a seu preço razoável e sua atividade para todas as espécies de *Schistosoma* patogênicas aos seres

humanos (*S. mansoni, S. mekongi, S. japonicum, S. intercalatum e S. haematobium*) (Cioli *et al*., 2004; Geerts & Gryseels, 2000; WHO, 1998). Uma única dose oral de 40mg/Kg é geralmente suficiente para curar entre 70-90% e diminuir de 90-95% o número médio de ovos eliminados (Doenhoff *et al*., 2002; WHO, 1998). Essa dosagem pode ser diferenciada para pacientes hospitalizados, principalmente indivíduos infectados com *S. japonicum* e *S. mekongi,* onde se recomenda a dose de 30mg/Kg, três vezes ao dia por dois dias consecutivos (Geerts & Gryseels, 2000). O PZQ não apresenta efeitos colaterais significantes, nem reações adversas no fígado, rins ou outras funções do corpo. O mecanismo de ação sobre o parasito ainda não foi totalmente esclarecido, mas sabe-se que o primeiro efeito sobre o esquistossoma após o tratamento é a rápida contração muscular e subseqüente paralisia do verme (Coles, 1979; Mehlhorn *et al*., 1981).

Alguns estudos demonstraram uma baixa eficácia no tratamento da esquistossomose utilizando-se o PZQ. Primeiramente, por ser rapidamente absorvido pelo organismo quando administrado oralmente (cerca de 15 minutos, com picos entre 1 a 2 horas), desaparece rapidamente da circulação sangüínea (1 a 3 horas após ingestão), sendo sua eliminação quase que completa por meio das fezes e urina, ocorrendo em cerca de 24 horas (Leopold *et al*., 1978; Valencia *et al.,* 1994). Além disso, o PZQ é mais eficiente quando o parasito ainda está na fase de esquistossômulo (primeiros dois dias após penetração na pele) ou quando o verme já está na fase adulta (por volta da sexta semana após a infecção). Essa ação dependente da idade do parasito é provavelmente o motivo de muitos tratamentos fracassarem com o PZQ, porque a eficiência da terapia com este fármaco depende não só da intensidade da infecção, mas também do tempo da infecção (Picca-Mattocia & Cioli, 2004).

Resistência aos esquistossomicidas

Vários estudos clínicos e experimentais revelaram uma grande variação na resposta terapêutica de linhagens distintas de *S. mansoni,* tanto de áreas geográficas diferentes como dentro de uma mesma área. Essa variação de susceptibilidade encontrada na resposta aos fármacos indica que o *S. mansoni* possui uma larga capacidade para desenvolvimento de resistência às dosagens terapêuticas habitualmente administradas ao homem (Arena, 1997).

O desenvolvimento de *Schistosoma* sp. resistente ao tratamento foi demonstrado experimentalmente, mostrando-se que doses sub-curativas de PZQ sobre várias gerações produziam parasitos menos sensíveis ao fármaco (Fallon & Doenhoff, 1994).

Coles *et al*. (1987) consideraram que o desenvolvimento da resistência em uma população de vermes depende de fatores como: porcentagem e freqüência com que as pessoas são tratadas, dosagem do medicamento utilizado e sua eficácia e o movimento da população humana.

Vários estudos foram realizados para detectar variações na suscetibilidade a fármacos apresentados por isolados de *S. mansoni* de regiões distintas, mostrando que eles diferiam em sensibilidade aos esquistossomicidas (Bonesso-Sabadini, 1995). Coles *et al*. (1987), afirmaram que o parasito poderia se tornar resistente a um fármaco por meio de tratamentos repetidos. Provavelmente, os programas de tratamento em massa são um dos principais fatores que favorecem o aparecimento de linhagens com suscetibilidade alterada aos esquistossomicidas.

Os primeiros relatos de linhagens experimentalmente resistentes aos esquistossomicidas foram relatados por Rogers & Bueding (1971) quando após tratamento com uma dose relativamente alta de hycanthone em camundongos e hamsters infectados com *S. mansoni*, alguns vermes sobreviveram e retomaram a oviposição após um período de seis a doze meses (Bonesso-Sabadini, 1995).

No Brasil, os primeiros casos de resistência a esquistossomicidas em linhagens de *S. mansoni* foram relatados por Katz *et al*. (1973), e outros casos de resistência foram também detectados por Dias *et al*. (1978), que isolaram a linhagem MAP de *S. mansoni,* em que houve falha na cura parasitológica após tratamento de uma paciente mineira com o hycanthone e depois com a oxamniquina.

Fallon & Doenhoff (1994), induziram resistência ao PZQ e OXQ a partir de tratamentos com um dos fármacos em seis gerações consecutivas de um "pool" de linhagens previamente suscetíveis a estes medicamentos. Esses autores concluíram que a resistência obtida era fármaco-específica, pois o "pool" selecionado pelo PZQ foi resistente ao mesmo e suscetível a OXQ, não constatando resistência cruzada entre os dois fármacos.

Após o PZQ ter mostrado o seu lado benéfico, com suas doses seguras, baixos efeitos colaterais e toxicidade, hoje vem mostrando sinal de desgaste pelo aparecimento da resistência (Köhler, 2001).

Trabalhos recentes realizados no Egito, Senegal e até mesmo no Brasil vêm demonstrando que a dose usual única de 40mg/Kg do PZQ não leva ao efeito esperado fazendo-se necessário o aumento da dosagem para 60 mg/Kg ou mais, e até mesmo sua repetição (King, *et al*., 2000; Capron, 1998). Segundo Doenhoff *et al*. (2002), a resistência ao PZQ vem se expandindo no Senegal e, em trabalho realizado por ele em 1990, usando a dose de rotina para combater a infecção, as taxas de cura foram de apenas 18 a 36%, e não de 70 a 90% como era esperado.

O uso extensivo e inapropriado de altas dosagens de esquistossomicida em conjunção com outros fatores tem resultado em resistência ao fármaco, causando uma séria ameaça ao controle efetivo das infecções por *Schistosoma* (Köhler, 2001). Diante desse novo quadro de pouca eficácia dos fármacos esquistossomicidas, pesquisas estão sendo feitas na busca de novas alternativas medicamentosas para o tratamento dessa doença que aflige boa parte da população mundial.

O uso de plantas medicinais e *Phyllanthus amarus*

O entusiasmo em relação ao estudo de plantas medicinais e seus extratos vêm crescendo na assistência à saúde em função de sua fácil aceitabilidade, disponibilidade e baixo custo. Grande parte da população mundial utiliza a medicina popular para seus cuidados primários em relação à saúde, e se presume que a maior parte dessa terapia tradicional envolve o uso de extratos de plantas ou seus princípios ativos (Kaur *et al*., 2005; Varanda, 2006).

Nos Estados Unidos, por exemplo, entre os vinte principais fármacos comercializados, quatorze derivam de produtos naturais. Em Cuba, a rica flora permite vasta tradição no uso de fitoterápicos. Já na África do Sul, o uso comum e medicinal de plantas é vasto, com grande produção e obtenção de extratos, o que movimenta setores da economia. No Brasil, existe uma flora bastante diversificada em toda a sua extensão, com vegetações de diferentes características e cujos princípios ativos são desconhecidos (Reis *et al.,* 2007; Varanda, 2006).

Apesar da medicina tradicional utilizar plantas como principal fonte medicamentosa, apenas 25% dos produtos farmacêuticos prescritos são originados de substâncias encontradas em espécies da flora natural.

As plantas representam uma fonte importante de produtos naturais biologicamente ativos, muitos dos quais constituíram modelos para a síntese de um grande número de fármacos. Apesar do aumento no número de pesquisas nessa área, os dados disponíveis revelam que apenas 15 a 17% das plantas foram estudadas quanto ao potencial medicinal (Reis *et al.,* 2007; Varanda, 2006).

No Brasil, há cerca de 100.000 espécies vegetais catalogadas, mas somente 8% foram estudadas quanto a sua química, e estima-se que apenas 1.100 espécies tenham sido avaliadas quanto às suas propriedades terapêuticas (Reis *et al.,* 2007; Varanda, 2006). Diante da grande diversidade de plantas ainda não estudadas e avaliadas terapeuticamente, estas constituem uma importante fonte para a descoberta de novos fármacos (Anthony *et al*., 2005).

O aumento da disponibilidade da quimioterapia para o tratamento de infecções parasitárias, o aumento de viagens a regiões endêmicas, o tratamento profilático fez com que surgisse parasitas resistentes a atual quimioterapia. Isso fez com que fontes alternativas de tratamento fossem buscadas, como os estudos farmacológicos dos extratos de plantas.

Destacando-se a importância das plantas como novos agentes antiparasitários, pesquisou-se os efeitos de *Phyllanthus amarus L.* no tratamento da esquistossomose.

Linnaeus foi quem primeiro descreveu o genêro *Phyllanthus* em 1737, o qual pertence a família Euphorbiaceae. Esta família é muito diversa com aproximadamente 317 gêneros e 8.000 espécies, agrupadas em 49 tribos e 5 subfamílias, sendo predominantemente de áreas tropicais e subtropicais (Calixto *et al*., 1998; Jain *et al*., 2003; Torres *et al*., 2003). *Phyllanthus*, do grego *phyllon* (folha) e *anthos* (flor), em alusão às flores produzidas em ramos que se assemelham a folhas compostas, é gênero em sua maior parte paleotropical, com cerca de 200 espécies distribuídas pelas Américas, principalmente no Brasil e Caribe. Cerca de onze espécies atingem latitudes temperadas, estando ausente na Europa e na Costa Pacífica do Continente Americano (Calixto *et al*., 1998; Torres, *et al*., 2003).

Entre os poucos representantes do gênero utilizados pelo homem destaca-se a espécie conhecida no Brasil como quebra-pedra, arrebenta-pedra ou erva-pombinha,

cientificamente denominada de *P. amarus* (Torres *et al*., 2003). Essa é uma importante espécie que vem sendo utilizada para o tratamento de doenças hepáticas, urogenitais, infecções intestinais, e mostrando também recentemente efeitos bastante benéficos principalmente no tratamento contra o vírus da hepatite B (Jain *et al.,* 2003; Khatoon *et al*., 2006; Rajakannan *et al*., 2003).

Diferentes partes da planta demonstram etnobotanicamente, uma variedade de atividades terapêuticas. As folhas são diuréticas, expectorantes e estimulantes da sudorese. As sementes são carminativas, laxativas, adstringentes para o intestino, tônico para o fígado e diuréticas, além de ser usada na dor de ouvido, ascite e gripe. A raiz fresca tem sido usada no tratamento da icterícia (Khatoon *et al*., 2006).

Estudos bioquímicos, farmacológicos e clínicos têm confirmado e estendido às propriedades medicinais dessa espécie do gênero *Phyllanthus* na medicina tradicional (Santos *et al*., 2000). Pesquisas têm focado o uso em potencial da planta *P. amarus* no tratamento da hepatite B, através da supressão da replicação do vírus (Rajeshkumar *et al*., 2002; Raphael & Kuttan, 2003). Filantina e hipofilantina, que são Lignanas, presentes na *P. amarus* são descritas como agentes hepatoprotetores e protetores dos hepatócitos contra o tetracloreto de carbono (Khatoon *et al*., 2006). Extratos aquosos de *P. amarus* têm exibido uma potente ação na inibição de carcinomas hepáticos e outro efeito comprovado por pesquisas é sua atividade antibacteriana (Kloucek *et al*., 2005; Rajeshkumar & Kuttan, 2000).

Estudos descritos por Kassuya *et al*. (2005), demonstraram potencial atividade antiinflamatória do extrato hexânico e da fração química rica em Lignanas, obtidos das folhas de *P. amarus*. A atividade antiinflamatória das Lignanas foi avaliada e observou-se que a nirantina é a substância mais ativa dessa fração (Kassuya *et al*., 2006).

Na literatura pesquisada não foi encontrado nenhum relato de estudo sobre a ação da planta *P. amarus* no tratamento da esquistossomose mansônica. No entanto, foram encontrados estudos sobre a ação antiinflamatória da planta, o que fez com que a mesma fosse selecionada para o estudo, uma vez que uma das principais patologias da esquistossomose é a reação granulomatosa que é um processo inflamatório que ocorre em torno dos ovos do parasito nos órgãos lesionados.

II. OBJETIVOS

- **Objetivo Geral**

Analisar em camundongos "Swiss" SPF, infectados por *S. mansoni* da linhagem BH, a presença de atividade esquistossomicida na planta *P. amarus.*

- **Objetivos Específicos**

Avaliar a atividade dos extratos hexânico, etanólico e fração de Lignanas de *P. amarus* em diferentes concentrações, segundo os seguintes critérios:

- quantidade/ porcentagem de vermes adultos nas veias mesentéricas, porta e nas vísceras;
- proporção entre vermes machos e fêmeas;
- número de ovos eliminados para o ambiente externo e retidos no tecido intestinal;
- estudo do oograma;
- aspecto visual dos granulomas nas vísceras;
- diâmetro dos granulomas encontrados no fígado.

III. MATERIAL E MÉTODOS

III. 1. Estudos Fitoquímicos

- Obtenção do Material Vegetal

As partes aéreas de *Phyllanthus amarus*, utilizadas no estudo fitoquímico foram coletadas no Campo Experimental do CPQBA-UNICAMP em 03/04/2003.

A identificação botânica foi feita pelo Prof. Dr. Grady L. Webster (University of Califórnia Davis, USA). Sua exsicata está depositada no Herbário do Departamento de Botânica do Instituto de Biologia da UNICAMP, sob número UEC 127.411. Fotos do cultivo no CPQBA e das plantas em casa de vegetação estão apresentadas nas figuras 3 e 4.

As folhas foram secas durante quatro dias em estufa com circulador de ar aquecido a gás (40ºC), seguido de moagem em moinho de facas (MR 030) e armazenadas em sacos plásticos escuros. A etapa química deste trabalho foi realizada na Divisão de Química Orgânica e Farmacêutica do CPQBA-UNICAMP.

Figura 3: Foto de *P. amarus* cultivada no Campo Experimental do CPQBA – UNICAMP.

Figura 4: Vista das plantas na Casa de Vegetação do CPQBA.

- Preparação do Extrato Hexânico – EH

O extrato hexânico foi preparado a partir de 1000g das folhas secas e moídas com 3,0 L de hexano sob agitação mecânica por 4 horas à temperatura ambiente. Após filtração, o processo de extração acima foi repetido com 2,0 L de hexano e após filtração, o resíduo da planta foi lavado com 0,5 L do mesmo solvente. Os extratos foram agrupados e o solvente removido a vácuo em evaporador rotativo, fornecendo 55g de Extrato Hexânico - **EH**.

- Preparação do Extrato Etanólico – EE

Para a preparação do extrato etanólico foi utilizado o resíduo das folhas do processo de extração com hexano. Foi acrescido ao resíduo 2,0 L de etanol PA sob agitação mecânica por 4 horas à temperatura ambiente. Após filtração, o processo de extração acima foi repetido com 1,5 L de etanol seguido de filtração a vácuo, lavagem com 0,5 L de etanol, os extratos agrupados e o solvente removido a vácuo em evaporador rotativo, fornecendo 43,80g do Extrato Etanólico seco - **EE**.

- Fracionamento do EH por Coluna Seca

20g do **EH** foram fracionados em 5 colunas secas, utilizando como suporte uma membrana de acetato de celulose de 3cm de diâmetro e 60cm altura. As colunas foram empacotadas com sílica gel 60 Merck (0,063 – 0,200mm) até 30 cm de altura. Para cada coluna utilizou-se 4,0g do **EH.** A fase móvel utilizada foi Hexano: Acetato de etila. 70:30 (v/v), selecionada após análises do extrato por Cromatografia em Camada Delgada (CCD), utilizando-se diferentes eluentes.

Após eluição, as colunas foram cortadas em 5 partes (duas de 10cm e duas de 5cm e a papa, transferidas individualmente para frascos adequados e ressuspendidas em acetato de etila, seguido de filtração e análise por CCD. Após evaporação do solvente a vácuo em rotaevaporador, obteve-se as seguintes frações: **F1-2** (12,10g); **F3** (2,70g); **F4** (2,21g) e **F5** – Fração de Lignanas utilizada nos testes - (2,70g). As frações foram analisadas por cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massas - CG/EM.

