



Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP
Instituto de Biologia

Luciana Franceschi Simões

**Efeito do Extrato de *Piper tuberculatum* sobre o
Schistosoma mansoni da linhagem BH**

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
Luciana Franceschi Simões
6/12/09
e aprovada pela Comissão Julgadora.

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

Orientador: Prof. Dr. Luiz Augusto Magalhães

Campinas, 2009.

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP

Si45e

Simões, Luciana Franceschi
Efeito do extrato de *Piper tuberculatum* sobre o
Schistosoma mansoni da linhagem BH / Luciana Franceschi
Simões. – Campinas, SP: [s.n.], 2009.

Orientador: Luiz Augusto Magalhães.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de
Campinas, Instituto de Biologia.

1. *Schistosoma mansoni*. 2. *Piper tuberculatum*. I.
Magalhães, Luiz Augusto. II. Universidade Estadual de
Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

(rcdt/ib)

Título em inglês: The effect of the extract of the *Piper tuberculatum* on the BH strain of *Schistosoma mansoni*.

Palavras-chave em inglês: *Schistosoma mansoni*; *Piper tuberculatum*.

Área de concentração: Parasitologia.

Titulação: Mestre em Parasitologia.

Banca examinadora: Luiz Augusto Magalhães, Marlene Tiduko Ueta, Maria Esther de Carvalho.

Data da defesa: 11/12/2009.

Programa de Pós-Graduação: Parasitologia.

Campinas, 11 de dezembro de 2009

Banca Examinadora

Profº Drº Luiz Augusto Magalhães.....*LA M, LC*
(Orientador)

Profª Drª Marlene Tiduko Ueta.....*Marlene Tiduko Ueta*

Profª Drª Maria Esther de Carvalho.....*Maria Esther de Carvalho*

Profª Drª Silmara Marques Allegretti.....

Profº Drº Horacio Manuel Santana Teles.....

*Aos meus pais
Odair e Clair pelo amor e apoio.*

Agradecimentos

Agradeço a Deus por ter me dado oportunidades e meios de aproveitá-las.

Aos meus pais Odair e Clair pela vida, amor, educação e apoio incondicional, ainda que distantes.

Ao Prof^o Dr^o Luiz Augusto Magalhães e à Prof^a Dr^a Eliana Maria Zanotti-Magalhães, meus “pais adotivos de Campinas”, pela orientação, apoio, amizade, paciência e ensinamentos profissionais e para a vida toda.

Aos meus irmãos (Leandro, Leonardo, Leonel e Rafael), às minhas cunhadas (Ro, Kathe) e sobrinhos (Danilo e Murilo), simplesmente por existirem e fazerem minha vida mais feliz.

Aos membros da banca de exame prévio Prof^a Dr^a Marlene Tiduko Ueta, Prof^a Dr^a Silmara Marques Allegretti, Prof^a Dr^a Patrícia Jacqueline Thyssen e Prof^a Dr^a Maria Esther de Carvalho pelas considerações e críticas para construção desse trabalho.

Aos amigos do Departamento de Parasitologia: Mi, Bel, Claudia, Tarta, Kika, Dani, Helen, Julia, Nádia, Carina, Sandra, Lincoln, Luiz, Tamy, Anderson, Ermelindo, Rubens, João e Ivo, pelo apoio, ensinamentos, momentos de descontração, risadas, conversas e lembranças.

Aos meus parentes de Campinas: Alê, Ju, Carina, Gigi e Gu, por ter sempre alguém da família por perto.

Aos amigos da Unicamp Gus, Paty, Kivia, Japa, Fran e ao eterno amigo Vitor, por dividirem comigo momentos tão importantes.

À Prof^a Dr^a Toshie Kawano pela coordenação do projeto “Efeito de Extratos de Planta em *Biomphalaria glabrata*, vetor da esquistossomose e em *Schistosoma mansoni*”, à FAPESP por financiar-lo, ao Prof^o Dr^o Massuo Jorge Kato por disponibilizar os extratos de plantas, ao Prof^o Dr^o José Ferreira de Carvalho e ao Prof^o Dr^o Arício Xavier Linhares pela ajuda na análise estatística dos dados.

Ao Programa de Pós-Graduação em Parasitologia e a CAPES pela bolsa de estudo concedida.

"Aprender é a única coisa de que a mente nunca se cansa, nunca tem medo e nunca se arrepende".

Leonardo da Vinci

SUMÁRIO

Resumo.....	ix
Abstract.....	xi
1. Introdução Geral.....	1
2. Capítulo único: Efeito do extrato de <i>Piper tuberculatum</i> sobre o <i>Schistosoma mansoni</i> da linhagem BH	7
2.1. Resumo:.....	8
2.2. Abstract:.....	9
2.3. Introdução:.....	10
2.4. Material e Métodos:.....	11
2.4.1. Linhagem do <i>S. mansoni</i> e sua manutenção em laboratório.....	11
2.4.2. Preparo dos extratos	11
2.4.3. Teste <i>in vitro</i> do extrato de <i>P. tuberculatum</i>	12
2.4.4. Infecção de camundongos e teste <i>in vivo</i> de <i>P. tuberculatum</i>	12
2.5. Resultados:.....	14
2.5.1. Teste <i>in vitro</i>	14
2.5.2. Teste <i>in vivo</i>	16
2.6. Discussão e Conclusões:.....	21
2.7. Referências Bibliográficas:.....	22
3. Discussão.Geral.....	24
4. Conclusões Gerais:.....	27
5. Referências Bibliográficas:.....	28