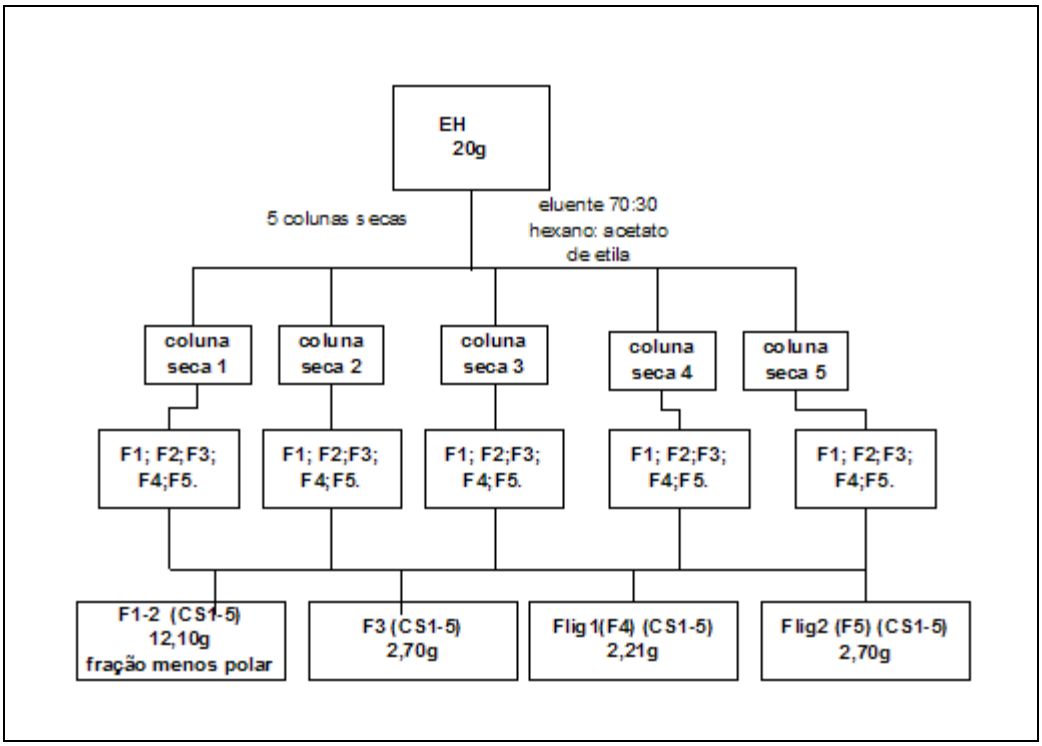


Figura 5: Frações obtidas da coluna seca do EH.

Na figura 6 estão apresentadas as estruturas das Lignanas isoladas do extrato hexânico de *P. amarus*.

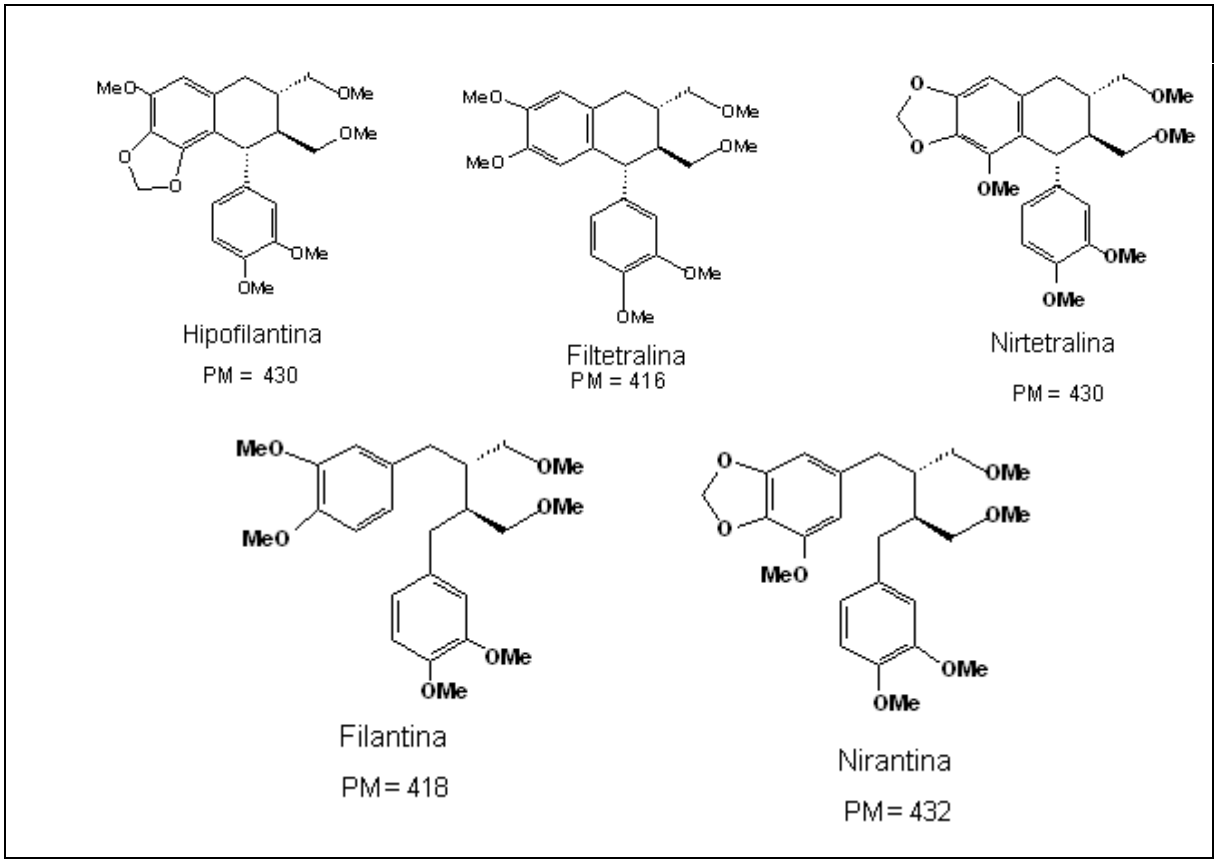


Figura 6: Lignanas isoladas de *P. amarus.*

- Análises Cromatográficas

Os extratos **EH** e **EE** e frações foram analisados por Cromatografia em Camada Delgada (CCD) e Cromatografia a Gás acoplada a Espectrometria de Massas – (CG-EM), de acordo com os métodos descritos abaixo:

- Cromatografia por Camada Delgada (CCD)

Foram utilizadas cromatoplacas de alumínio (Merck – artigo 5554), como eluente foram usados hexano: acetato de etila nas proporções: 90:10; 80:20; 70:30; 60:40 (v/v);

Diclorometano – DCM; Clorofórmio: MeOH 80:20 v/v. A detecção dos compostos foi realizada por irradiação com lâmpada Ultravioleta – UV a 254 e 366 nm, seguida de pulverização com solução de anisaldeído (ácido acético: ácido sulfúrico: anisaldeído 50,0:1,0:0,5 v/v/v) e aquecimento em estufa a 100ºC por 5 minutos.

- Cromatografia a Gás acoplada a Espectrometria de Massas (CG-EM)

Utilizou-se um Cromatógrafo a gás HP 6890N, acoplado com um detetor seletivo de massas HP5975, equipado com coluna capilar HP-5 (25m x 0,2mm x 0,33μm).

Condições de análises utilizadas - **Método *Phyllanthus:***

Temperatura Injetor: 280ºC

Detetor: 300ºC

Coluna: 150ºC (2 min), 5ºC/min 240ºC, 10ºC/min Tf=300ºC (34min)

Gás de arraste: Hélio (1,0mL/min)

Volume de injeção: 1μL (20mg/mL)

III. 2. Estudos Biológicos

III. 2. 1. Manutenção dos Hospedeiros Intermediários e Definitivos

- 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 (50L) e alimentados, diariamente, com folhas de alface frescas e ração para roedores triturada com adição de carbonato de cálcio 10%, até que atingissem o tamanho ideal para poderem ser infectados (6 a 10 mm de diâmetro).

- Infecção do Hospedeiro Intermediário

Para infecção dos hospedeiros intermediários, foram utilizados dez miracídios (linhagem BH). Para a infecção dos caramujos as fezes foram obtidas pelo método de tamisação (coletaram-se as fezes de camundongos, infectados há sessenta dias, e macerou-se com água, em seguida, essas fezes foram colocadas em um cálice de sedimentação. Após a formação do sedimento, o sobrenadante passou pelo processo de tamisação por duas vezes). O conteúdo obtido da tamisação foi retido em uma placa de Petri e exposto a luz e temperatura de aproximadamente 28°C durante uma hora, para eclosão das larvas. Os miracídios foram pipetados e colocados em um frasco de vidro, juntamente com um único exemplar de *B. glabrata*. Foram utilizados 10 miracídios por molusco.

Decorridos 35 a 40 dias de infecção, cerca de cinco moluscos foram colocados em cada recipiente, com água filtrada e declorada e submetidos ao calor e iluminação (utilizando-se uma lâmpada incandescente) por duas horas em média, para obtenção das cercárias. Após o período de exposição, os mesmos foram mantidos em aquários (Souza *et al*., 1987). Para cada ciclo de infecção foram expostos 80 moluscos para que fornecesse uma quantidade razoável de indivíduos positivos (aproximadamente 30) a fim de se obter equilíbrio entre os sexos do parasito no camundongo (Pellegrino & Katz, 1968).

As cercárias foram recolhidas em placa de Petri, separadas e colocadas em tubos de ensaio, contendo setenta cercárias cada.

- Hospedeiro Definitivo

Camundongos (*Mus musculus*) da linhagem *Swiss* – SPF fêmeas com 30 dias de idade foram 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 os extratos a ração era retirada para facilitar a administração dos mesmos.

- Infecção do Hospedeiro Definitivo

As fêmeas de camundongos "Swiss" SPF foram infectadas individualmente com 70 cercárias da linhagem BH, provenientes de moluscos *Biomphalaria glabrata,* utilizando-se a técnica de imersão da cauda do animal em suspensão cercariana, durante duas horas com exposição de luz e temperatura de aproximadamente 28º C. (Oliver & 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 cada uma. Ao final de cada infecção o conteúdo de cada tubo de ensaio referente a cada camundongo foi analisado para contar cercárias que não haviam penetrado no animal.

O protocolo deste experimento de infectividade foi submetido para a Comissão de Ética em experimentação animal/CEEA – IB – Unicamp (protocolo 1324-1), e aprovado por estar de acordo com os princípios éticos de experimentação animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

III. 2. 2. Grupos experimentais e Preparação das amostras

- Formação dos grupos experimentais e tratamento dos camundongos

Foram utilizados 240 camundongos, os quais foram divididos em dois grupos com 120 animais cada, um grupo foi tratado após 30 dias de infecção para analisar o efeito do fármaco nos parasitos jovens e o outro aos 45 dias de infecção para analisar o efeito do fármaco nos parasitos adultos. Estes grupos eram subdivididos em grupos menores de 30 camundongos, no qual dez animais formavam o grupo Controle infectado que receberam a solução Tampão Tris, dez receberam o tratamento com as concentrações 100,150 ou 250mg/Kg de extrato etanólico ou hexânico. E depois foram formados outros grupos de 30 animais para testar a fração de Lignanas nas concentrações de 50 e 100mg/Kg.

Os animais foram tratados com dose única por via oral, através de tubagem esofágica sendo administrados 0,3 mL do extrato diluído (concentração) em solução

Tampão Tris para os grupos tratados e apenas a solução Tampão Tris para o grupo Controle infectado.

A figura 7 mostra os grupos de tratamento com as respectivas concentrações utilizadas para os períodos de tratamento de 30 e 45 dias após a infecção:

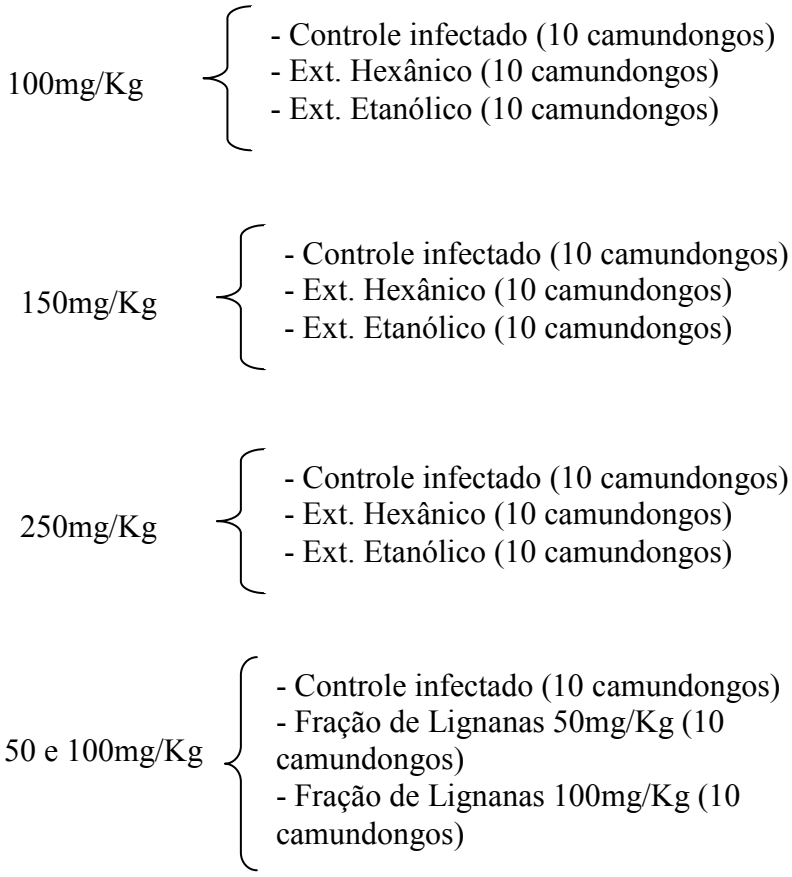


Figura 7: Esquema do cronograma das infecções. Cada grupamento corresponde a uma infecção de 30 animais e a concentração que foi administrada em cada tratamento, os quais foram realizados no 30º (para analisar o efeito do extrato nos parasitos jovens) e 45º dia (para analisar o efeito do fármaco nos parasitos adultos) de infecção.

- Preparação das amostras

As amostras foram preparadas separadamente para cada ensaio (tratamento) realizado. De acordo com a concentração (50, 100, 150 e 250mg/Kg) das amostras e o peso (20g/ camundongo) dos animais, obteve-se a quantidade de extrato que foi solubilizada em solução Tris. A quantidade de extrato utilizada para cada camundongo no tratamento de 50mg/Kg foi de 1mg de extrato/camundongo, 100mg/Kg foram 2mg de extrato/camundongo, 150mg/Kg utilizou-se 3mg/camundongo e a concentração de 250mg/Kg utilizou 5mg de extrato/camundongo, essas quantidades de extratos foram multiplicadas de acordo com o número de animais tratados. Cada animal recebeu 0,3mL da solução preparada.

III. 2. 3. Análise dos Tratamentos

- Exame de fezes

Passado 15 dias do tratamento foi realizado o exame de fezes pelo método quantitativo de Kato-Katz (Katz *et al*., 1972) para quantificar os ovos eliminados nas fezes.

- Perfusão e análise dos órgãos

Seguido o exame de fezes, os camundongos foram sacrificados por deslocamento cervical e submetidos à perfusão do sistema porta-hepático. Após a perfusão, os vermes recuperados foram coletados e colocados em placa de Petri, com NaCl 0,85%, contados e identificados, segundo o sexo.

Em seguida, foi retirada pequena porção do fígado que foi fixada em formol 10% para realização de cortes histológicos, com o intuito de observar como o extrato agiu na formação dos granulomas. O restante do fígado, o pulmão, intestino e baço foram comprimidos entre duas placas de vidro (Delgado *et al*., 1992), e posteriormente analisados na lupa para verificação da existência ou ausência de vermes nesses órgãos, verificando o deslocamento do verme da veia porta e veias mesentéricas para outros locais e realizou-se também uma avaliação visual da reação granulomatosa nos mesmos, que segue a seguinte

escala de classificação: (-) ausência de granulomas, (+) poucos granulomas, (++) quantidade intermediária de granulomas, (+++) muitos granulomas (Figuras 8 e 9).

Figura 8: Escala visual de granulomas no baço. A) granuloma (-); B) granuloma (+); C) granuloma (++); D) granuloma (+++) .

Figura 9: Escala visual de granulomas no fígado. A) granuloma (-); B) granuloma (+); C) granuloma (++); D) granuloma (+++) .

- Oograma

Um fragmento de 0,5 cm do intestino grosso foi retirado para realização do oograma, onde foram contados os ovos nos diferentes estágios de maturidade (1º a 5º estágio e ovos mortos), para saber se o extrato interferiu na oviposição (Hermeto *et al*., 1994). Para tanto eram analisados 10 campos aleatórios, no microscópio óptico com aumento de 100 vezes. A classificação dos estágios de desenvolvimento seguiu o critério proposto por Pellegrino *et al*., 1962: 1º estágio – embrião ocupa cerca de um terço do diâmetro transversal do ovo; 2º estágio – embrião com tamanho aproximadamente igual ao

diâmetro transversal do ovo; 3º estágio – embrião ocupa aproximadamente dois terços do diâmetro longitudinal do ovo; 4º estágio – embrião ocupa praticamente todo o ovo; 5º estágio ou maduro – os ovos contém um miracídio completamente desenvolvido.

- Análise Histológica

As porções do fígado retiradas e fixadas em formol 10% foram submetidas a cortes histológicos. Para isso, foram escolhidos aleatoriamente três fígados de cada tratamento e período em cada concentração. A coloração foi feita pela Hematoxilina de Ehrlich e Eosina Y 0.5% e a espessura dos cortes foi de 5 μm. Posteriormente, foi avaliado o campo de cada corte histológico, e contado cinco granulomas. Destes granulomas foi medido o tamanho do maior diâmetro com o auxílio do programa "Image Manager 50".

- Análises Estatísticas

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

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:

1) Comparação entre períodos de tratamento (30 e 45 dias após a infecção);
2) Comparação entre as diferentes concentrações para tratamentos realizados no mesmo período;
3) Comparação entre os diferentes extratos e fração e as suas respectivas concentrações, para tratamentos feitos no mesmo período.

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):

$$RRS = \frac{\text{Vermes adultos machos/vermes fêmeas no grupo tratado}}{\text{Vermes adultos machos/vermes fêmeas no grupo Controle infectado}}$$

A eficácia dos tratamentos foi avaliada pelo percentual de redução no número de vermes (RV) dos grupos tratados em relação aos grupos Controle inefctados. 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):

$$RV = \frac{\text{X de vermes do grupo Controle infectado} - \text{X do grupo Tratado}}{\text{X de vermes do grupo Controle infectado}} \times 100$$

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*

A quantidade de vermes adultos recuperados nas veias mesentéricas, veia porta e nas vísceras foi alterada de acordo com o dia de tratamento, o tipo de extrato e/ ou concentrações testados (Tabelas 1 e 2, Figura 10).

Para o grupo de camundongos tratados com extrato etanólico não houve alterações estatísticas significativas quanto ao período de tratamento (30 ou 45 dias após a infecção) para a quantidade de vermes recuperados das veias mesentéricas, veia porta e vísceras.

O grupo tratado com o extrato hexânico 100mg/Kg aos 45 dias de infecção apresentou menor número de vermes nas veias mesentéricas e porta (7,9 vermes/camundongo; p=0,0232) quando comparado ao mesmo tratamento realizado no 30° dia de infecção que apresentou 14,1 vermes/camundongo.

Para a quantidade de vermes nas vísceras o tratamento com o extrato hexânico 100mg/Kg após 30 dias de infecção foi o que apresentou melhor resultado com 3,1 vermes/camundongo (p=0, 0484) e no tratamento realizado no 45° dia de infecção apresentou 1,5 vermes.

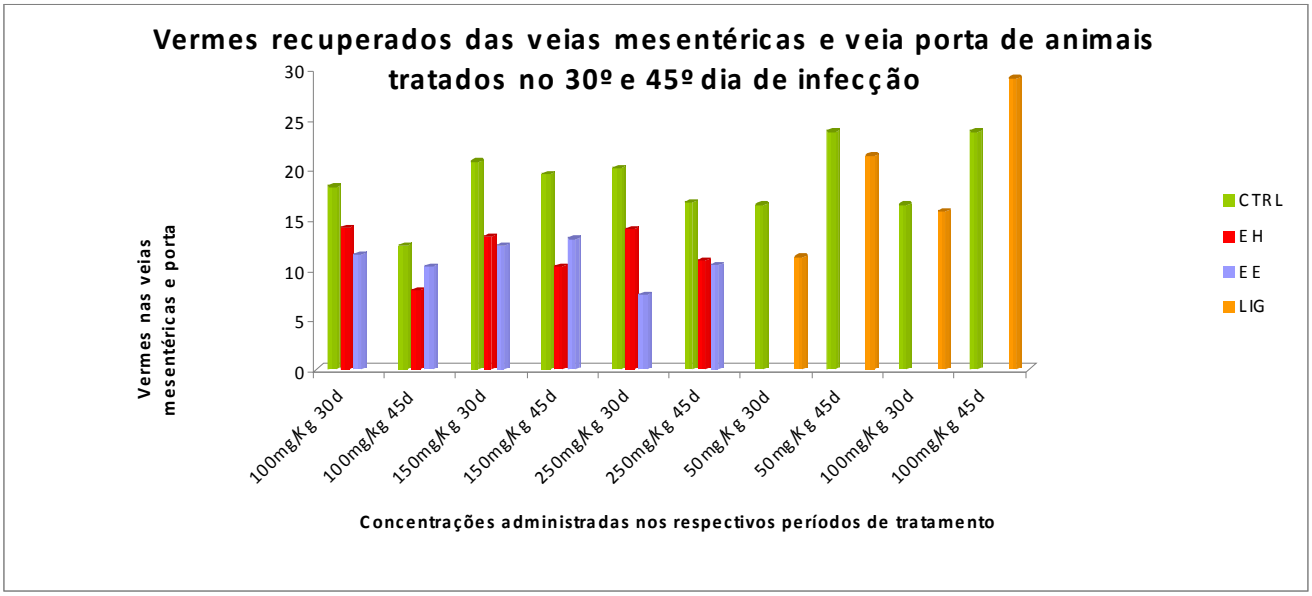
Para o grupo tratado com a fração de Lignanas houve diferença na quantidade de vermes recuperados nas veias mesentéricas e veia porta entre os dois períodos de tratamento. O tratamento realizado 30 dias após a infecção apresentou na concentração de 50mg/Kg uma média de 11,2 vermes/camundongo e média de 21,3 vermes/camundongo quando recebeu tratamento aos 45 dias de infecção (p= 0,0149). Para a concentração de 100mg/Kg a média foi de 15,7 e 29 vermes/camundongo quando tratado no 30º e 45º dia de infecção respectivamente (p< 0,0001). Já a quantidade de vermes nos órgãos analisados não apresentou diferença significativa em relação ao período de tratamento.

O tratamento com o extrato etanólico 250mg/Kg no 30° dia de infecção apresentou a menor quantidade de vermes nas veias mesentéricas e porta (7,4 vermes/camundongo; p= 0,0018), sendo este também o grupo que apresentou maior redução no número de vermes (RV= 63%) como pode ser observado na figura 11. Enquanto que o extrato hexânico na mesma concentração e período de tratamento apresentou 14 vermes/camundongo e o grupo controle 20 vermes/camundongo. Existiu ainda maior eficácia desse tratamento quando comparado com a fração de Lignanas 50 e 100mg/Kg no mesmo período de tratamento, que apresentaram 11,2 e 15,7 vermes, respectivamente.

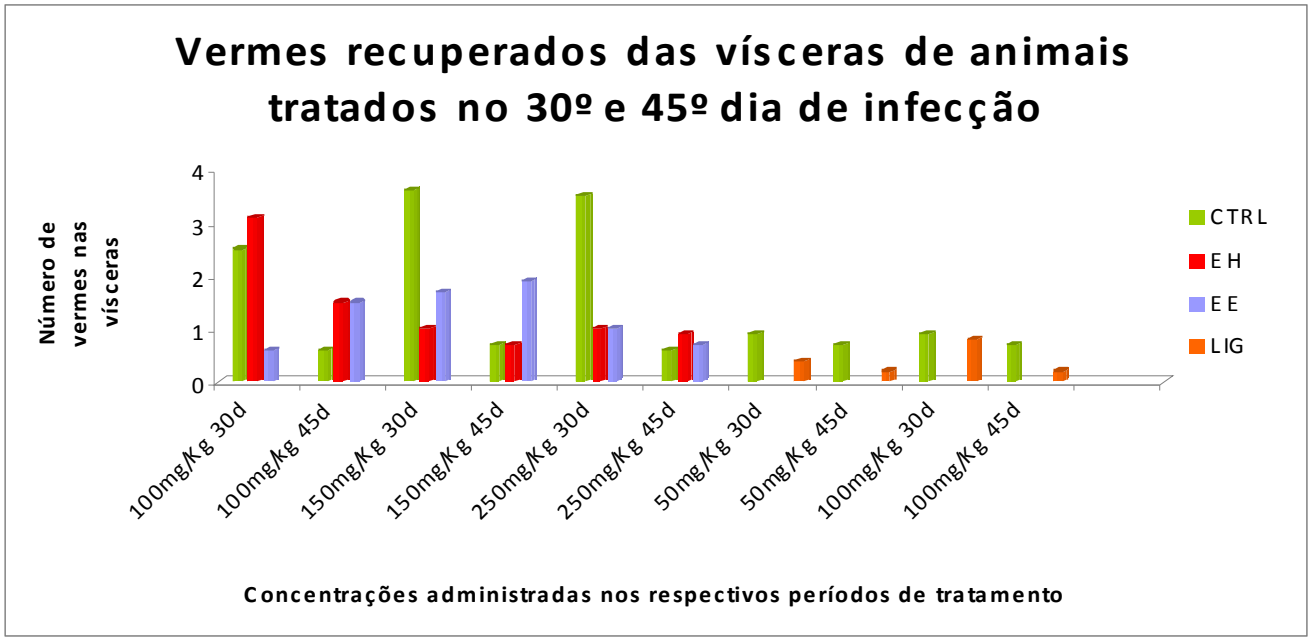
Nas vísceras, o extrato etanólico 100mg/Kg no 30° dia de infecção apresentou a menor quantidade de vermes (0,6 vermes/camundongo; p=0,0035).

Nas veias mesentéricas e porta, o extrato hexânico 100mg/Kg (7,9 vermes) apresentou diferença com os seguintes tratamentos: extrato etanólico 100mg/Kg (10,3 vermes/camundongo) e seu grupo controle (12,3 vermes) ($p<0,0001$). O extrato hexânico também apresentou menos vermes que a fração de Lignanas 50 e 100mg/Kg (21,3 e 29 vermes; $p<0,0001$). Nesse período de tratamento de 45 dias após a infecção a redução no número de vermes ficou entre 10,1 a 47,1%. (Figura 11).

Não houve diferença entre os tratamentos quanto ao número de vermes nas vísceras para os tratamentos realizados no 45° dia de infecção.

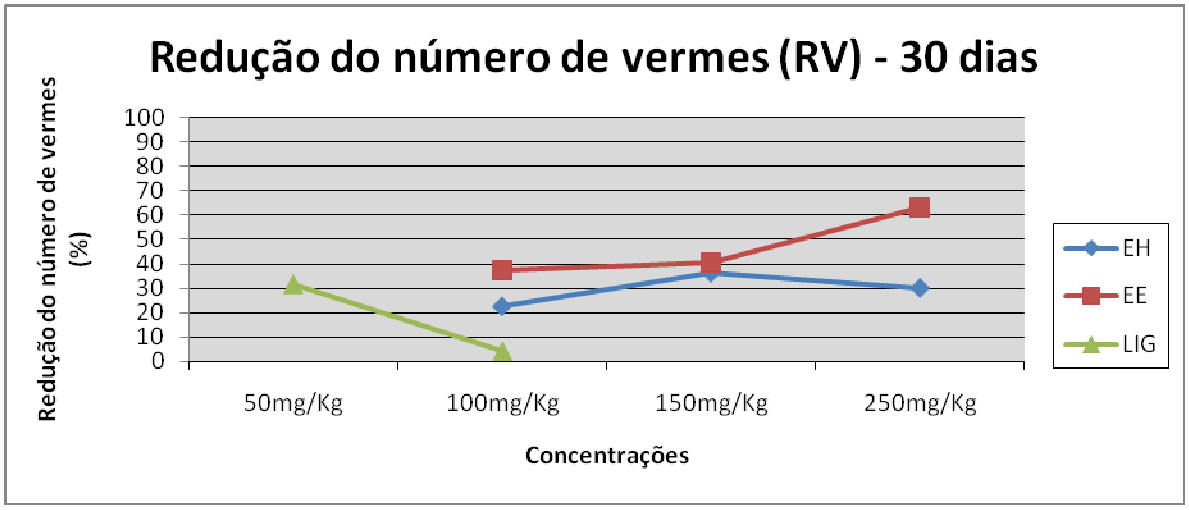


A.

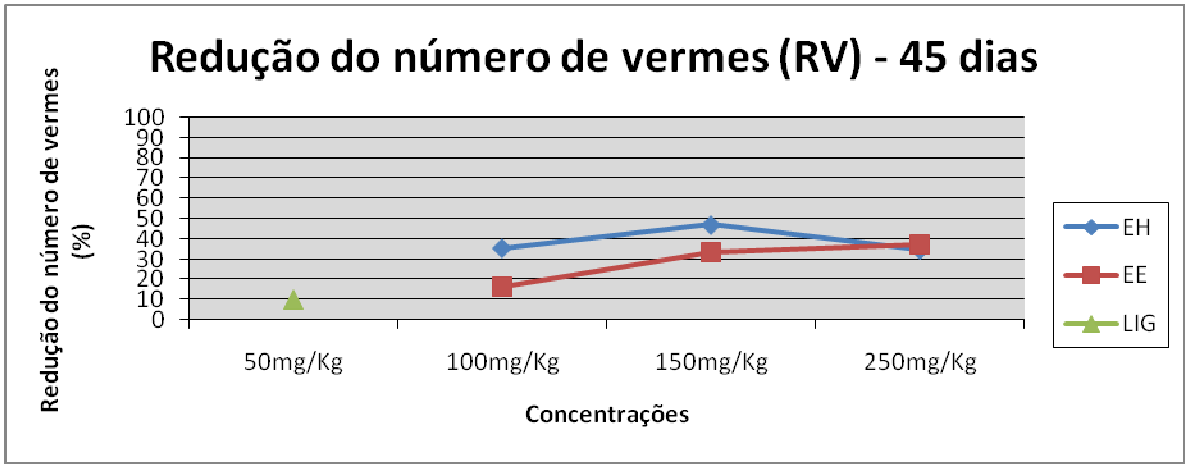


B.

Figura 10: A. Quantidade de vermes recuperados das veias mesentéricas e veia porta. **B.** Quantidade de vermes recuperados das vísceras. 30d/45d – referente ao dia de administração dos extratos. CTRL - grupo Controle infectado. EH – extrato hexânico (100, 150 e 250mg/Kg). EE – extrato etanólico (100, 150 e 250mg/Kg). Lig – Fração de Lignana (50 e 100mg/Kg).



A.



B.

Figura 11: A. Redução do número de vermes no 30° dia de infecção. **B.** Redução do número de vermes no 45° dia de infecção.

Nos grupos de camundongos tratados aos 30 dias de infecção houve um decréscimo no número de vermes fêmeas para o extrato hexânico 100mg/Kg e fração de Lignanas 100mg/Kg. As concentrações de 150 e 250mg/Kg para os dois extratos diminuíram o número de machos e para o extrato etanólico 100mg/Kg e Lignanas 50mg/Kg a redução na quantidade de vermes adultos machos e fêmeas foi proporcional.

Para o tratamento realizado no 45º dia de infecção houve uma diminuição no número de fêmeas para os grupos tratados com a fração de Lignanas (50 e 100mg/Kg), com o extrato hexânico 150mg/Kg e o extrato etanólico 100mg/Kg, já os grupos tratados com extrato etanólico 150 e 250mg/Kg e hexânico 250mg/Kg reduziram o número de machos e para o extrato hexânico 100mg/Kg a redução no número de vermes machos e fêmeas foi proporcional.