Resumo

A esquistossomose é uma doença parasitária grave e de larga distribuição geográfica, que acomete cerca de 200 milhões de pessoas no mundo e ao menos 600 milhões vivem em área de risco. No Brasil a doença é conhecida por xistosa ou barriga d'água e é causada pelo *Schistosoma mansoni*, verme que se abriga na veia porta e nas veias do plexo mesentérico do hospedeiro. Estima-se seis milhões de infectados no país e cerca de vinte milhões de pessoas vivendo em áreas de risco de infecção. Atualmente o tratamento da esquistossomose é baseado no uso de dois medicamentos: a oxamniquina e o praziquantel, sendo que apenas o último apresenta atividade sobre todas as espécies de *Schistosoma* que parasitam o homem. A busca de novos medicamentos para o tratamento dessa parasitose é relevante devido ao aparecimento de linhagens do verme tolerantes e resistentes aos fármacos disponíveis. O uso de plantas medicinais vem sendo apontado como alternativa no tratamento de parasitoses e aplicações em outras doenças. Por apresentarem fácil aceitabilidade, boa disponibilidade e baixo custo, extratos de plantas vêm sendo estudados e utilizados em experimentos para tratamento de várias moléstias. Neste trabalho avaliou-se o efeito e a ação esquistossomicida do extrato de *Piper tuberculatum* sobre o *Schistosoma mansoni* da linhagem BH. *P. tuberculatum*, também conhecida como pimenta d'árda é uma espécie representante da família Piperaceae, que vem sendo bastante estudada e apresenta propriedades antitumorais, hipotensora, fungicida e inseticida, entre outras. A avaliação do efeito do extrato da planta sobre o *S. mansoni* foi realizada em testes *in vitro* e *in vivo*. Para a diluição do extrato foi utilizado meio de cultura contendo 2% de Dimetilsulfóxido (DMSO) como diluente. O DMSO possui algumas propriedades terapêuticas, entre elas a de antiinflamatório. No teste *in vitro*, foram testadas as seguintes concentrações do extrato: 25, 50, 100, 250, 500, 750, 1000 e 2000µg/ml. No teste *in vivo*, feito em *Mus musculus* infectados, o experimento foi realizado com a dosagem de 252 mg/ml diluído em salina com 2% de DMSO. Montou-se um grupo de animais que recebeu apenas salina com 2% de DMSO e um grupo controle que não recebeu tratamento algum. O extrato de *P. tuberculatum* mostrou-se bastante eficiente no teste *in vitro*, matando todos os vermes em até 72 horas, sendo que nas

concentrações mais elevadas (1000 e 2000µg/ml) os vermes morreram em apenas 2 horas. Observou-se ainda que a mortalidade foi maior nos machos do que nas fêmeas. Nos experimentos *in vivo*, não se observou diferença significativa no número de ovos contados nas fezes antes e depois do tratamento, assim como não se observou diferença no número de granulomas hepáticos nos três grupos testados. Houve diminuição do tamanho dos granulomas hepáticos nos grupos cujos tratamentos continham DMSO, em comparação com o grupo não tratado. No tratamento com *P. tuberculatum* houve diminuição do número de ovos de 1º e 2º estágios em oogramas, o que sugere diminuição na postura de ovos por parte dos vermes.

Palavras chave: *Schistosoma mansoni*, *Piper tuberculatum*.

Abstract

Schistosomiasis is a serious parasitic disease of wide geographical distribution. It affects about 200 million people worldwide and at least 600 million live in areas at risk. In Brazil, the disease is known as “xistosa” or “barriga d’água” and is caused by *Schistosoma mansoni*, a worm that inhabits the portal vein and mesenteric plexus. An estimated six million people are infected in Brazil and around twenty million live in areas at risk of infection. Currently, schistosomiasis treatment is based on the use of two drugs: oxamniquine and praziquantel, the latter is the only that shows activity on all species of *Schistosoma* that parasite mankind. The search for new drugs to treat this parasite is relevant due to the appearance of tolerant and resistant worm strains. The use of medicinal plants has been identified as an alternative in the treatment of this parasite and in other diseases. By demonstrating easy acceptance, good availability and low costs, plant extracts have been studied and used in experiments for treatment of various diseases. This present work evaluated the antischistosomal effect and action of the *Piper tuberculatum* extract on the *Schistosoma mansoni* BH strain. *P. tuberculatum*, also known as “pimenta d’árda”, belongs to the Piperaceae family and is studied by its anti-tumoral and hypotensive properties, fungicide and insecticide, among others. The evaluation of the effect of the plant extracts on *S. mansoni* was made *in vitro* and *in vivo*. Extracts dilutions were performed with culture medium containing 2% Dimethyl sulfoxide (DMSO) as diluent. The DMSO has certain therapeutic properties, including anti-inflammatory effects. *In vitro*, plant extracts were tested in the following concentrations: 25, 50, 100, 250, 500, 750, 1000 and 2000 µg/ml. *In vivo* tests were performed in infected *Mus musculus* conducted with 252 mg/ml diluted in saline with 2% DMSO. Two control groups were performed, receiving only saline with 2% DMSO or no treatment whatsoever. *P. tuberculatum* extracts proved to be very efficient in *in vitro* tests, killing all worms within 72 hours, with the highest concentrations (1000 and 2000 µg/ml), worms were killed in just 2 hours. It was observed that the mortality was higher in males than in females. *In vivo* experiments did not demonstrate significant differences in the number of eggs counted in the faeces before and after the treatment, and there was no difference in the number of liver granulomas between the three treatments. A decrease in liver

granuloma sizes in groups treated with DMSO, compared with the untreated group, was demonstrated. In the treatment with *P. tuberculatum*, there was a decrease in the number of eggs of 1st and 2nd stages in oograms, suggesting a decrease in oviposition by part of the worms.

Keys Words: *Schistosoma mansoni*, *Piper tuberculatum*.

1. Introdução

A esquistossomose, doença causada por trematódeos do gênero *Schistosoma*, é considerada pela Organização Mundial da Saúde, em termos de extensão de áreas endêmicas e quantidade de indivíduos infectados, a segunda maior doença parasitária do mundo, atrás apenas da malária. Comum em regiões tropicais e subtropicais, essa doença tem importante papel econômico e social em mais de 70 países localizados na África, Ásia, América do Sul e algumas ilhas do Caribe. A doença atinge hoje cerca de 200 milhões de pessoas no mundo, sendo que mais de 600 milhões vivem expostas em áreas de risco de infecção (CAPRON, 1998).

No Brasil, a esquistossomose (popularmente conhecida por xistosa, doença do caramujo ou barriga d'água) é causada pelo *Schistosoma mansoni*, e acomete cerca de 6 milhões de pessoas. Estima-se ainda, que cerca de 27 milhões de pessoas vivam em áreas de risco de infecção, espalhadas em 17 dos 26 estados brasileiros e no Distrito Federal (AMARAL e PORTO, 1994). Apesar das medidas tomadas para o controle da esquistossomose mansônica no país, esta parasitose tem se espalhado pelos estados sulinos, ameaçando também os países vizinhos do cone sul americano (PARAENSE e CORRÊA, 1987). Essa expansão se deve aos movimentos migratórios de pessoas infectadas e à presença de moluscos do gênero *Biomphalaria*, vetores do *S. mansoni* nessas regiões. Associa-se ainda a esse fato, as condições precárias de saneamento básico e habitação, que dão aos novos focos características endêmicas e urbanas, concentrando-se na periferia das grandes cidades como, por exemplo, em Campinas ou mesmo no centro de pequenos municípios como Caraguatatuba, Ubatuba e Bananal, todos no Estado de São Paulo.

O ciclo biológico do *S. mansoni* é complexo e envolve dois hospedeiros, sendo o homem o principal hospedeiro vertebrado, que abriga os vermes no sistema porta-mesentérico e elimina ovos do trematódeo nas fezes. Dos ovos que contaminam as coleções de água doce, eclodem os miracídios que penetram ativamente em moluscos do gênero *Biomphalaria*. As cercárias formadas nestes moluscos constituem as formas infectantes para o hospedeiro vertebrado.