TABELA 1: Efeito das concentrações dos Extratos Hexânico, Etanólico e fração de Lignanas sobre a população de vermes adultos de *Schistosoma mansoni*. Tratamento no 30º dia de infecção.

30 dias	Quantidade de vermes recuperados									
Dose (mg/Kg)	Amostra	Veias mesentéricas e veia porta					Vísceras		RV	RRS	CP
		Casal	Macho	Fêmea	Total						
		X	X	X	X	%	X	%	X	X	X
100	CTRL	5,3	7,7	5,2	18,2	28	2,5	3,8	-	1	64,9
	EH	3,1	8,1	2,9	14,1	21,1	3,1*(b)	4,6	22,5	1,8	66,8
	EE	2,8	5,1	3,4	11,4	17,4	0,6	1	37,3	1	65,3
150	CTRL	6,9	10,3	3,5	20,7	29,7	3,6	5,2	-	1	69,6
	EH	4,8	5	3,4	13,2	19,2	1	1,4	36,2	0,5	68,8
	EE	4,3	5,4	2,6	12,3*(a)	18,1	1,7	2,5	40,5	0,7	68,1
250	CTRL	8,1	6,7	5,2	20	29,3	3,5	5,1	-	1	68,3
	EH	5,3	4,5	4,2	14	20,5	1	1,5	30	0,8	68,2
	EE	2,8	2,2	2,4	7,4*(a,b)	10,8	1	1,5	63	0,7	68,2
50	CTRL	4,8	5,9	5,7	16,4	23,8	0,9	1,3	-	1	68,8
	LIG	1,6	4,9	4,7	11,2	16,7	0,4	0,6	31,7	1	66,9
100	CTRL	4,8	5,9	5,7	16,4	23,8	0,9	1,3	-	1	68,8
	LIG	3,2	7,2	5,3	15,7	24	0,8	1,2	4,2	1,3	65,4

RV – Redução do Número de Vermes. RRS – Razão relativa ao Sexo. CP – Cercárias penetrantes. CTRL – Grupo Controle Infectado. EH – extrato hexânico. EE – extrato etanólico. LIG – fração de Lignanas. X – Média. * $p \leq 0,05$. OBS: As porcentagens de vermes recuperados nas veias mesentéricas, veia porta e nas vísceras foram calculadas de acordo com o número de CP, o qual correspondeu a 100% do número de vermes. As significâncias estatísticas (*) referem-se a: (a) diferença entre o respectivo grupo Controle; (b) diferença entre os extratos etanólico, hexânico e fração de Lignanas e suas concentrações.

TABELA 2: Efeito das concentrações dos Extratos Hexânico, Etanólico e fração de Lignanas sobre a população de vermes adultos de *Schistosoma mansoni*. Tratamento no 45º dia de infecção.

45 dias		Quantidade de vermes recuperados									
Dose (mg/Kg)	Amostra	Veias mesentéricas e veia porta					Vísceras		RV	RRS	CP
		Casal	Macho	Fêmea	Total						
		X	X	X	X	%	X	%	X	X	X
100	CTRL	5,4	3,2	3,7	12,3	18,2	0,6	0,8	-	1	67,7
	EH	3,9	1,8	2,2	7,9*(b)	12,7	1,5	2,4	35,7	1	62,2
	EE	2,8	3,5	4	10,3	15,9	1,5	2,3	16,2	1,1	64,6
150	CTRL	5,8	7,4	6,3	19,5	30,5	0,7	1,1	-	1	63,9
	EH	2,2	5,5	2,6	10,3*(a,b)	16,4	0,7	1,1	47,1	1,7	62,9
	EE	4,9	4,2	3,9	13	20,2	1,9	2,9	33,3	0,9	64,2
250	CTRL	5,2	7,6	3,8	16,6	24,3	0,6	0,9	-	1	68,4
	EH	2,7	4,5	3,6	10,8	16,1	0,9	1,3	34,9	0,6	67,2
	EE	3	4,5	2,9	10,4	15,7	0,7	1	37,3	0,8	66,1
50	CTRL	5,7	7,8	10,2	23,7	35,9	0,7	1	-	1	66
	LIG	5,6	8,8	6,9	21,3	31,1	0,2	0,3	10,1	1,8	68,4
100	CTRL	5,7	7,8	10,2	23,7	35,9	0,7	1	-	1	66
	LIG	8,9	10,2	9,9	29	44,1	0,2	0,3	-	1,5	65,7

RV – Redução do Número de Vermes. RRS – Razão relativa ao Sexo. CP – Cercárias penetrantes. CTRL – Grupo Controle Infectado. EH – extrato hexânico. EE – extrato etanólico. LIG – fração de Lignanas. X – Média. * $p \leq 0,05$. OBS: As porcentagens de vermes recuperados nas veias mesentéricas, veia porta e nas vísceras foi calculado de acordo com o número de CP, o qual correspondeu a 100% do número de vermes. As significâncias estatísticas (*) referem-se a: (a) diferença entre o respectivo grupo Controle; (b) diferença entre os extratos etanólico, hexânico e fração de Lignanas e suas concentrações.

Efeito dos tratamentos nos ovos de *Schistosoma mansoni*

Os tratamentos alteraram a quantidade de ovos por grama de fezes (OPG), reduzindo o número de ovos (Tabela 3 e Figura 12). O extrato etanólico 100mg/Kg (p=0,0104) e a fração de Lignanas 50mg/Kg (p=0,0067) para o tratamento realizado no 30º dia de infecção cessaram a postura de ovos (RO=100%). O grupo tratado nesse mesmo período com a fração de Lignanas 100mg/Kg teve 13,4 ovos/grama de fezes (p=0,0128), com uma redução do número de ovos de 94,3%. Já os tratamentos feitos no 45º dia de infecção apresentaram os seguintes resultados: EE 100mg/Kg, 122,5 ovos/grama de fezes; fração de Lignanas 50mg/Kg 120,3 ovos/grama de fezes e a fração de Lignanas 100mg/Kg 155 ovos/grama de fezes).

Os grupos tratados com o extrato hexânico 100mg/Kg, 150mg/Kg e 250mg/Kg apresentaram diferença biológica na postura de ovos em relação ao período de tratamento. Quando tratados no 30º dia de infecção os resultados obtidos foram 110, 150 e 260 ovos/grama de fezes, respectivamente. Nos tratamentos realizados no 45 º dia de infecção os resultados obtidos foram 66,6, 38,7 e 83,4 ovos/grama de fezes (p=0,0274). Nesse período, os tratamentos mais eficazes na redução do número de ovos foram o EH e EE 150mg/Kg (RO= 85,6 e 76,4%, respectivamente).

Avaliando a OPG das diferentes concentrações para o EE, no 30° dia de infecção, percebeu-se que houve uma diferença estatística entre a concentração 100mg/Kg (0 ovos/grama de fezes; p=0,0255) e as concentrações 150 e 250mg/Kg (161 e 95 ovos/grama de fezes). Já os tratamentos realizados com o EH e LIG não apresentaram diferenças entre as suas concentrações para esse mesmo período. Para os tratamentos realizados no 45° dia de infecção a concentração 150mg/Kg para os extratos EH e EE, foi a que se mostrou mais eficaz em relação às outras concentrações administradas, apresentando 38,7 e 63,7 OPG (p<0,0001) respectivamente. As LIG não apresentaram diferença entre as suas concentrações para esse período de tratamento.

TABELA 3: Efeito das concentrações dos Extratos Hexânico (EH), Etanólico (EE) e fração de Lignanas (LIG) sobre a oviposição do *Schistosoma mansoni*. Tratamentos no 30º e 45° dia de infecção.

Tratamentos	OPG (X) 30 dias	OPG (X) 45 dias	RO (%) 30 dias	RO (%) 45 dias
CTRL	463,3	258,5	-	-
EH 100mg/Kg	110	66,6*$^{*(a)}$	76,2	74,2
EE 100 mg/Kg	0$^{*(a,b)}$	122,5	100	52,6
CTRL	234	270	-	-
EH 150 mg/Kg	150	38,7*$^{*(a,b)}$	35,8	85,6
EE 150 mg/Kg	161	63,7*$^{*(a)}$	31,2	76,4
CTRL	224	202,6	-	-
EH 250 mg/Kg	260	83,4*$^{*(a)}$	-	58,8
EE 250 mg/Kg	95*$^{*(a)}$	89*$^{*(a)}$	57,6	56,1
CTRL	230	269	-	-
LIG 50 mg/Kg	0*$^{*(a,b)}$	120,3	100	55,2
LIG 100 mg/Kg	13*$^{*(a,b)}$	155	94,3	42,3

OPG – Ovos por Grama de Fezes. RO – Redução do Número de Ovos nas Fezes. (X) – Média. CTRL – Grupo Controle Infectado. EH – extrato hexânico. EE – extrato etanólico. LIG – fração de Lignanas. X – Média. * $p \leq 0,05$. As significâncias estatísticas (*) referem-se a: (a) diferença entre o respectivo grupo Controle; (b) diferença entre os extratos etanólico, hexânico e fração de Lignanas e suas concentrações.

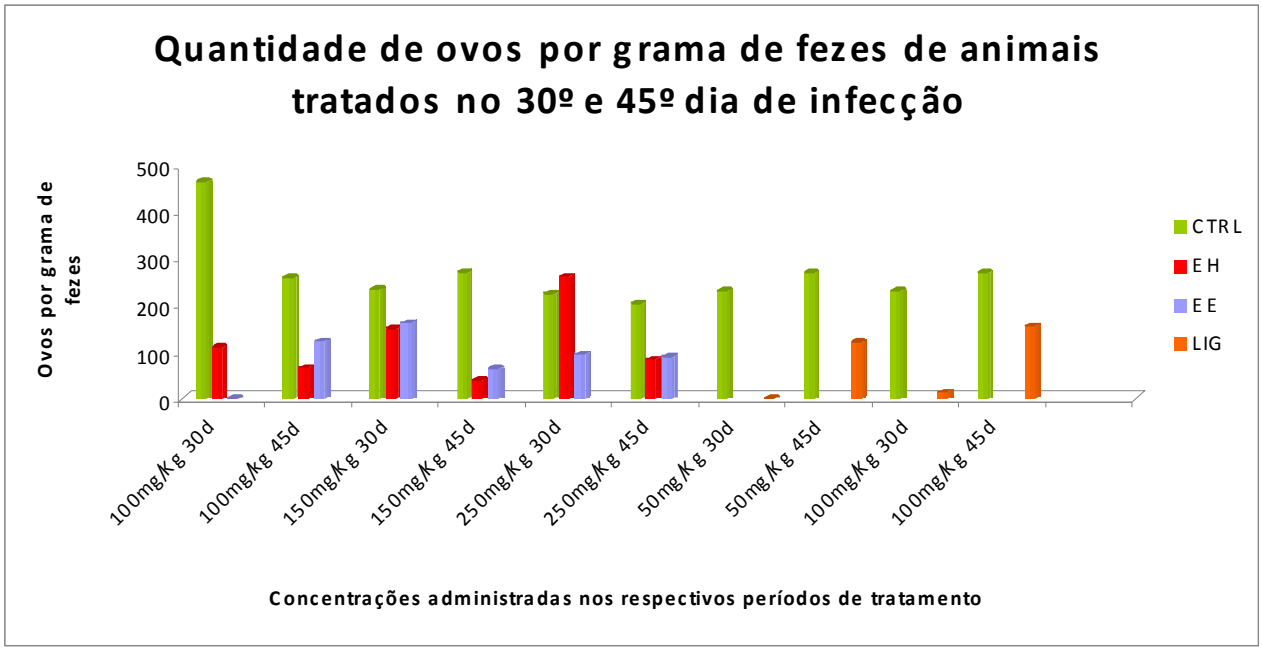


Figura 12: Quantidade de ovos por grama de fezes. 30d/45d – referente ao dia de administração dos extratos. CTRL - grupo Controle Infectado. EH – extrato hexânico (100, 150 e 250mg/Kg). EE – extrato etanólico (100, 150 e 250mg/Kg). Lig – Fração de Lignanas (50 e 100mg/Kg).

A quantidade de ovos no intestino nos diferentes estágios de desenvolvimento foi alterada. Dessa forma, o grupo tratado 30 dias após a infecção com o EE 250mg/Kg foi o que apresentou menor quantidade de ovos imaturos (12,3 ovos; $p<0,0001$) em relação aos demais tratamentos e ao seu respectivo grupo controle infectado. Para os grupos tratados 45 dias após a infecção, o que apresentou menor número de ovos imaturos foi o grupo que recebeu tratamento com EH 150mg/Kg (7,1 ovos imaturos; $p<0,0001$). Nos demais tratamentos ocorreram redução da quantidade de ovos imaturos, mas não houve diferença estatística, conforme mostra Tabela 4 e Figura 13.

Para ovos maduros os tratamentos mais eficazes foram obtidos quando realizados no 45° dia de infecção para os seguintes extratos e concentrações: EH 100mg/Kg (8,5 ovos maduros; $p=0,0375$), EH e EE 150mg/Kg (8,5 e 9,5 ovos, respectivamente; $p=0,0206$), EE 250mg/Kg (13,5ovos; $p=0,0291$) e LIG 50mg/Kg (32,3; $p<0,0001$) quando comparado com o tratamento realizado no 30° dia de infecção que tiveram respectivamente 2,1; 4,5; 4,1; 4,5 e 7,5.

Analisando a quantidade de ovos mortos houve alteração estatística em relação ao período para o grupo tratado com o extrato etanólico 250mg/Kg que apresentou 1,2 ovos

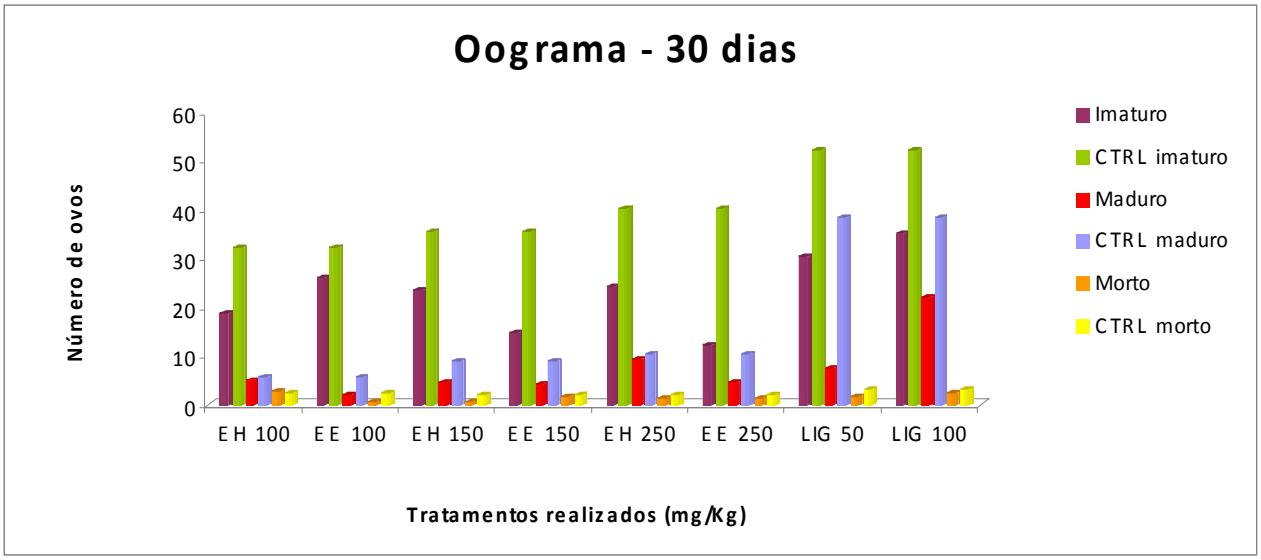
para o tratamento realizado no 30º dia de infecção (p=0,0376) e 3,7 ovos para o tratamento realizado no 45º dia de infecção.

Diante dos resultados obtidos o tratamento mais eficaz foi com o EH 150mg/Kg no 45° dia de infecção, que apresentou uma quantidade de ovos maduros (8,5 ovos) maior que de imaturos (7,1 ovos), (p<0,0280 ;p<0,0001).

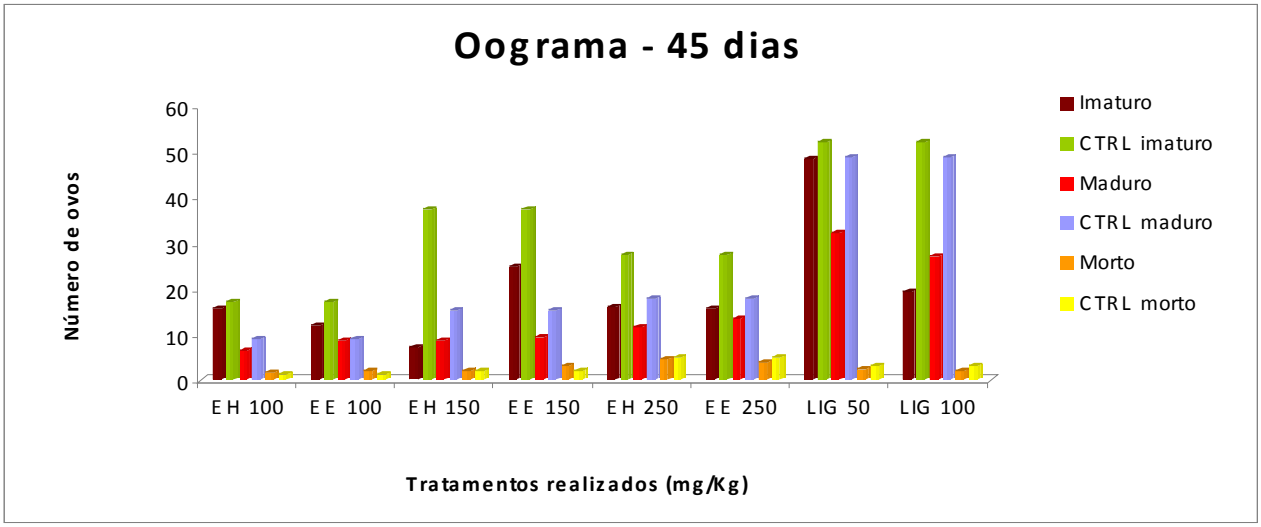
TABELA 4: Efeito das concentrações do Extrato Hexânico (EH), Extrato Etanólico (EE) e fração de Lignanas (LIG) sobre o oograma. Tratamentos no 30 º e 45º dia de infecção.

		OOGRAMA (30 dias)			OOGRAMA (45 dias)		
Concentração (mg/Kg)	Amostra	IMAT	MAD	MORTOS	IMAT	MAD	MORTOS
		X	X	X	X	X	X
100	CTRL	32,1	5,6	2,4	17	9,1	1,2
	EH	18,8	5,1	2,6	15,8	6,4	1,6
	EE	26,1	2,1	0,5	11,8	8,5	1,9
150	CTRL	35,4	8,8	2,1	37,5	15,4	2,1
	EH	23,4	4,5	0,7	7,1*(a,b)	8,5*(a)	1,9
	EE	14,8	4,1	1,6	25	9,5	3,3
250	CTRL	40,3	10,5	2	27,3	17,9	4,8
	EH	24,2	9,4	1,2	16,1	11,7	4,5
	EE	12,3*(a,b)	4,5	1,2	15,6	13,5	3,7
50	CTRL	52	38,3	3,1	52,2	48,6	3,1
	LIG	30,4	7,5	1,5	48,5	32,3	2,3
100	CTRL	52	38,3	3,1	52,2	48,6	3,1
	LIG	35,1	21,9	2,3	19,5*(a)	26,9	2,1

IMAT - Ovos Imaturos (1º a 4º estágios de desenvolvimento). MAD - Ovos maduros (5º estágio). CTRL – Grupo Controle Infectado. X – Média. *p≤0,05. As significâncias estatísticas (*) referem-se a: (a) diferença entre o respectivo grupo Controle; (b) diferença entre os extratos etanólico, hexânico e fração de Lignanas e suas concentrações.



A.



B.

Figura 13: Oograma dos grupos tratados aos: **A.** 30 dias de infecção; **B.** 45 dias de infecção. Imaturos – ovos de primeiro a quarto estágios de desenvolvimento. Maduros – ovos de quinto estágio. Morto – Ovos mortos. CTRL imaturo – Ovos imaturos no grupo Controle Infectado. CTRL maduro – ovos maduros no grupo Controle Infectado. CTRL morto - ovos mortos no grupo Controle Infectado.

Efeito dos tratamentos nos granulomas

Conforme se observa nas Figuras 8 e 9 e Tabela 5, alguns extratos e concentrações apresentaram alteração na quantidade de granulomas encontrados nos órgãos, em relação ao CTRL. Assim, os grupos tratados no 30º dia de infecção com os extratos etanólico e hexânico 100 e 250mg/Kg apresentaram menos granulomas no fígado, baço e pulmões em relação ao Controle, já o grupo tratado com a fração de Lignanas 100mg/Kg apresentou poucos granulomas em todos os órgãos analisados. Para os EE e EH 150mg/Kg e LIG 50mg/Kg ocorreu redução no número de granulomas no fígado, baço e intestino.

Em relação aos tratamentos realizados no 45º dia de infecção os grupos tratados com o extrato etanólico 100mg/Kg apresentaram menos granulomas no intestino e pulmões e a fração de Lignanas 100mg/Kg apenas nos pulmões. Os grupos que receberam tratamento com o extrato etanólico 150mg/Kg e hexânico 250mg/Kg apresentaram menor quantidade de granulomas no baço e intestino em relação ao Controle infectado, enquanto que o extrato hexânico 100 e 150mg/Kg e etanólico 250mg/Kg apresentou redução de granulomas no baço, intestino e pulmão, conforme mostra a Tabela 6.

O grupo que recebeu tratamento com LIG 50mg/Kg não apresentou alterações na quantidade de granulomas em relação ao controle infectado.

De acordo com o Teste de Comparação Múltipla de Médias de Duncan, o tamanho dos granulomas no fígado foi alterado dependendo do extrato, da dose e do período em que foi realizado o tratamento. Dessa forma, para os tratamentos realizados 30 dias após a infecção, houve diminuição do tamanho dos granulomas em relação ao grupo controle infectado para todos os tratamentos, exceto para os tratamentos realizados com os extratos hexânico e etanólico na concentração de 150mg/Kg. No tratamento feito com o extrato etanólico 100mg/Kg não houve granulomas no fígado dos grupos separados para as observações histológicas, enquanto que o extrato hexânico e a fração de Lignanas testados nessa mesma concentração apresentaram granulomas com diâmetro de 78,1µm e 116,3µm ($p<0,0001$) respectivamente, enquanto que o grupo Controle Infectado apresentou tamanho de 196,3µm. Já os grupos tratados com os extratos hexânico e etanólico na concentração de

250mg/Kg apresentaram diâmetros de 76,3µm e 177,7µm ($p<0,0002$) e o grupo tratado com a LIG 50mg/Kg apresentou granulomas com diâmetro médio de 65,1µm.

Para os tratamentos realizados no 45° dia de infecção, os grupos tratados com a concentração de 250mg/Kg apresentaram alteração no tamanho dos granulomas para os extratos etanólico (107,8µm; $p<0,0001$) e hexânico (105,1µm) em relação ao grupo controle infectado (308,3µm). Já para os tratamentos feitos com 100mg/Kg, apenas o grupo tratado com extrato etanólico (207,9µm; $p=0,0397$) apresentou alteração significativa no tamanho do granuloma. O grupo tratado com a fração de Lignanas 50mg/Kg também apresentou redução significativa dos tamanhos dos granulomas no fígado (206,9 µm: $p=0,0131$) em relação ao grupo controle infectado (308,3µm).

TABELA 5: Efeito das concentrações dos extratos hexânico, etanólico e fração de Lignanas nos granulomas dos órgãos analisados (fígado, baço, intestino e pulmões) e efeito sobre o diâmetro dos granulomas no fígado. Tratamentos realizados aos 30 dias de infecção.

Granulomas										
30 dias	Diâmetro médio (µm)				Quantidade					
Concentração (mg/Kg)	EE (X)	EH (X)	LIG (X)	CTRL (X)	Órgãos	EE	EH	CTRL	LIG	CTRL
100	0*(a,b)	78,1**(a)	116,3*(a)	296,3	Fígado	+	+	+++	+	+++
					Baço	-	+	++	-	+
					Intestino	-	-	-	-	+
					Pulmões	-	+/ -	+	-	+
150	294,8	200	NR	296,3	Fígado	+/++	+	+++	NR	NR
					Baço	+	+	++	NR	NR
					Intestino	-	-	+/-	NR	NR
					Pulmões	+	+	+	NR	NR
250	76,3*(a)	177,7*(a)	NR	296,3	Fígado	+	+/++	+++	NR	NR
					Baço	-	-	++	NR	NR
					Intestino	-	-	-	NR	NR
					Pulmões	-	-	+	NR	NR
50	NR	NR	65,1*(a,b)	296,3	Fígado	NR	NR	NR	+	+++
					Baço	NR	NR	NR	-	+
					Intestino	NR	NR	NR	-	+
					Pulmões	NR	NR	NR	+	+

(-) ausência de granulomas nos órgãos; (+) poucos granulomas nos órgãos; (++) quantidade intermediária de granulomas nos órgãos; (+++) muitos granulomas nos órgãos; (+/-) quantidades proporcionais entre + e – (Conforme pode ser visualizado nas Figuras 6 e 7). CTRL - grupo Controle Infectado. EH – extrato hexânico. EE – extrato etanólico. LIG – fração de Lignanas. NR – Não realizado. X – Média. *p≤0,05. As significâncias estatísticas (*) referem-se a: (a) diferença entre o respectivo grupo Controle; (b) diferença entre os extratos etanólico, hexânico e fração de Lignanas e suas concentrações.

TABELA 6: Efeito das concentrações dos extratos hexânico, etanólico e fração de Lignanas nos granulomas dos órgãos analisados (fígado, baço, intestino e pulmão) e efeito sobre o diâmetro dos granulomas no fígado. Tratamentos realizados aos 45 dias de infecção.

Granulomas										
45 dias	Diâmetro médio (μm)				Granulomas					
Concentração (mg/Kg)	EE (X)	EH (X)	LIG (X)	CTRL (X)	Órgãos	EE	EH	CTRL	LIG	CTRL
100	207,9*(a)	243,4	240,2	308,3	Fígado	+++	+++	+++	+++	+++
					Baço	++	+	++	++	++
					Intestino	-	-	+	+	+/-
					Pulmão	+	+/-	++	+	++
150	259,9	205,1*(a)	NR	308,3	Fígado	+++	+++	+++	NR	NR
					Baço	+	+	++	NR	NR
					Intestino	+	+	++	NR	NR
					Pulmão	+	-	+	NR	NR
250	107,8*(a,b)	105,1*(a,b)	NR	308,3	Fígado	+++	+++	+++	NR	NR
					Baço	+	+	+++	NR	NR
					Intestino	-	-	++	NR	NR
					Pulmão	-	+	+	NR	NR
50	NR	NR	206,9*(a)	308,3	Fígado	NR	NR	NR	+++	+++
					Baço	NR	NR	NR	++	++
					Intestino	NR	NR	NR	+	+/-
					Pulmão	NR	NR	NR	+/++	++

(-) ausência de granulomas nos órgãos; (+) poucos granulomas nos órgãos; (++) quantidade intermediária de granulomas nos órgãos; (+++) muitos granulomas nos órgãos; (+/-) quantidades proporcionais entre + e - (Conforme pode ser visualizado nas Figuras 6 e 7). CTRL - grupo Controle Infectado. EH – extrato hexânico. EE – extrato etanólico. LIG – fração de Lignanas. NR – Não realizado. X – Média. *$p \leq 0,05$. As significâncias estatísticas (*) referem-se a: (a) diferença entre o respectivo grupo Controle; (b) diferença entre os extratos etanólico, hexânico e fração de Lignanas e suas concentrações.

V. DISCUSSÃO

Desde a introdução do tártaro emético há mais de 70 anos, vários têm sido os medicamentos utilizados na quimioterapia da esquistossomose, e mais recentemente estão disponíveis para uso clínico a Oxamniquina (OXQ) e o Praziquantel (PZQ) (Cunha, 1992). A OXQ foi por muito tempo o fármaco escolhido para o tratamento no controle de endemias. A ação apenas na espécie *Schistosoma mansoni* e vários casos de resistência e de percentuais de curas muito baixos, restringiu o uso da OXQ (Batista, 2006; Bonesso-Sabadini, 1995; Cunha, 1982), deixando assim o PZQ como o fármaco de escolha no tratamento da esquistossomose, uma vez que o mesmo tem ação contra todas as espécies de *Schistosoma* e pouco efeito colateral (Picca-Mattoccia & Cioli, 2004).

A quimioterapia representa hoje o único recurso imediato para minimizar a prevalência e a incidência da esquistossomose, sendo assim, a utilização indiscriminada destes agentes quimioterápicos pode ser um risco para o desenvolvimento de tolerância e seleção de resistência do parasito frente a estes agentes (Cioli *et al.,* 1995; Liang *et al*., 2001), como já foi relatado por Katz *et al.* (1973), Campos *et al.,* (1976) e Dias *et al.* (1978) nos primeiros casos de resistência de linhagens de *S. mansoni* a esquistossomicidas no Brasil.

Falhas no tratamento da esquistossomose mansônica com o PZQ foram descritos por Cioli, 2000 e Doenhoff *et al*., 2002 e casos de resistência ao PZQ foram relatados por Cioli, 2000; Fallon & Doenhoff, 1994 e Köhler, 2001. Além desses fatos, a indisponibilidade de vacina, o surgimento de novos focos de transmissão, e o fato de que a eficácia do PZQ é dependente da idade da infecção, faz com que exista a necessidade do desenvolvimento de novos fármacos com atividade esquistossomicida, a fim de não deixar o tratamento dessa infecção dependente de apenas uma opção medicamentosa, além da necessidade de se encontrar algum fármaco que tenha ação nas fases jovens do verme, o que traria grandes benefícios as populações de áreas endêmicas (Arena, 1997; Batista, 2006; Botros *et al*., 2005; Picca-Mattoccia & Cioli, 2004). Uma alternativa que vem sendo testada por diversos autores como Mohamed *et al*. (2005), El-Lakkany *et al*. (2004), Shuhua *et al*. (2000), e Shaohong *et al*. (2006) é o uso de plantas medicinais como nova escolha para o desenvolvimento de fármacos com ação esquistossomicida.

Nesse trabalho foi feita a avaliação *in vivo* da atividade farmacológica dos extratos brutos etanólico e hexânico de *P. amarus* e da fração de Lignanas sobre *S. mansoni*, seguindo alguns critérios propostos por Pellegrino *et al*., (1962) e Pellegrino & Katz (1968) como alterações na distribuição dos vermes no sistema porta hepático, proporção entre machos e fêmeas, número de vermes recuperados nos animais tratados, número de ovos eliminados e estudo do oograma, além da observação da presença de granulomas nas vísceras, bem como os seus tamanhos. Segundo esses autores, tais critérios são fundamentais para avaliar a atividade terapêutica esquistossomicida de um novo fármaco.

Segundo Pellegrino & Katz (1968) um dos fatos que avaliam um fármaco ativo em camundongos com infecções maduras é a distribuição dos vermes no sistema portal. Normalmente, 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. Os fármacos esquistossomicidas afetam essa distribuição após a administração de uma dose efetiva, independentemente do mecanismo de ação, induzindo primariamente várias formas de danos tegumentares que resultam em um "enfraquecimento" do verme, fazendo com que ele se solte das paredes das veias mesentéricas, sendo deslocados passivamente pela corrente sangüínea até o fígado (Arena, 1997; Frezza, 2007; Pellegrino & Katz, 1968). De acordo com a natureza do medicamento este deslocamento dos vermes pode ocorrer quase que imediatamente após a administração do medicamento (PZQ), pode ser um pouco mais demorado (OXA) ou pode ocorrer lentamente como já foi verificado com o Artemether (Frezza, 2007; Pellegrino & Katz, 1968; Utzinger *et al*., 2003).

Contudo, segundo Pellegrino & Katz, 1968 o encontro de vermes no fígado, não é necessariamente uma comprovação da atividade esquistossomicida de um fármaco, já que, em alguns casos a migração dos vermes das veias mesentéricas e porta para o fígado é reversível, sendo irreversível, em caso de morte do verme, formação de reação granulomatosa e reabsorção do mesmo. Isso porque a contração induzida pelo fármaco na musculatura do verme – 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 eliminado.