Apenas parte dos ovos depositados pelas fêmeas chega à luz intestinal e é eliminada com as fezes do hospedeiro. No intestino, os ovos aderidos ao epitélio provocam processo inflamatório como hiperplasia, ulcerações e micro abscessos. Parte dos ovos que não ultrapassa o epitélio intestinal é carregada pela corrente sanguínea até o fígado, podendo chegar a outros órgãos. A patogenia da esquistossomose se dá pela reação inflamatória, que ocorre em torno dos ovos retidos nos tecidos do hospedeiro. Apenas ovos maduros liberam antígenos que provocam a formação dos granulomas esquistossomóticos (ANDRADE, 1998; FARIA, 1999).

Melhoria nas condições de saneamento básico e tratamento dos portadores são medidas profiláticas que promovem níveis parasitológicos mais reduzidos (TELES, 2001). Outros aspectos como educação da população e participação da comunidade no combate aos focos e controle de caramujos vetores também estão sendo utilizados como profilaxia desde 1975, quando foi implantado em oito estados nordestinos, o Programa Especial de Controle da Esquistossomose (PECE). Coura e Amaral (2004) analisaram esse programa de controle realizado entre 1977 e 2002 e constataram a redução da prevalência e baixa na morbidez e na mortalidade. Esses resultados, após 25 anos, mostram o quão difícil é o controle da esquistossomose.

A terapia contra a esquistossomose teve início com o tártaro emético, um antimonial trivalente bastante tóxico (CUNHA, 1992). O efeito colateral levou à pesquisa de fármacos livres de metais e administrados por via oral (BONESSO-SABADINI, 1995). Como alternativas surgiram a lucantona (KIKUTH e GÖNNERT, 1948) e hicanthona, obtida pela ação do fungo *Aspergillus sclerotiorum* sobre a lucantona (ROSI *et al.*, 1965). Outra alternativa foi o niridazol, que atuava sobre as três espécies de *Schistosoma* que parasitam o homem: *S. mansoni*, *S. japonicum* e *S. haematobium* (LAMBERT e STAUFER, 1964). Por apresentarem efeitos colaterais graves esses três fármacos desenvolvidos não foram considerados seguros o suficiente para serem empregados em larga escala no tratamento da esquistossomose (BONESSO-SABADINI, 1995). Os passos seguintes para o tratamento da esquistossomose vieram com a Oxamniquina (RICHARDS e FOSTER, 1969) e o Praziquantel (THOMAS *et al.*, 1975).

A oxamniquina pode ser administrada para o tratamento da esquistossomose mansônica. O uso em larga escala desse esquistossomicida reduziu o desenvolvimento de formas graves da doença. A diminuição de seu uso hoje se deve aos efeitos colaterais relatados, principalmente no sistema nervoso (MACHADO, 1982) e também ao fato de já terem sido observadas linhagens humanas do parasito resistentes ao fármaco (DIAS *et al.*, 1978).

O praziquantel é eficaz contra todas as espécies de *Schistosoma* e tem sido o fármaco de escolha para substituir a oxamniquina. Linhagens do parasita resistentes ao praziquantel têm sido verificadas em experimentos com animais, tendo sido detectada na linhagem de Ourinhos (SP) (GOMES *et al.*, 1993; BONESSO-SABADINI e DIAS, 2002), e em humanos (FALLON e DOENHOFF, 1994). Observações de campo realizadas no Egito e em Senegal mostraram persistência na eliminação de ovos nas fezes de doentes tratados (CIOLI, 1998). O praziquantel age sobre os vermes adultos, logo após o contato com o fármaco, alterando o fluxo de cálcio no tegumento. Nos testes *in vitro*, em alguns segundos, é possível observar a contração na musculatura do verme (TALLIMA e EL RIDI, 2007). Brindley *et al.* (1989) e posteriormente Lima *et al.* (1994) descreveram glicoproteínas e glicolípídeos abundantes nos tubérculos e parênquima do verme adulto de *S. mansoni* após a exposição ao praziquantel e cujo reconhecimento pelos anticorpos do hospedeiro facilitou o efeito esquistossomicida do fármaco. Nos casos de resistência ao praziquantel, os danos ao parasita foram menores (DAY *et al.*, 1992; WILLIAM *et al.*, 2001). Sabe-se ainda que em hospedeiros imunocomprometidos o fármaco não é eficaz. Para MacDonald (1965) a constatação de casos residuais é determinante na preservação dos focos de esquistossomose.

Pessoas em todo o mundo utilizam a medicina popular em seus cuidados primários em relação à saúde. A maior parte dessa terapia tradicional envolve o uso de plantas ou de seus princípios ativos. Os estudos de plantas medicinais e seus extratos vêm crescendo em função da fácil aceitabilidade, da disponibilidade e do baixo custo (KAUR *et al.*, 2005; VARANDA, 2006).

As plantas representam uma fonte importante de produtos naturais biologicamente ativos, que poderiam servir de moldes para síntese de fármacos. Apesar do aumento do número de pesquisas nessa área, dados revelam que somente cerca de

17% das plantas catalogadas no mundo foram estudadas em seu potencial medicinal. Hoje apenas 25% dos produtos farmacêuticos prescritos são originados de substâncias encontradas em espécies naturais (REIS *et al.*, 2007; VARANDA, 2006).

Entre os vinte principais fármacos comercializados nos Estados Unidos nos últimos anos, quatorze eram derivados de produtos naturais. Na África do Sul, o uso frequente de plantas medicinais é responsável por movimentar um segmento importante da economia. O Brasil possui uma flora rica e bastante diversificada em toda sua extensão, pouco estudada e com princípios ativos ainda desconhecidos (REIS *et al.*, 2007; VARANDA, 2006).

Das cerca de 100.000 espécies de plantas catalogadas no Brasil, apenas 8% tiveram seus compostos químicos estudados e estima-se somente 1100 espécies estudadas quanto ao uso terapêutico (REIS *et al.*, 2007; VARANDA, 2006). Essa grande diversidade ainda desconhecida constitui importante fonte para descoberta de novos fármacos (ANTHONY *et al.*, 2005).

Testes com extratos vegetais estão sendo bem sucedidos na China, com plantas da milenar medicina chinesa (XIAO *et al.*, 2000), como a artemisinina, utilizada no tratamento da malária por *Plasmodium falciparum*, extraída das folhas de *Artemisia annua*. Testes com artemisinina já se mostraram eficazes contra o *S. japonicum*, *S. haematobium* e *S. mansoni* (XIAO *et al.*, 2000; UTZINGER *et al.*, 2001; YUANQING *et al.*, 2001; LESCANO *et al.*, 2004). Araújo *et al.* (1991) verificaram redução moderada dos vermes em *hamsters* infectados com *S. mansoni*, após o tratamento com artemether, um derivado da artemisinina. Barth *et al.* (1997) verificaram em testes *in vitro* em *S. mansoni* redução da motilidade dos vermes, inibição da postura de ovos e alta mortalidade dos parasitas quando utilizaram *goyazensolide*, um componente extraído de *Eremanthus goyazensis*, uma planta da família Asteraceae. Compostos biologicamente ativos de *Millettia thonningii*, uma leguminosa encontrada na África, mostraram ação cercaricida e esquistossomicida e ainda foi observada a diminuição da motilidade dos miracídios de *S. mansoni* (PERRETT *et al.*, 1994; LYDDIARD *et al.*, 2002). Levantamento realizado na África do Sul mostrou que pelo menos três das cerca de quarenta plantas testadas se mostraram como potenciais agentes

esquistossomicidas para o *S. haematobium*. São elas: *Berheya speciosa* (Asteraceae), *Euclea natalensis* (Ebenaceae) e *Trichilia ematica* (Meliciae) (SPARG *et al.*, 2000).

Extratos de *Phyllanthus amarus*, uma Euforbiácea, conhecida popularmente como quebra-pedra, arrebenta-pedra ou erva pombinha foi utilizada em testes *in vivo* contra o *S. mansoni* da linhagem BH em *Mus musculus* infectados (OLIVEIRA, 2008). Comumente utilizada no tratamento de doenças hepáticas e urogenitais (KHATOON *et al.*, 2006) quando empregada sobre o *S. mansoni*, *P. amarus* ocasionou redução de até 63% no número de vermes e cessou a postura de ovos evidenciando a potencial atividade esquistossomicida da planta (OLIVEIRA, 2008).

Tendo em vista a necessidade de buscar novos medicamentos para o tratamento da esquistossomose mansônica e os resultados promissores de extratos de plantas sobre o *S. mansoni*, nos propusemos a verificar o efeito do extrato de *Piper tuberculatum* sobre os vermes adultos de *S. mansoni* da linhagem BH.

P. tuberculatum, conhecida popularmente como pimenta comprida ou pimenta d'árda, é uma espécie representante das Piperaceae brasileiras, da qual fazem parte também a pariparoba e o jaborandi (JOLY, 2002). Essa família é predominantemente tropical, sendo que no Brasil há mais de 500 espécies, a maioria dividida nos gêneros *Piper* e *Peperomia*. Muitas dessas plantas são de uso medicinal, culinário e ornamental (SOUZA e LORENZI, 2005).

Espécies do gênero *Piper* têm sido amplamente utilizadas para fins curativos em diversas etnias (BEZERRA *et al.*, 2007). Dentre as atividades biológicas pesquisadas estão propriedades antitumorais (DUH *et al.*, 1990); hipotensoras (ARAUJO-JUNIOR, 1996); inseticida com baixo impacto ao meio ambiente (MIRANDA *et al.*, 2002; SCOTT *et al.*, 2002) e fungicida (NAVICKIENE *et al.*, 2000; VASQUES DA SILVA *et al.*, 2002). Araújo-Junior *et al.* (1997) relataram ainda o uso popular de extrato de *P. tuberculatum* como sedativo e “soro” antiofídico. Da espécie *P. cubebina* já se isolou uma substância (lignana cubebina) usada como antisséptico urinário. Essa lignana também ocorre em uma espécie de Rutaceae e apresenta atividade anti *Trypanosoma cruzi* (MESQUITA *et al.*, 2005). Navickiene *et al.* (2006) relataram o uso das espécies de *Piper* na medicina tradicional, em doenças ginecológicas, vaginites, desordem intestinal e doenças psicotrópicas, além de atividades antimicrobianas e antioxidantes.

A utilização de plantas como moluscicidas e seu uso para controle dos vetores da esquistossomose já foi apontado por Juberg *et al.* (1989). Óleos essenciais obtidos de *P. tuberculatum* mostraram atividade moluscicida para *Biomphalaria glabrata*, principal hospedeiro do *S. mansoni* no Brasil (TEIXEIRA *et al.*, 2002). Atividade leishmanicida também já foi relatada com extratos de *Piper cubeba*, *P. retrofractum* e *P. elongatum* (HERMOSO *et al.*, 2003 e BODIWALA *et al.*, 2007).

Extratos provenientes de diferentes partes de *P. tuberculatum* (caule, folha e inflorescência) foram utilizados como biocidas contra larvas de lepidópteras. Observou-se que todos apresentaram nível significativo de mortalidade larval, sendo que o extrato feito a partir da inflorescência mostrou maior efeito tóxico (SOBERÓN *et al.*, 2006).

Os principais compostos químicos ativos encontrados em Piperaceae foram substâncias das famílias das lignanas, neolignanas (que segundo Barata *et al.*, 1978, atua inibindo a penetração de cercárias de *S. mansoni*), cubebinas, hidroquinonas, amidas, piperidinas e piperinas, pironas, flavonóides, monoterpenos e sesquiterpenos (ARAÚJO-JUNIOR, 1996; SCOTT *et al.*, 2002; MESQUITA *et al.*, 2005; NAVICKIENE *et al.*, 2006).

2. Capítulo Único

Efeito do extrato de *Piper tuberculatum* sobre o *Schistosoma mansoni* da linhagem BH

The effect of the extract of the *Piper tuberculatum* on the BH strain of *Schistosoma mansoni*

2.1. Resumo

A esquistossomose, doença parasitária grave e de larga distribuição geográfica, atinge cerca de 200 milhões de pessoas no mundo e ao menos 600 milhões vivem em área de risco. A busca de novos medicamentos para o tratamento dessa parasitose é relevante devido ao aparecimento de linhagens do verme resistentes aos fármacos disponíveis. Neste trabalho avaliou-se o efeito e a ação esquistossomicida do extrato de *Piper tuberculatum* sobre o *Schistosoma mansoni* da linhagem BH. Foram realizados testes *in vitro* e *in vivo*. Para a diluição do extrato foi utilizado meio de cultura contendo 2% de Dimetilsulfóxido (DMSO) como diluente. O DMSO possui algumas propriedades terapêuticas, entre elas a de antiinflamatório. No teste *in vitro*, foram testadas as seguintes concentrações do extrato: 25, 50, 100, 250, 500, 750, 1000 e 2000µg/ml. No teste *in vivo*, feito em *Mus musculus* infectados, o experimento foi realizado com a dosagem de 252 mg/ml diluído em salina com 2% de DMSO. Montou-se um grupo de animais que recebeu apenas salina com 2% de DMSO e um grupo controle que não recebeu tratamento algum. O extrato de *P. tuberculatum* mostrou-se bastante eficiente no teste *in vitro*, matando todos os vermes em até 72 horas, sendo que nas concentrações mais elevadas os vermes morreram em apenas 2 horas. Observou-se ainda que a mortalidade foi maior nos machos do que nas fêmeas. Nos experimentos *in vivo*, não se observou diferença significativa no número de ovos contados nas fezes antes e depois do tratamento, assim como não se observou diferença no número de granulomas hepáticos nos três grupos testados. Houve diminuição do tamanho dos granulomas hepáticos nos grupos cujos tratamentos continham Dimetilsulfóxido (DMSO), em comparação com o grupo não tratado. No tratamento com *P. tuberculatum* houve diminuição do número de ovos de 1º e 2º estágios em oogramas, o que sugere diminuição na postura de ovos por parte dos vermes.