Nesse trabalho foi observado que houve deslocamento dos vermes nos dois períodos de tratamento. A quantidade de vermes encontrados nas vísceras ficou entre 0 a 5,2%, tanto

para os grupos tratados, como para os grupos não tratados (Essa porcentagem ficou abaixo da obtida por Delgado *et al*., 1992 que testou *in vivo* o PZQ em *S. mansoni* linhagem BH, em tratamento realizado no quadragésimo segundo dia de infecção, chegando a uma porcentagem 60% de vermes encontrados no fígado. A porcentagem ficou dentro dos mesmos limites, 0 a 20%, quando comparado com os resultados obtidos por Frezza (2007) que testou *in vivo* o PZQ livre e o PZQ encapsulado em lipossomas nos mesmos períodos de tratamento 30 e 45 dias após a infecção).

Considerando que o encontro de vermes no fígado é um sinal de resposta à ação do fármaco, pode-se afirmar que o tratamento mais eficaz para este parâmetro foi o extrato hexânico 100mg/Kg administrado no 30° dia de infecção, apresentando 4,6% dos vermes no fígado (n=3,1). Essa fuga dos vermes para as vísceras, principalmente para o fígado pode ser visto como um indício de ação esquistossomicida desse extrato, uma vez que a primeira manifestação da ação contra esquistossomos é o deslocamento dos vermes das veias mesentéricas para o fígado ou pulmão, em decorrência do desprendimento de suas ventosas da parede do vaso, sendo arrastado pela corrente sangüínea (Cioli *et al*., 1995; Pica-Mattoccia & Cioli, 1985).

Segundo Machado e Silva *et al*. (1993) a distribuição dos vermes adultos no sistema porta hepático depende também da quantidade de vermes machos e fêmeas encontradas na infecção, havendo um maior número de vermes no fígado quando existe na infecção uma predominância de um dos sexos. E quando existe um equilíbrio numérico entre os sexos, a migração para as veias mesentéricas é mais eficiente.

Para avaliar o efeito dos extratos sobre os vermes machos e fêmeas, foi calculada a razão relativa ao sexo (RRS) dos vermes recuperados pela perfusão. Assim, foi possível observar que para os tratamentos realizados no 30° dia de infecção o extrato hexânico e a fração de Lignanas 100mg/Kg apresentaram maior quantidade de vermes machos, e no 45° dia de infecção os extratos que apresentaram maior quantidade de vermes machos foram o etanólico 100mg/Kg, hexânico 150mg/Kg e a fração de Lignanas 50 e 100mg/Kg, supondo então que nesse período de tratamento os extratos atuaram preferencialmente nas fêmeas.

A questão da ação de fármacos sobre a proporção de vermes machos e fêmeas é controversa. Segundo, Gonnert & Andrews (1977), Pellegrino *et al*., (1977) e Mehlhorn *et al*., (1981) doses subcurativas do PZQ atuam na mesma proporção em vermes machos e

fêmeas, matando-os igualmente. No entanto, Botros *et al*. (2005) e Picca-Mattoccia & Cioli (2004) relatam em seus estudos que os esquistossomos machos são mais sensíveis ao PZQ, do que as fêmeas, relacionando o fato de vermes machos em infecções bissexuais serem mais sensíveis ao PZQ que as fêmeas. Já Drescher *et al*. (1993) utilizando o PZQ 50mg/Kg durante 5 dias, não detectaram diferença na susceptibilidade entre os sexos. Delgado *et al.,* (1992) observaram pela primeira vez em seus estudos que o PZQ agiu preferencialmente em vermes fêmeas, sendo que este resultado foi mais evidente com doses mais elevadas do PZQ (250mg/Kg). El-Lakkany *et al*., (2004) e Lescano *et al*., (2004) ao testar o efeito do artemether (nas doses de 150mg/Kg; 50 e 100mg/Kg respectivamente) sobre *S. mansoni* constataram que os vermes fêmeas são mais suscetíveis à ação do artemether do que os vermes machos.

Delgado *et al.,* (1992) ainda afirmam 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 conseqüência, as lesões provocadas nos órgãos ocasionadas pelos ovos do parasito, é menor. Considerando essa afirmação, de uma maneira geral os tratamentos realizados no 45° dia de infecção mostraram que as fêmeas foram mais sensíveis ao tratamento do que os vermes machos, destacando o extrato hexânico 150mg/Kg e a fração de Lignana 50mg/Kg que apresentaram maior número de vermes machos (RRS = 1,7 e RRS = 1,8 respectivamente).

De acordo com Pellegrino & Katz (1968) outro critério de avaliação da atividade terapêutica de um fármaco testado é em relação à sua ação sobre os casais de *S. mansoni,* já que uma de suas atividades pode ser a separação dos casais. Assim, ocorre uma diminuição ou interrupção na postura dos ovos, uma vez que a separação de vermes acasalados tem como conseqüência uma rápida mudança fisiológica e bioquímica na fêmea, levando a mudanças regressivas no ovário, a completa regressão da glândula vitelínica e uma redução no tamanho (Arena, 1997).

A atividade dos extratos e da fração de Lignanas contra o *S. mansoni* foi avaliada de acordo com os dados obtidos sobre a redução do número de vermes (RV) no grupo teste em relação ao grupo controle infectado, sendo este considerado por Pellegrino & Katz (1968) um critério de fundamental importância na avaliação terapêutica de um fármaco.

De acordo com os resultados obtidos observou-se que houve uma redução no número de vermes entre 4,2 a 63% nos grupos tratados aos 30 dias de infecção e redução entre 10,1 a 47,1% para os grupos tratados aos 45 dias. Assim sendo, para este parâmetro, o melhor tratamento foi realizado no 30° dia de infecção com o extrato etanólico na concentração de 250mg/Kg que apresentou uma RV=63%. Este resultado foi superior ao obtido por Delgado *et al*., (1992) que testou a dose PZQ 250mg/Kg e obteve redução de 54 a 59%, e aos resultados obtidos por Batista (2006) que obteve redução de 24,65 a 52,64% quando testou a atividade do 3-(4-cloro-benzil)-5-(4-nitro-benzilidene)-imidazolidine-2,4-dione e testou também este mesmo composto encapsulado em lipossomas. Apesar disso, quando comparada com taxas de redução de vermes de outras linhagens, pode-se pensar que as reduções obtidas com os extratos hexânico, etanólico e fração de Lignana em ambos os períodos de tratamento foram baixas para a linhagem BH, pois Magalhães (1996), testando o PZQ com a linhagem MAP obteve RV=78,99% e Bonesso-Sabadini (1995), testando o PZQ e OXQ na linhagem Ouh obteve taxas de redução de vermes entre 45,1 e 100% com OXQ e reduções entre 86,9 a 97,6% para PZQ.

Utzinger *et al*. (2001) testando o efeito do artemeter 400mg/Kg em dose única em camundongos infectados com o *S. mansoni* (linhagem da Libéria), obteve redução no número de vermes jovens na ordem de 75-82%. Quando o tratamento foi realizado com o artemether 300mg/Kg em dois dias consecutivos a redução no número de vermes na fase de esquistossômulo, ficou entre 83-98% e quando se analisou a redução do número de vermes adultos para esse mesmo tratamento a redução de vermes foi baixa, entre 30-51%.

Se considerarmos, os resultados obtidos dos estudos realizados com a mesma linhagem BH utilizada para este trabalho, podemos dizer que houve uma redução no número de vermes. De acordo com Dias *et al*. (1988) a linhagem BH era altamente sensível a todos os fármacos testados como: hycanthone, oltipraz, OXQ, PZQ entre outros, e, portanto essa linhagem funcionaria como um bom referencial para experiências terapêuticas, além de que a linhagem BH, utilizada neste trabalho, nunca passou por pressão de fármacos (garantindo assim a fidedignidade dos resultados obtidos) não podendo assim afirmar que esta linhagem é tolerante e não houve seleção para a resistência a tratamentos terapêuticos. A resistência a fármacos pode acontecer quando o verme sofre uma pressão por tratamentos sucessivos, onde quimioterapias subcurativas para a

esquistossomose mansônica proporcionam sérias conseqüências em longo prazo, já que uma das razões do verme sobreviver ao tratamento é se mostrar menos sensível ao fármaco. Dessa forma, ocorrerá uma seleção de fenótipos tolerantes ao fármaco. Caso pacientes tratados se reinfectem e os novos vermes se acasalem com os sobreviventes, um grande número de ovos, com fatores associados à resistência ao fármaco, serão eliminados no ambiente, então quando a prática terapêutica continuar, haverá um aumento na produção de vermes tolerantes tornando, com o passar do tempo, a linhagem resistente ao fármaco (Frezza, 2007). Assim, como relata Liang *et al*. (2001) linhagens resistentes representam um problema para tratamentos feitos em massa, em que não haverá 100% de cura, pois dessa forma os vermes sobreviventes irão contribuir para manter a resistência da próxima geração.

Outro critério de avaliação terapêutica de agentes esquistossomicidas é a redução no número de ovos (RO) produzidos pelos vermes. Considerando o fato de que a administração de um agente anti-esquistossomicida provoca uma temporária ou definitiva supressão da postura de ovos, a diminuição ou completa cessação da postura de ovos nos animais tratados tem sido utilizada para avaliação de atividade terapêutica (Pellegrino & Katz, 1968).

De acordo com os tratamentos realizados, os resultados mais eficazes para a RO foram encontrados com os EE 100mg/Kg e com a LIG 50mg/Kg e 100mg/Kg administrados após 30 dias de infecção. E para os tratamentos realizados 45 dias após a infecção o resultado mais efetivo foi do extrato hexânico 150mg/Kg (85,6%). Mas, de acordo com Pellegrino *et al.* (1962) camundongos infectados com *S. mansoni*, têm o início da postura de ovos por volta do 30° dia de infecção, então os tratamentos feitos no 45° dia de infecção seriam considerados melhores, uma vez que a oviposição nesse período estaria mais acentuada. Mas, se considerarmos que a parada na postura dos ovos é um sinal de atividade terapêutica, dois dos tratamentos (EE 100mg/Kg e LIG 50mg/Kg) realizados apresentaram essa característica, mas como foi feita a eutanásia do animal para a perfusão não foi possível verificar se houve uma retomada na postura dos ovos.

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, 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 sexta e oitava semana de infecção.

Avaliando os resultados encontrados neste trabalho com os resultados obtidos por Delgado *et al*. (1992) percebemos que houve uma redução no número de ovos entre 86 a 90% em tratamento feito com PZQ 250mg/Kg, contra *S. mansoni* linhagem BH, 85 a 94% para a linhagem YT e 89 a 95% para a linhagem SM (as duas últimas de origem venezuelana) resultado esse inferior a redução de 100% encontrada nesse trabalho. Giboda & Smith (1994) obtiveram redução de 90,5% na postura de ovos quando analisaram a ação do PZQ nove dias depois do tratamento.

Segundo Kikuth & Gonnert (1948), Cançado *et al*. (1965) e Cunha & Pedrosa (1986) os agentes quimioterápicos podem ser classificados da seguinte forma de acordo com a sua eficácia: inativos (quando o fármaco não tem ação sobre os vermes, não existindo alteração no deslocamento dos vermes no sistema porta hepático, não impedindo a eliminação dos ovos e o oograma não apresenta alterações); efeito moderado ou apenas temporário (interrupção definitiva ou momentânea da eliminação dos ovos pelo parasito, porém durante a autópsia do camundongo, são encontrados vermes adultos vivos, mortos ou debilitados, isso pode ocorrer porque alguns vermes que não se deslocaram para o fígado e após o tratamento permaneceram nas veias mesentéricas, recuperando a oviposição, que evidentemente será reduzida); ação superior, ou seja, aqueles que interrompem definitivamente a eliminação dos ovos pelo verme e, durante a autópsia são encontrados principalmente vermes mortos e em estado de desintegração; e por fim aqueles que tem efeito definitivo (quando 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 que os tratamentos realizados no 30° dia de infecção com EE 100mg/Kg e a LIG 50mg/Kg, além do EH 150mg/Kg administrado no 45° dia de infecção apresentaram uma ação moderada, uma vez que interromperam momentaneamente a postura de ovos e/ou reduziram significativamente a oviposição.

Os resultados mostraram que, os efeitos do fármaco sobre a oviposição, a alteração na distribuição dos vermes, a separação dos casais de vermes e a redução na quantidade de vermes adultos são fenômenos independentes, já que os extratos e a fração de Lignanas não alteraram eficazmente a distribuição dos vermes, a separação dos casais ou reduzindo a quantidade de vermes. Mas, em se tratando da oviposição houve realmente valores bastante expressivos de redução, fato este também concluído por Delgado *et al*. (1992).

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 frequentemente de baixa sensibilidade.

De acordo com Chaves *et al.* (1979) e Cunha *et al*. (1987) que realizaram estudos comparativos de métodos coprológicos, existe uma divergência nos resultados ao comparar os métodos, existindo uma maior sensibilidade do método de Kato-Katz em relação aos demais métodos. Por essa razão para se fazer uma avaliação segura do tratamento da esquistossomose, é sempre bom dispor de dois recursos: o exame parasitológico de fezes e o oograma (Cunha, 1992).

Depois da administração de um composto ativo, mudanças progressivas no número de ovos e na contagem dos vários tipos morfológicos dos ovos viáveis nos diferentes estágios de maturação (oograma), ocorrem nos tecidos do hospedeiro (Cunha & Carvalho, 1966; Monteiro *et al*., 1968). O estudo do oograma é um método fácil, seguro e confiável de avaliar o valor terapêutico de novos compostos com atividade anti-esquistossomicidas, cuja eficácia ou ineficácia pode ser definida poucos dias após o tratamento (Cançado *et al*., 1965; Cunha & Carvalho, 1966). O método do oograma, que consiste em classificar e contar os diferentes tipos morfológicos evolutivos dos ovos de *S. mansoni* em material recolhido de uma porção do intestino, fornece critério sobre tudo qualitativo, e é o método de maior fidedignidade para avaliar a eficácia terapêutica dos agentes esquistossomicidas (Cunha, 1992; Cunha & Carvalho, 1966).

Uma vez que existe normalmente uma continuidade no processo de postura dos ovos pelas fêmeas, o primeiro resultado de um fármaco ativo é causar a interrupção da

oviposição na parede intestinal com conseqüentes alterações no processo de maturação dos ovos.

Segundo Giboda & Smith (1994), a eficácia de fármacos anti *S. mansoni*, é normalmente avaliada por critérios como a carga parasitária e a presença ou ausência de ovos nas fezes. Entretanto, é também importante conhecer a viabilidade dos ovos excretados, para assim avaliar corretamente a eficácia do fármaco (a viabilidade dos ovos, neste trabalho, foi determinada pela morfologia dos ovos na parede 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.

De acordo com os resultados obtidos, foi possível observar que os tratamentos administrados após 30 dias de infecção apresentaram diminuição na quantidade de ovos imaturos (em comparação aos respectivos grupos controles infectados e os diferentes extratos e fração de Lignanas testados). Nos tratamentos realizados 45 dias após a infecção houve uma diminuição na quantidade de ovos imaturos e maduros para o extrato hexânico 150mg/Kg e fração de Lignanas 100mg/Kg.

Camundongos infectados com *S. mansoni* iniciam a sua oviposição por volta do 30° dia de infecção, sendo necessário em média seis dias para os ovos atingirem o seu pleno desenvolvimento e se tornarem ovos maduros contendo um miracídio desenvolvido (Pellegrino *et al*., 1962). Nesta fase os ovos permanecem viáveis no intestino por um período máximo de doze dias, os quais morrem ao final deste período se não conseguirem ser eliminados pelas fezes (Cançado *et al*., 1965). 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) em relação aos ovos imaturos.

Neste trabalho, foi observado que os grupos controles infectados referentes a todas as dosagens apresentaram, na grande maioria dos oogramas, quantidades maiores de ovos imaturos que de ovos maduros, indicando que a oviposição, para este grupo, ocorreu até a época da análise. O mesmo aconteceu com os grupos tratados com os extratos hexânico, etanólico e a fração de Lignanas, exceto para o grupo tratado com o extrato hexânico 150mg/Kg após 45 dias de infecção. Portanto, os vermes que não morreram continuaram a ovipor.