Palavras chave: *Schistosoma mansoni*, *Piper tuberculatum*.

2.2. Abstract

Schistosomiasis is a serious parasitic disease that occurs over a wide geographical area, and affects about 200 million people worldwide. Approximately 600 million live in areas of infection risk. The search for new effective drugs against this disease is important because of the development of new strains of *S. mansoni* resistant to the available drugs. In this work we evaluate the action and the schistosomicidal effect of the extract of *Piper tuberculatum* on adults of *Schistosoma mansoni*, BH strain. The evaluation was made *in vitro* and *in vivo* tests. Extracts dilutions were performed with culture medium containing 2% Dimethyl sulfoxide (DMSO) as diluent. The DMSO has certain therapeutic properties, including anti-inflammatory effects. *In vitro*, plant extracts were tested in the following concentrations: 25, 50, 100, 250, 500, 750, 1000 and 2000 µg/ml. *In vivo* tests were performed in infected *Mus musculus* conducted with 252 mg/ml diluted in saline with 2% DMSO. Two control groups were performed, receiving only saline with 2% DMSO or no treatment whatsoever. The extract proved to be efficient in tests *in vitro*. In addition, tests *in vivo* performed using infected specimens of *Mus musculus*, showed a significant decrease in the count of first and second stage eggs in oograms, suggesting a decrease in oviposition by female worms. *P. tuberculatum* extracts proved to be very efficient in *in vitro* tests, killing all worms within 72 hours, with the highest concentrations (1000 and 2000 µg/ml), worms were killed in just 2 hours. It was observed that the mortality was higher in males than in females. *In vivo* experiments did not demonstrate significant differences in the number of eggs counted in the faeces before and after the treatment, and there was no difference in the number of liver granulomas between the three treatments. A decrease in liver granuloma sizes in groups treated with Dimethyl sulfoxide (DMSO), compared with the untreated group, was demonstrated. In the treatment with *P. tuberculatum*, there was a decrease in the number of eggs of 1st and 2nd stages in oograms, suggesting a decrease in oviposition by part of the worms.

Keys Words: *Schistosoma mansoni*, *Piper tuberculatum*.

2.3. Introdução

A esquistossomose, doença causada por platelmintos do gênero *Schistosoma*, tem importante papel econômico e social nos mais de 70 países que atinge.

A Oxamniquina pode ser administrada para o tratamento da esquistossomose mansônica, mas não apresenta atividade eficaz contra o *S. hematobium* ou *S. japonicum*. Além disso, cepas de *S. mansoni* isoladas no norte da África apresentaram menor susceptibilidade ao fármaco em ensaios experimentais e clínicos^{4,8}.

O Praziquantel é eficaz contra todas as espécies de *Schistosoma* e tem sido o fármaco de escolha para substituir a Oxamniquina. Linhagens do parasita resistentes ao Praziquantel têm sido verificadas em experimentos com animais, tendo sido detectada na linhagem de Ourinhos (SP)², e em humanos⁶. Observações de campo realizadas no Egito e em Senegal mostraram persistência na eliminação de ovos nas fezes de doentes tratados³.

Piper tuberculatum, conhecida popularmente como pimenta comprida ou pimenta d'árda, é uma espécie representante das Piperaceae brasileiras. Essa família é predominantemente tropical, sendo que no Brasil há mais de 500 espécies, a maioria pertencente aos gêneros *Piper* e *Peperomia*. Espécies do gênero *Piper* têm sido amplamente utilizadas na medicina popular. Dentre as atividades biológicas observadas estão propriedades antitumorais⁵; o uso popular como sedativo e soro antiofídico¹.

Tendo em vista a necessidade de buscar novos medicamentos para o tratamento da esquistossomose mansônica e os resultados promissores de extratos de planta sobre o verme, este trabalho busca verificar o efeito do extrato de *P. tuberculatum* sobre o *S. mansoni* da linhagem BH, proveniente de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil.

2.4. Material e métodos

2.4.1. Linhagem do *S. mansoni* e sua manutenção em laboratório

Foi utilizada a linhagem BH do *S. mansoni* mantida através de passagem sucessiva em *Biomphalaria glabrata* simpátrica e *Mus musculus* Swiss fêmea SPF procedente do CEMIB (Centro Multidisciplinar de Investigação Biológica). Para assegurar infecção bissexual nos camundongos, com bom equilíbrio no número de machos e fêmeas do verme, as cercárias eram oriundas de 50 moluscos infectados. As cercárias eram utilizadas para infecção dos camundongos e obtenção dos vermes adultos visando os experimentos *in vitro* e também para infecção dos camundongos em experimentos *in vivo*. Essa manutenção é feita rotineiramente no laboratório de Helminologia do Departamento de Biologia Animal, no Instituto de Biologia da UNICAMP – SP, Brasil.

2.4.2. Preparo dos extratos

As partes dos vegetais foram tratadas separadamente e cada qual secada à sombra, à temperatura ambiente e levada à estufa a 45 °C para finalizar o processo de secagem. Após secagem foram trituradas mecanicamente, com o auxílio de moinho de facas para o preparo dos extratos brutos. O vegetal triturado foi extraído com metanol: diclorometano (2:1) por três vezes obtendo-se os extratos, que foram mantidos a –20 °C. Esse processo foi realizado pelo Prof. Dr. Massuo Jorge Kato, no Laboratório de Química de Produtos Naturais da USP – SP, Brasil.

No presente trabalho foi utilizado o extrato bruto da *P. tuberculatum*, não se separando as partes do vegetal.

Os extratos utilizados em experimentos foram diluídos para serem administrados na forma líquida. O DMSO (Dimetilsulfóxido), utilizado como diluente do extrato de *P. tuberculatum* possui algumas propriedades terapêuticas, entre elas a de antiinflamatório¹⁰.

2.4.3. Teste *in vitro* do extrato de *P. tuberculatum*

Casais de *S. mansoni* foram obtidos em camundongos previamente infectados, através da perfusão do sistema porta-mesentérico. Os vermes foram lavados em meio de cultura RPMI (Roswell Park Memorial Institute) 1640 para a remoção completa de sangue do hospedeiro. Os casais de *S. mansoni* foram então transferidos para placas de cultura de tecido de 24 poços, contendo 2 mL de meio RPMI 1640 e soluções seriadas do extrato de *P. tuberculatum*, nas concentrações: 25, 50, 100, 250, 500, 750, 1000 e 2000 µg/mL. Para cada concentração do extrato foram utilizados 5 casais do verme. As placas de cultura eram incubadas a 37 °C com 5% de CO₂, no escuro. Os vermes foram examinados logo após a exposição ao extrato, após duas horas de incubação e posteriormente a cada 24 horas até completadas 96 horas (ou até que os vermes estivessem mortos).

2.4.4. Infecção de camundongo e teste *in vivo* do extrato de *P. tuberculatum*

Foram montados cinco grupos de seis camundongos cada (Swiss, fêmeas com 30 dias de idade). Os camundongos eram pesados e separados de modo que cada grupo tivesse peso médio estipulado (19 gramas). O extrato foi diluído em solução salina com 2% de DMSO para atingir as seguintes concentrações administradas por tubagem gástrica aos camundongos: 500mg/kg (grupo I), 1000mg/kg (grupo II), 2000mg/kg (grupo III), 4000mg/kg (grupo IV). Cada camundongo recebeu 0,3 mL da solução correspondente ao grupo e o quinto grupo (grupo V) recebeu 0,3 mL de solução salina com DMSO 2% (diluinte do extrato). Com isso pretendeu-se estabelecer uma curva dose/resposta que mostrasse a toxicidade do extrato e a sensibilidade do camundongo.

Após a determinação da curva dose/resposta, foi escolhida uma dose para ser utilizada em testes *in vivo* nos camundongos infectados com *S. mansoni*. Foram utilizados trinta camundongos fêmeas Swiss com 30 dias de idade e peso aproximado

(19 gramas). A divisão dos camundongos foi feita de forma aleatória em três grupos de dez animais cada, a saber: **Grupo C**, controle: animais infectados que não receberam tratamento algum; **Grupo Piper**: animais infectados que aos 45 dias de infecção receberam 0,3 mL de solução 252 mg/mL de extrato de *P. tuberculatum* diluído em salina com 2% de DMSO; **Grupo DMSO**: camundongos infectados e tratados aos 45 dias com solução salina com 2% de DMSO.

Os camundongos foram infectados com 100 cercárias, através da exposição da cauda às larvas por período de 2 horas, sob a ação de luz e calor (lâmpada de filamento incandescente de 60W e temperatura aproximada de 28 °C). Após esse período, foi verificado o número de cercárias penetrantes⁹. O extrato foi administrado 45 dias após a infecção, por meio de tubagem gástrica. Antes da administração do extrato, fezes dos roedores foram colhidas para verificação do número de ovos do *S. mansoni*, pela técnica de Kato-Katz⁷. Na décima semana de infecção, os camundongos sobreviventes foram sacrificados por deslocamento cervical, para recuperação dos vermes no sistema porta-mesentérico, verificando-se a presença dos vermes nos ramos intra-hepáticos da veia porta, na veia porta e nas veias mesentéricas. Após a retirada dos vermes, um segmento do íleo de cada camundongo (aproximadamente 0,5 cm) foi utilizada para testes de oograma, visando contagem e comparação de estágios de desenvolvimento e viabilidade dos ovos. Nesta ocasião, também foram verificados, o número de granulomas no fígado¹¹ e o número de ovos nas fezes.

Para verificação do número de granulomas no fígado, um pequeno fragmento do órgão de cada um dos camundongos foi fixado em Bouin aquoso, para realização de cortes histológicos. Os cortes histológicos de 5µm de espessura foram corados pelo tricrômico de Masson. Foram contadas e medidas as reações granulomatosas em torno dos ovos de *S. mansoni*.

A metodologia aqui aplicada foi submetida e aprovada pelo Comitê de Ética na Experimentação Animal CEEA – IB – UNICAMP, sob o protocolo nº 1249-1

2.5. Resultados

2.5.1. Teste *in vitro*

Observou-se diferença significativa na mortalidade entre os sexos do *S. mansoni* expostos a diferentes concentrações (em µg/mL) do extrato de *P. tuberculatum*. Machos foram mais sensíveis ao tratamento – tabelas 1 e 2, esses resultados foram comprovados pela análise estatística (The SAS System – Duncan group).

Tabela 1: Número de **machos** de *S. mansoni* vivos, nos horários observados após exposição *in vitro* com diferentes concentrações do extrato de *P. tuberculatum*.

Concentração (µg/mL)	0 hora	2 horas	24 horas	48 horas	72 horas
2000	5	0	0	0	0
1000	5	0	0	0	0
750	5	0	0	0	0
500	5	1	0	0	0
250	5	4	0	0	0
100	5	4	0	0	0
50	5	5	1	0	0
25	5	4	2	0	0

Tabela 2: Número de **fêmeas** de *S. mansoni* vivas, nos horários observados após exposição *in vitro* com diferentes concentrações do extrato de *P. tuberculatum*.

Concentração (µg/mL)	0 hora	2 horas	24 horas	48 horas	72 horas
2000	5	0	0	0	0
1000	5	0	0	0	0
750	5	2	0	0	0
500	5	5	0	0	0
250	5	5	0	0	0
100	5	5	2	1	0
50	5	5	4	2	0
25	5	5	5	2	0

Pelas tabelas 1 e 2 ainda pode-se observar que algumas concentrações se equivalem significativamente, quanto à mortalidade dos vermes. As observações foram comprovadas pelo teste Duncan group e seguem na tabela 3.

Tabela 3: teste Duncan Group aplicado a concentrações do extrato de *P. tuberculatum* na mortalidade dos vermes de *S. mansoni* (machos e fêmeas). Teste *in vitro*.

Concentração (µg/mL)	A	B	C	D	E
2000	A				
1000	A				
750	A	B			
500	A	B	C		
250		B	C	D	
100			C	D	
50				D	
25					E

Concentrações seguidas por letras iguais não diferem significativamente entre si ($\alpha = 0,05$).

2.5.2. Teste *in vivo*

Seguem abaixo os resultados obtidos nos testes *in vivo*, realizados em camundongos Swiss fêmeos:

A. Sensibilidade do camundongo ao extrato (curva dose/resposta para animais sadios): nenhum camundongo apresentou aparente reação adversa ao extrato de *P. tuberculatum* nas dosagens administradas. Após 10 dias de observação estavam todos vivos e saudáveis.