Dessa maneira, o tratamento administrado com o extrato hexânico 150mg/Kg, mostrou-se mais efetivo em relação aos outros tratamentos já que houve diminuição na quantidade de ovos imaturos e a quantidade de ovos maduros foi maior. Isso mostra que a oviposição foi menor, já que os ovos nos primeiros estágios foram encontrados em menor quantidade comprovando que essa dose, quando administrada nesse período, é mais eficaz em relação às outras testadas.

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 matando-os ou ainda atuando nos órgãos reprodutores dos vermes provocando alterações na postura dos ovos, como possivelmente a interrupção da oviposição. Um fármaco é considerado ativo, se um ou mais estágios de ovos imaturos estiverem ausentes no oograma ou se diminuíram a quantidade dos mesmos após sua administração.

Conforme estudos feitos por Giboda & Smith (1994) o PZQ atua apenas nos ovos maduros, matando-os, e os imaturos continuam se desenvolvendo até serem eliminados, podendo ainda eclodir no meio ambiente. Se o tratamento não for continuado por um tempo maior ao requerido pela maturação dos ovos, os mais jovens, ou seja, os últimos a serem depositados antes da interrupção da oviposição, sobrevivem e atingem a maturidade eclodindo naturalmente.

Diante da obtenção de dois resultados (EE 100mg/Kg e LIG 50mg/Kg) de parada de eliminação de ovos nas fezes, mas com o encontro tanto de ovos imaturos quanto maduros no oograma, formulamos duas hipóteses: 1) que os ovos depositados antes da parada da postura não sofreram ação do extrato e continuaram o seu desenvolvimento, (uma vez que o tratamento foi administrado em dose única); 2) o extrato é parcialmente ativo, agindo em apenas uma parte dos vermes, havendo parasitos que sobrevivem à ação do extrato e continuam a oviposição, mas em quantidade bem reduzida.

O sucesso do tratamento das formas jovens traria ao paciente grande benefício, principalmente em relação à prevenção do processo patológico da doença, resultando na ausência da postura dos ovos e conseqüentemente, ausência de granulomas em tecidos (Arena, 1997).

Além do efeito que o fármaco exerce 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 fígado (Thompson *et al.,* 1962).

No caso da esquistossomose mansônica, ao ovo do parasita é atribuído o principal papel patogênico além de ser responsável pela disseminação da espécie. Em torno dos ovos de *S. mansoni*, não eliminados com as fezes do hospedeiro, há formação de intensa reação inflamatória (granuloma) de caráter imune. O processo granulomatoso é entendido como uma tentativa do hospedeiro para controlar a dispersão de substâncias antigênicas e restringi-las ao local da deposição, onde seriam desnaturadas e metabolizadas, ou seja, a reação em torno do ovo é inicialmente uma reação que tende a proteger o hospedeiro, impedindo que produtos tóxicos dos ovos como o antígeno hepatotóxico ômega-1, capazes de matar o hospedeiro, sejam liberados. A duração e o tamanho do granuloma seriam proporcionais à persistência do ovo na lesão e a capacidade de destruição dos antígenos por parte das células do hospedeiro (Mohda *et al*., 1998; Zanotti-Magalhães *et al.,* 1993).

O ovo logo após a postura é imaturo como foi visto anteriormente, e enquanto vivo e imaturo não causa reação tecidual, mas esta reação pode aparecer após o amadurecimento e formação do miracídio (Faria, 1999). Os granulomas formam extensas áreas de fibrose no tecido, provocando a hipertensão portal e esta por sua vez dá origem às varizes esofagianas e outras alterações que comprometem e agravam o quadro clínico.

A reversibilidade dos granulomas, depois de curada a infecção, é discutível. Segundo Morcos *et al.* (1985) a reversibilidade da reação granulomatosa e da fibrose depois do tratamento, já foi relatada, sugerindo que o tempo em que o tratamento ocorre é importante para a reversão. Esse mesmo autor conseguiu reversão das reações granulomatosas e fibroses provocadas pelo *S. mansoni* (linhagem egípcia) após o tratamento com PZQ 250mg/Kg, administrado por via oral, após oito semanas da infecção.

De acordo com resultados obtidos os órgãos mais lesados (com maior quantidade de granulomas), quando analisados na lupa foram o fígado, seguido do baço, pulmão e intestino. O grupo de camundongos tratados com o extrato etanólico 100mg/Kg, não apresentaram granulomas nos fígados separados para as análises histológicas, mostrando assim que esse tratamento protegeu o camundongo dos danos causados pelos ovos do *S.*

mansoni, sendo este resultado também evidenciado pela parada da postura dos ovos para esse mesmo 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.

Para os grupos tratados no 45° dia de infecção, onde a oviposição já está mais acentuada, houve uma redução muito significativa no tamanho dos granulomas encontrados no fígado, onde o diâmetro variou de 105,1 a 243,3µm para os grupos tratados. Esses resultados mostraram-se mais eficientes, quando comparados a outros resultados obtidos por diferentes autores em seus respectivos trabalhos.

Carvalho *et al*. (1986) utilizando-se da linhagem BH, em camundongos albinos fêmeas, encontraram granulomas medidos na décima semana de infecção, que apresentavam diâmetro médio de 313µm e quando analisaram amostras isoladas de pacientes de Belo Horizonte, nas fases aguda e crônica da doença encontraram diâmetros médios de 348µm.

Zanotti-Magalhães (1987) estudando as linhagens BH e SJ observou que os granulomas hepáticos de camundongos infectados com cercárias oriundas de moluscos mais suscetíveis eram menores – BH 360µm e SJ 310µm e sugeriu a possibilidade de um reconhecimento mais rápido dos antígenos do ovo, responsáveis pela reação granulomatosa e por sua rápida modulação.

Gomes *et al*. (1993) encontraram para a linhagem Ouh (Ourinhos, SP) em *Biomphalaria glabrata* o diâmetro médio dos granulomas de 326µm.

No período de 30 dias após a infecção, a oviposição ainda não é máxima, então esse fator aliado ao possível efeito dos extratos de *P. amarus* de inibirem ou minimizar a reação granulomatosa fez com que os resultados obtidos fossem de poucos granulomas visíveis e até de ausência desses nos cortes histológicos.

A diminuição do tamanho do granuloma seria uma forma de dessensibilização endógena, relacionada com a constante e elevada produção de antígenos do ovo. Essa modulação poderia ser benéfica para o hospedeiro, pois os tecidos seriam destruídos em

menor extensão, a formação de tecido fibroso seria menos intensa, e ainda, os antígenos seriam seqüestrados e destruídos mais rapidamente (Zanotti-Magalhães *et al*., 1993).

Após a análise dos critérios quantitativos e qualitativos, necessários para avaliar o efeito esquistossomicida dos extratos hexânico, etanólico e fração de Lignanas da planta *P. amarus,* pôde-se perceber que os resultados obtidos revelaram uma potencial atividade da planta contra o *S. mansoni*.

Outros estudos ainda são necessários para identificar as substâncias responsáveis por esta atividade e também determinar as concentrações dessas substâncias para o tratamento da esquistossomose.

VI. CONCLUSÕES

- Os tratamentos alteraram a distribuição dos vermes adultos no organismo. O tratamento que mais provocou deslocamento dos vermes para o fígado foi o extrato hexânico 100mg/Kg, administrado no 30° dia de infecção.

- Os tratamentos alteraram a proporção entre vermes machos e fêmeas. Nos tratamentos realizados no 30° dia de infecção houve uma ação maior dos extratos nos vermes machos e para os tratamentos efetuados no 45° dia de infecção os extratos atuaram preferencialmente nos vermes fêmeas.

- Os tratamentos não atuaram eficazmente na separação dos casais.

- Houve redução no número de vermes para a maior parte dos tratamentos realizados. A maior redução do número de vermes foi obtida com o tratamento efetuado com o extrato etanólico 250mg/Kg após 30 dias de infecção que apresentou uma redução de 63%.

- Os tratamentos feitos com o extrato etanólico 100mg/Kg e com a fração de Lignanas 50mg/Kg no 30° dia de infecção, conseguiram cessar a oviposição.

- O tratamento realizado com o extrato hexânico 150mg/Kg no 45° dia de infecção teve a maior taxa de redução de ovos (85,6%) desse período.

- Os oogramas mostraram-se alterados. Porém, o tratamento feito com extrato hexânico 150mg/Kg no 45° dia de infecção mostrou maior eficiência.

- O fígado, apesar de ter sido o órgão mais lesado de acordo com a escala visual, apresentou diminuição no tamanho dos granulomas encontrados em relação aos grupos controles positivos para todos os tratamentos realizados.

- Os órgãos separados para observações histológicas do tratamento feito com o extrato etanólico 100mg/Kg no 30° dia de infecção não apresentaram granulomas.

- Os resultados demonstraram que para cada parâmetro analisado houve uma variação de resultado, dependendo do extrato ou fração utilizados e da concentração. Mas, apesar dessa variação, pôde-se perceber que os resultados obtidos revelaram uma potencial atividade da planta *P. amarus* contra o *S. mansoni*.

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRADE, Z. A. The situation of hepatosplenic schistosomiasis in Brazil today**. Mem. Inst. Osw. Cruz**. 93 (1): 313-316. 1998.

ANTHONY, J. P.; FYFE, L.; SMITH, H. Plant active components – a resource for antiparasitic agents? **Trends in Parasitol.** 21 (10): 462-468. 2005.

ARENA, A. S. ***Schistosoma mansoni*: atividade de oxamniquine e praziquantel em diferentes estágios de desenvolvimento das linhagens MAP e OuH *in vivo*.** Dissertação de Mestrado. Instituto de Biologia, UNICAMP, Campinas, São Paulo, 1997.

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.

BATISTA, C. M. **Avaliação da atividade esquistossomicida do FZ4 encapsulado em lipossomas.** Dissertação de Mestrado. Departamento de Ciências Farmacêuticas, UFPE, Recife, Pernambuco, 2006.

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 – Departamento de Parasitologia, UNICAMP, Campinas, São Paulo, 1995.

BOTROS, S.; PICCA-MATTOCCIA, L.; WILLIAM, S.; El-LAKKANI, N.; CIOLI, D. Effect of praziquantel on the immature stages of *Schistosoma haematobium*. **Int. J. Parasitol.** 35: 1453-1457. 2005.

BUTTERWORTH, A.E., CAPRON, M., CORDINGLEY, J.S., DALTON, P.R., DUNNE, D.W., KARIUKI, H.C., KIMANI, G., KOECH, D., MUGAMBI, M., OUMA, J.H., PRENTICE, M.A., RICHARDSON, B.A., ARAP SIONGOK, T.K., STURROCK, R.F. e TAYLOR, D.W. Immunity after treatment of human schistosomiasis mansoni. II. Identification of resistant individuals, and analysis of their immune responses. **Trans. Rev. Soc. Trop. Med. Hyg.** 79(3): 393-408. 1985.

CALIXTO, J. B.; SANTOS, A. R. S.; CECHINEL-FILHO, V.; YUNES, R. A. A review of the Plants of the genus *Phyllanthus*: their chemistry, pharmacology, and therapeutic potencial. **Med. Res. Rev**. 18: 225-258. 1998.

CAMPOS, R.; MOREIRA, A. A. B.; SETTE Jr., H.; CHAMONE, D. A. F.; SILVA, L. C. Hycanthone resistance in a human strain of *Schistosoma mansoni*. **Trans. Rev. Soc. Trop. Med. Hyg.** 70: 261-262. 1976.

CANÇADO, J. R.; CUNHA, A. S.; CARVALHO, D. G.; CAMBRAIA, J. N. S. Evaluation of the treatment of human *Schistosoma mansoni* infection by the quantitative oogram technique. **Bull. Wld. Hlth. Org**. 33: 557-566. 1965.

CAPRON, A. Schistosomiasis: Forty Year' War on the Worm. **Parasitol. Today.** 14(10): 379-384. 1998.

CARVALHO, A. D. V.; ALVARENGA, R. J.; MELLO, A. L. Histopatologia da esquistossomose mansoni em fígado de *Mus musculus* infectado por amostras humanas das fases agudas e crônicas da periferia de Belo Horizonte. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** 19: 84-94. 1986.

CHAVES, A.; ALCANTÂRA, O. S.; CARVALHO, O. S.; SANTOS, J. S. Estudo comparativo dos métodos coprológicos de Lutz, Kato-Katz e Faust modificado. **Rev. Saúde Públ**. 13: 348-352.1979.

CHIEF, P. P.; WALDMAN, E. A. Aspectos particulares do comportamento epidemiológico da Esquistossomose Mansônica no Estado de São Paulo, Brasil. **Cad. Saúde Públ.** 4 (3): 257-275. 1998.

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

CIOLI, D.; BOTROS, S. S.; WHEATCROFT-FRANCKLOW, K.; MBAY A.; SOUTHGATE, V.; TCHUENTÉ, L.A.T.; PICA-MATTOCCIA, L.; TROIAN, A, R..; SEIF EL-DIN, S. H.; SABRA, A.N.A. Determination of ED50 values for praziquantel in praziquantel-resistant and susceptible *Schistosoma mansoni* isolates. **Int. J. Parasitol.** 34(8): 979-987. 2004.

CIOLI, D., PICCA-MATTOCCIA, L., ARCHER, S. Antischistosomal drugs: past, present …..and future? **Pharmacol. & Therapy**. 68: 35-85. 1995.

COELHO, M. V. **Esquistossomose mansoni**: O parasito – *Schistosoma mansoni.* In: Cunha, A. S. 1 edição. São Paulo: Sarvier. 411. 1970.

COLES, G. C.; BRUCE, J. I.; KINOTI, G. K.; MUTAHI, W. T.; DIAS, L. C.; ROCHA, R. S.; KATZ, N. The potential for drug resistance in schistosomiasis. **Parasitol. Today.** 3(11): 349-350. 1987.

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

COURA, J. R.; AMARAL, R. S. Epidemiological and control aspects of schistosomiasis in Brazilian endemic areas. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**. 99(1): 13-19. 2004.

CUNHA, A. S. A avaliação terapêutica da oxamniquine na esquistossomose mansoni humana pelo método do oograma por biopsia de mucosa retal. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo.** 24: 88-94. 1982.

CUNHA, A. S. Schistosomiasis mansoni – Drug Therapeutic. **Mem. Inst. Oswal. Cruz.** 87(4): 341-351. 1992.

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

CUNHA, A. S.; CARVALHO, D. G. Estudo do método do oograma quantitativo na esquistossomose mansoni. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**. 8: 113-121. 1966.

CUNHA, A. S.; PEDROSA, R. C. Double-blind therapeutical evaluation based on the quantitative oogram technique, comparing praziquantel and oxamniquine in human schistosomiasis mansoni. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo.** 28: 337-351. 1986.

DAVIS, B.H.; KRESINA, T.F. Hepatic fibrogenesis. **Clin. Lab. Med.** 16 (2): 361-375. 1996.

DELGADO, V. S.; SUÁREZ, D. P.; CESARI, I. M.; HINCAN, R. N. Experimental chemoterapy of *Schistosoma mansoni* with praziquantel and oxamniquine: differential effect of single or combined formulations of drugs on various strins on both sexes of the parasite. **Parasitol. Res.** 78: 648-654. 1992.

DIAS, L. C. S.; BRUCE, J. I.; COLES, G. C. Strain variation in the infectivity of *Schistosoma mansoni* for *Biomphalaria glabrata*. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo.** 30: 86-90. 1988.

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

DOENHOFF, M. J.; KUSEL J. R.; COLES, G. C.; CIOLI, D. Resistance of *Schistosoma mansoni* to praziquantel: is there problem? **Soc. of Trop. Med and Hyg.** 96(5): 465-469. 2002.

DRESCHER, K. M.; ROGERS, E. J.; BRUCE, J. I.; KATZ, N.; DIAS, L. C.; COLES, G. C. Response of drug resistant isolates of *Schistosoma mansoni* to antischistosomal agents**. Mem. Inst. Osw. Cruz.** 88(1): 89-95. 1993.

El- LAKKANY, N. M.; El-DIN, S. H. S.; BADAWY, A. A.; EBEID, F. A. Effect of artemether alone and in combination with grapefruit on hepatic drug-metabolising enzymes and biochemical aspects in experimental *Schistosoma mansoni*. **Int. J. Parasitol**. 34: 1405-1412. 2004.

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

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.