B. Número de cercárias penetrantes: cada camundongo foi exposto a 100 cercárias e em média 98 penetraram. A penetração das larvas se mostrou uniforme para os trinta camundongos testados.

C. Contagem de ovos nas fezes pelo método de Kato-Katz antes e depois do tratamento: não houve diferença significativa ($p=0,12$) entre os tratamentos Controle, Piper e DMSO (Tabela 4).

Tabela 4: número de ovos por grama de fezes contados pelo método de Kato-Katz antes e depois de realizados os três tratamentos.

Tratamento	Kato antes*	Kato depois**
Controle	1900,00	2000,00
DMSO	1409,00	1884,84
Piper	1764,70	1966,66

* Número de ovos de *S. mansoni* verificado aos 45 dias de infecção e antes do tratamento;

** Número de ovos de *S. mansoni* verificado 15 dias após o tratamento, 60 dias de infecção.

D. Nos três grupos testados havia mais machos do que fêmeas nos fígados ($p=0,05$) (número médio de machos: 2,56; número médio de fêmeas: 1,76)

E. Número de vermes na veia porta: não houve diferença significativa no número de vermes encontrados nos três grupos testados ($p=0,55$) (número médio de vermes recuperados na veia porta: 13,96).

F. Número de vermes nas veias mesentéricas: não houve diferença no número de vermes nos vasos mesentéricos entre os tratamentos ($p=0,88$) (número médio de vermes recuperados nos vasos mesentéricos: 29,84).

.

G. Oograma: análise do número de ovos por estágio e por tratamento Figuras 1 a 3:

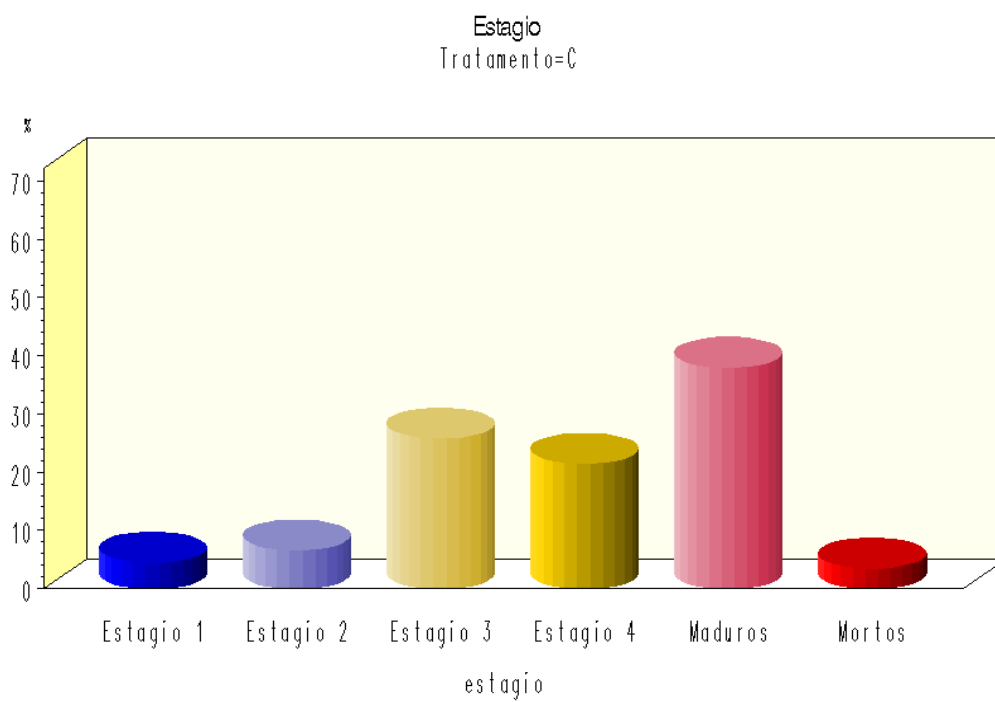


Figura 1: Número de ovos (%) no oograma, por estágio no grupo C.

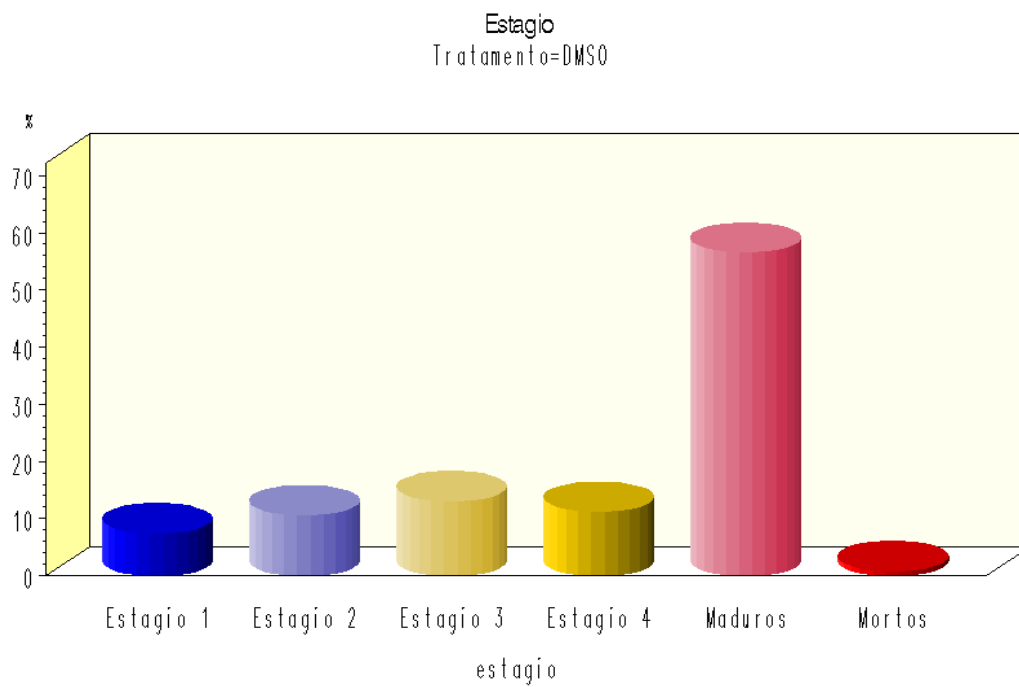


Figura 2: Número de ovos (%) no oograma, por estágio no grupo DMSO.