FARIA, J. L. Aparelho Digestivo: esquistossomose em geral. **In: Patologia Especial com Aplicações Clínicas. G**uanabara-Koogan, 2 ed., Cap. 9, 362-381. 1999.

FERRARI, M. L. A. ; COELHO, P. M. Z. ; ANTUNES, C. M. F. ; TAVARES, C. A. P. ; CUNHA, A. S. Efficacy of oxamniquine and praziquantel in the treatment of *Schistosoma mansoni* infection: a controlled trial. **Bull. World Heal. Organiz.** 81(3): 190-196. 2003.

FREZZA, T. F. **Avaliação do efeito do praziquantel associado a lipossomas em *Schistosoma mansoni in vivo*.** Dissertação de Mestrado. Instituto de Biologia – Departamento de Parasitologia, UNICAMP, Campinas, São Paulo, 2007.

GEERTS, S.; GRYSEELS, B. Anthelmintic resistance in human helmiths: a review. **Trop. Med. Int. Health**. 06(2): 915-921. 2000.

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.

GOMES, E.; DIAS, L. C. S.; TAKAKU, L.; STANGENHAUS, G. Biological and morphological characteristics *Schistosoma mansoni* from the Paranapanema Valley (Ourinhos), São Paulo, Brazil. **4 International Symposium on Schsistosomiasis e Reunião Nacional de Esquistossomose**, Rio de Janeiro, resumo n. 51. 1993.

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

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.

JAIN,N.; SHASANY, A. K.; SUNDARESAN, V.; RAJKUMAR, S.; DAROKAR, M. P.; BAGCHI, G. D.; GUPTA, A. K.; KUMAR, S.; KHANUJA, P. S. Molecular diversity in *Phyllanthus amarus* assessed through RAPD. **Cur. Science**. 85:1454-1458. 2003.

JIAGANG, G. **Schistosomiasis Control in China: Strategy of Control and Rapid Assessment of Schistosomiasis Risk by Remote Sensing (RS) and Geographic Information System (GIS).** Dissertação de Mestrado**.** 2003.

KABATEREINE, N.B., VENNERVALD, B.J., OUMA, J.H., KEMIJUMBI, J., BUTTERWORTH, A.E., DUNNE, D.W. e FULFORD, A.J. Adult resistance to schistosomiasis mansoni: age-dependence of reinfection remains constant in communities with diverse exposure patterns. **Parasitol.** 118: 101-105. 1999.

KASSUYA, C. A.; REHDER, V. L. G.; MELO, L. V.; SILVESTRE, A. A.; CALIXTO, J. B. Anti-inflammatory properties of extracts, fractions and lignans isolated from *Phyllanthus amarus*. **Planta Med**. 71(8): 721-726. 2005.

KASSUYA, C. A.; SILVESTRE, A. A.; MENEZES DE LIMA Jr., O.; REHDER, V. L. G.; CALIXTO, J. B. Antiinflammatory and antiallodynic actions of the lignan niranthin isolated from *Phyllanthus amarus* Evidence for interaction with platelet activating factor receptor. **European J. Pharm**. 546: 182-188. 2006.

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, K.; DIAS, E. P.; ARAÚJO, N.; SOUZA, C. P. Estudo de uma cepa humana de *Schistosoma mansoni* resistente a agentes esquistossomicidas. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** 7: 381-387. 1973.

KAUR, S.; MICHAEL, H.; ARORA, S.; HARKONEN, P.L.; KUMAR, S. The in vitro cytotoxic and apoptotic activity of Triphala a Indian herbal drug. **J. Ethnopharm. 97**: 15-20. 2005.

KIKUTH, W. & GONNERT, R. Experimental studies on the therapy of schsistosomiasis. **Ann. Trop. Med. Parasitol**. 42: 256-267. 1948.

KING, C. H.; MUCHIRI, E. M.; OUMA, J. H. Evidence against rapid emergence of praziquantel resistance in *Schistosoma haematobium*, Kenya. **Emerg. Inf. Diseas.** 6(6): 585-588. 2000.

KHATOON,S.; RAI,V.; RAWAT, A. K. S. R.; MEHROTA, S. Comparative pharmacognostic studies of three *Phyllanthus* species**. J Ethnopharm.** 104 (1-2): 79-86. 2006.

KLOUCEK, P.; POLESNY, Z.; SVOBODOVA, B.; VLKOVA, E.; KOKOSKA, L. Antibacterial screening of some Peruvian medicinal plants used in Callería District. **J Ethnopharm.** 99: 302-312. 2005.

KÖHLER, P. The biochemical basis of anthelmintic action and resistance. **Int. J. Parasitol.** 31: 336-345. 2001.

KOHN, A.; SERAPIAO, C. J.; KATZ, N.; DIAS, E. P. Ação do oxamniquine sobre o *Schsitosoma mansoni* em camundongos experimentalmente infectados. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**. 21: 217-227. 1979.

LESCANO, S. Z.; CHIEFF, P. P.; CANHASSIS, R. R.; BOULOS, M.; AMATO-NETO, V. Atividade antiparasitária do artemether na esquistossomose mansônica experimental. **Rev. Saúde Públ**. 38(1): 71-75. 2004.

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 schistosomoes 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.; VAUNGHAN, R. S. *In vitro* responses of praziquantel-resistant and susceptible Schistosoma mansoni to praziquantel. **Int. J. Parasitol**. 31: 1227-1235. 2001.

MACHADO E SILVA, J. R.; LIMA, M. A. D.; RODRIGUES E SILVA, R.; MALDONADO Jr., A.; PRESGRAVE, O. A. F.; REY, L. Comparative study on the localization of adult *Schistosoma mnasoni* worms in albino mice anesthetized with pentobarbital sodium, ether or chlorophorm. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**. 35(4): 323-326. 1993.

MAGALHÃES, V. C. **Estudos das características biológicas e morfológicas da Linhagem MAP de *Schistosoma mansoni***. Dissertação de Mestrado. Instituto de Biologia – Departamento de Parasitologia, UNICAMP, Campinas, São Paulo, 1996.

MAHMOUD, A. A. & WARREN, K. S. Antiinflamatory effects of tartar ermetic and niridazole: suppretion 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 electron microscopy study. **Arzneim. Forsch./Drug Res**. 31: 544-554. 1981.

MENDES, N. M.; QUEIROZ, R. O.; GRANDI, T. S. M.; ANJOS, A. M. G.; OLIVEIRA, A.D.; ZANI, C. L. Screening of *Asteraceae* (Compositae) Plant Extracts for Molluscicidal Activity. **Mem. Inst. Osw. Cruz.** 94 (3): 411-412. 1999.

MOHAMED, A. M.; METWALLY, N. M.; MAHMOUD, S. S. *SATIVA* seeds against *Schistosoma mansoni* different stages. **Mem. Inst. Osw. Cruz.** 100(2): 205-211. 2005.

MOHDA, 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.

MONTEIRO, W.; PELLEGRINO, J.; SILVA, M. L. H. Unusual oogram pattern in mice after niridazole treatment. **J. Parasitol**. 54: 175-176. 1968.

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.

MOTT, K. Schistosomiasis. **Global Epidem. Inf. Diseas.** 12: 351-356. 1992.

OLDS, G. R.; DASARATHY, S. Schistosomiasis. **Cur. Treat. Options Inf. Diseas.** 2: 88-99. 2000.

OLIVER, L.; STIREWALT, M. A. An efficient method for exposure of mice to cercária of *Schistosoma mansoni*. **J. Parasitol**. 38: 19-23. 1952.

PASSOS, A. D. C. Controle da esquistossomose. **Ministério da Saúde: Fundação Nacional de Saúde.** 1-71. 1998.

PAX, R.; BENETT, J. L.; FETTERER, R. A benzodiazepine derivate and praziquantel: effects on musculature of *Schistosoma mansoni* and *Schsitosoma japonicum*. **Naunyn-Schmiedebergs 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. & KATZ, N. Experimental chemotherapy of Schistosomiasis mansoni. **Ad. In Parasitol**. 6: 233-290. 1968.

PELLEGRINO, J.; LIMA-COSTA, F. F.; CARLOS, M. A.; MELLO, R. T. experimental chemoterapy of *Schistosoma mansoni*: XIII. Activity of praziquantel, na isoquinoline-pyranzino derivate on mice, hamsters and cebus monkeys. **Z. parasitenkd**. 52:151-168. 1977.

PICA-MATTOCCIA, L.; CIOLI, D. Studies on the mode of action of oxamniquine and related schistosomicidal drugs. **Am. J. Trop. Med. Hyg**. 34: 112-118. 1985.

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

POPIEL, I. & ERASMUS, D. A. *Schistosoma mansoni*: the survival and reproductive status of mature infections in mice treated with oxamniquine. **J. Helminthol**. 56: 257-261. 1982.

POPIEL, I.; CIOLI, D. A.; ERASMUS, D. A. The morphology and reproductive status of female *Schistosoma mansoni* following separation from male worms. **Intern. J. Parasitol.** 14: 183-190. 1984.

RAJAKANNAN, V.; SRIPATHI, M. S.; SELVANAYAGAM, S.; VELMURUGAN, D.; MURTHY, D. U.; VISHWAS, M.; THYAGARAJAN, S. P.; RRAJ, S. S. S.; FUN, H. K. Phyllanthin from the plant *Phyllanthus amarus*. **Acta Crystallog. Sect.** 59: 203-205. 2003.

RAJESHKUMAR, N. V.; JOY, K.L.; KUTTAN, G.; RAMSEWAK, R. S.; NAIR, M. G.; KUTTAN, R. Antitumour and anticarcinogenic activity of *Phyllanthus amarus* extract. **J. Ethnopharmacol.** 81: 17-22. 2002.

RAJESHKUMAR, N. V., KUTTAN, R. *Phyllanthus amarus* extract administration increases the life span of rats with hepatocellular carcinoma. **J. Ethnopharm..** 73: 215-219. 2000.

RAMOS, J. A. Ações da dexametasona nas fases aguda e crônica da infecção experimental pelo *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907 em camundongos isogênicos e não isogênicos. **Dissertação de Mestrado.** Faculdade de Farmácia, UFRJ, 2004.

RAPHAEL, K. R.; KUTTAN, R. Inhibition of experimental gastric lesion and inflammation by *Phyllanthus amarus* extract. **J. Ethnopharmacol.** 87: 193-197. 2003.

REIS, M. S.; MARIOT, A.; STEENBOCK, W. Diversidade e Domesticação de Plantas Medicinais. **In: Farmacognosia da planta ao medicamento.** UFRGS editora, 6 ed., Cap. 3, 45-74. 2007.

ROGERS, H. S.; BUEDING, E. Hycanthone Resistance: Development in Schistosoma mansoni. Science. 172 (3987): 1057 – 1058. 1971.

ROSS, A.G., BARTLEY, P.B., SLEIGH, A.C., OLDS, G.R., LI, Y., WILLIAMS, G.M. e SCHMCMANUS, D.P. Schistosomiasis. **N. Engl. J. Med**. 346(16): 1212-1220. 2002.

SANTOS, A. R. S.; CAMPOS, R. O. P.; MIGUEL, O. G.; CECHINEL FILHO, V.; SIANI, A. C.; YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. Antinociceptive properties of extracts of new species of plants of the genus *Phyllanthus* (Euphorbiaceae). **J. Ethnopharm.** 72: 229-238. 2000.

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

SHAOHONG, L.; KUMAGAI, T.; QINGHUA, A.; XIAOLAN, Y.; OHMAE, H.; YABU, Y.; SIWEN, L.; LIYONG, W.; MARUYAMA, H.; OHTA, N. Evaluation of the anthelmintic effects of artesunate against experimental *Schistosoma mansoni* infection in mice using different treatment protocols. **Parasitol. Int**. 55(1): 63-68. 2006.

SHUHUA, X.; ULTIZINGER, J.; CHOLLET, J.; ENDRISS, Y.; ELIEAZER, K.; TANNER, M. Effect of artemether against *Schsistosoma haematobium* in experimentally infected hamsters. **Int. J. Parasitol**. 30: 1001-1006. 2000.

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. Osw. Cruz**. 82: 67-70. 1987.

TANABE, M. Haemostatic abnormalities in hepatosplenic schistosomiasis mansoni. **Parasitol. Int.** 52 (4): 351-359. 2003.

THOMPSON, P. E.; MEISENHELDER, J. E.; NAJARIAN, H. Laboratory studies on the join 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.

TORRES, D. S. C. ; CORDEIRO, I.; GIULIETTI, A .M. O Gênero *Phyllanthus* L. (*Euphorbiaceae)* na Chapada Diamantina, Bahia, Brasil. **Acta Botân. Brasil**. 17: 265-278. 2003.

UTZINGER, J.; KEISER, J.; SHUHUA, X.; TANNER, M.; SINGER, B. H. Combination chemotherapy of schistosomiaisis in laboratory studies an clinical trials. **Antimicrob. Agents Chemot.**. 47(5): 1487-1495. 2003.

ULTIZINGER, J.; SHUHUA, X.; N'GORAN, E. K.; BERGQUIST, R.; TANNER, M. The potential of artemether for the control of schistosomiasis. **Int. J. Parasitol**. 31: 1549-1562. 2001.

VALENÇA, P. L. F. **Esquistossomose mansoni humana: Influência da IL-10 no fenótipo celular do granuloma *in vitro*.** Tese de Doutorado. Departamento de Biologia Celular e Molecular, Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. 2000.

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.

VARANDA, E. A. Atividade mutagênica de plantas medicinais. **Rev. Ciênc. Farm. Bás. Apl.** 27(1): 1-7. 2006.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Report of the Who Informal Consultation on Schistosomiasis Control,** 1998**.**

ZANOTTI-MAGALHÃES, E. M.; MAGALHÃES, L. A.; CARVALHO, J. F. Relação entre a patogenicidade do *Schistosoma mansoni* em camundongos e a susceptibilidade do molusco vetor. II. Número de ovos nas fezes e número e tamanho dos granulomas nas vísceras. **Rev. Saúde Púb**. 27(6): 412-420. 1993.

ZANOTTI-MAGALHÃES, E. M. **Observação sobre a capacidade de infecção do molusco vetor e a patogenicidade de *Schistosoma mansoni* Sambom, 1907 no hospedeiro vertebrado.** Tese de Doutorado. Instituto de Biologia, UNICAMP, Campinas, São Paulo, 1987.

ANEXO

UNICAMP

CEEA/Unicamp

Comissão de Ética na Experimentação Animal
CEEA/Unicamp

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº **1324-1**, sobre **"Estudo da atividade dos extratos de *Phyllanthus amarus* contra o *Schistosoma mansoni* linhagem BH"**, sob a responsabilidade de **Profa. Dra. Silmara Marques Allegretti / Claudineide Nascimento Fernandes de Oliveira**, 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/Unicamp em **22 de agosto de 2007**.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº **1324-1**, entitled **"Activity evaluation of *Phyllanthus amarus* extracts against *Schistosoma mansoni* BH strain"**, 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 **august 22, 2007**.

Campinas, 22 de agosto de 2007.

Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente

Fátima Alonso
Secretária Executiva

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

Telefone: (19) 3521-6359
Telefax: (19) 3521-6356
E-mail: comisib@unicamp.br
http://www.ib.unicamp.br/institucional/ceea/index.htm

DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que o conteúdo de minha dissertação de Mestrado intitulada: Estudo da atividade de *Phyllanthus amarus L.* contra o *Schistosoma mansoni* linhagem BH

( ) não se enquadra no § 3° do Artigo 1° da Informação CCPG 01/08, referente a bioética e biossegurança.

( ) está inserido no **Projeto CIBio/IB/UNICAMP** (Protocolo n°_____), intitulado _____;

(X) tem autorização da **Comissão de Ética em Experimentação Animal/IB/UNICAMP** (Protocolo n° 1324-1);

( ) tem autorização do **Comitê de Ética para Pesquisa com Seres Humanos/FCM/UNICAMP** (Protocolo n°_____);

( ) tem autorização de comissão de bioética ou biossegurança externa à UNICAMP.
Especificar: _____

Claudinéia V F de Oliveira
Aluno:

Orientador:

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:
(X) Deferido ( ) Indeferido

Nome: Ana Maria Gonçalo Guaraldo
Função: Profa. Dra. ANA MARIA A. GUARALDO
Presidente
Comissão de Ética na Experimentação Animal
CEEA/IB - UNICAMP