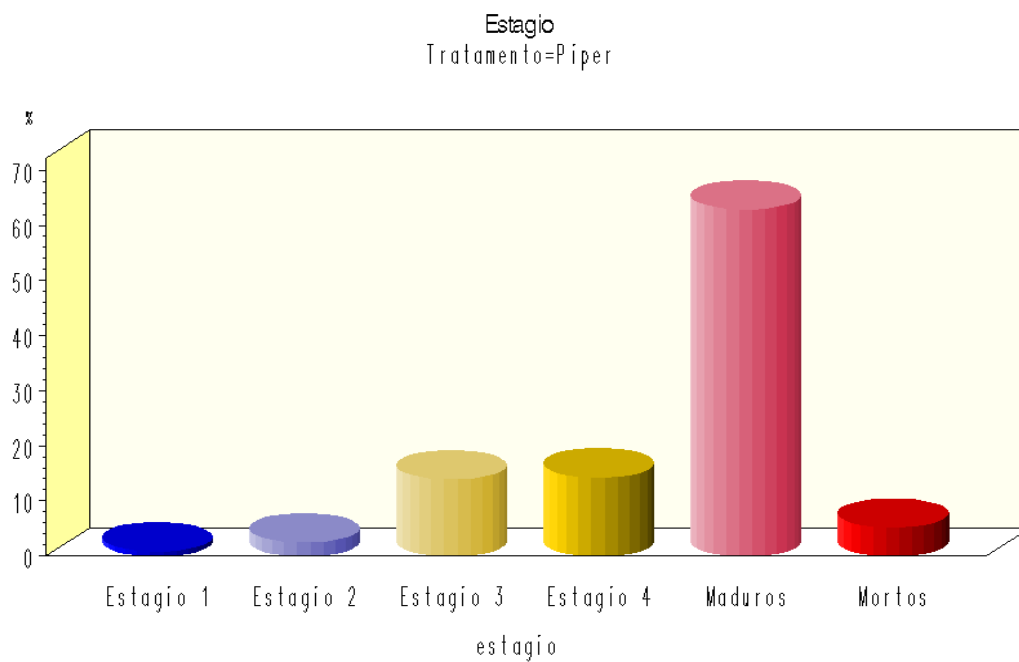


Figura 3: Número de ovos (%) no oograma, por estágio no grupo Piper.

Quando comparadas as proporções do número de ovos por estágios nos diferentes tratamentos observou-se diferença significativa entre os estágios 1 e 2. As porcentagens estimadas encontram-se na tabela 5:

Tabela 5: Porcentagem estimada do número de ovos de 1º e 2º estágios

Tratamento	ovos 1º estágio	ovos 2º estágio
Controle	5	7
DMSO	8	11
Piper	1	3

Foi encontrada diferença nas proporções de números de ovos por estágios, por tratamento ($p=0,02$). Para ovos no estágio 1 a diferença foi: Grupo Piper vs Grupo DMSO, $p=0,03$; Grupo Piper vs Grupo C, $p=0,02$. Para ovos no estágio 2: Grupo Piper vs Grupo DMSO, $p=0,01$ e Grupo Piper vs Grupo C, $p=0,01$.

H. Tamanho da área dos granulomas hepáticos medidos em fotomicroscópio (programa Image Manager 50): não houve diferença significativa entre o tamanho dos granulomas encontrados nos tratamentos Piper e DMSO ($p=0,761$), mas ambos apresentavam granulomas significativamente menores do que os do grupo controle ($p=0,022$). Foram medidos 5 granulomas de cada fígado. Tabela 6.

Tratamento	Média da área (μm^2)
Controle	145955,9
DMSO	122686,1
Piper	121350,3

Tabela 6: Área média dos granulomas hepáticos por tratamento

I. Número de granulomas por campo microscópico correspondente á objetiva de 10X ($0,9847\mu\text{m}^2$) para cada tratamento: não houve diferença entre as médias de números de granulomas por área examinada entre os três tratamentos ($p=0,97$) . Tabela 7.

Tabela 7: número médio de granulomas contados por campo microscópico em cada tratamento testado

Tratamento	Número de Granulomas
Controle	5,8
DMSO	6,0
Piper	6,0

2.6. Discussão e Conclusões

No teste *in vitro* o extrato de *P. tuberculatum* atuou de forma eficiente sobre os exemplares de *S. mansoni* que morreram em até 72 horas, mesmo quando expostos a concentrações baixas. Os machos se mostraram mais sensíveis ao extrato. A sensibilidade do verme foi maior quanto maior foi a concentração do extrato, sendo que algumas concentrações testadas atuaram de forma semelhante.

Nos testes *in vivo*, *P. tuberculatum* aparentemente não se mostrou tóxica aos camundongos, mesmo em concentrações elevadas, não sendo possível a determinação de uma dose letal para os roedores.

Os trinta camundongos utilizados no experimento *in vivo* apresentaram número de ovos equivalente nos exames de Kato-Katz nos três grupos testados. O tratamento não interferiu nesse parâmetro assim como não atuou na distribuição dos vermes presentes na veia porta e nas veias mesentéricas.

O DMSO (Dimetilsulfóxido) usado como diluente do extrato foi testado separadamente a fim de se comparar e isolar suas propriedades antiinflamatórias e se isso poderia interferir no efeito da *P. tuberculatum*. Sua ação pode ser observada na diminuição da área dos granulomas hepáticos (presentes nos dois tratamentos que continham DMSO).

Assim como não houve diferença significativa no número de ovos nas fezes, também não se observou diferença no número de granulomas no fígado quando contados na análise histológica nos três tratamentos.

O extrato de *P. tuberculatum* atuou na oviposição dos vermes. A diminuição do número de ovos de 1º e 2º estágios neste tratamento sugere que os ovos encontrados em estágios mais maduros haviam sido postos há mais tempo.

Referências Bibliográficas

1. Araújo-Júnior J; Da-Cunha EVL; Chaves MCO; Gray, Al. Piperdardine, a piperidine alkaloid from *Piper tuberculatum*. *Phytochemistry*, 44 (3): 559-561, 1997.
2. Bonesso-Sabadini PIP; Dias LCS. Altered Response of Strain of *Schistosoma mansoni* of Oxamniquine and Praziquantel. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 97 (suppl. 3): 381-385, 2002.
3. Cioli D. Chemotherapy of Schistosomiasis: an Update. *Parasitology Today*, 14 (10): 418-422, 1998.
4. Dias LCS; Pedro RJ; Rigo E, Goto MMF; Mafra GL. Linhagem humana de *Schistosoma mansoni* resistente a esquistossomicidas. *Revista de Saúde Pública* 12 (1): 110, 1978.
5. Duh CY; Wu YC; Wang SK. Cytotoxic Piridone Alkaloids from the Leaves of *Piper aborescens*. *Journal of Natural Products* 53: 1575, 1990.

6. Fallon PG; Doenhoff MJ. Drug-resistance schistosomiasis: resistance to Praziquantel and Oxamniquine induced in *Schistosoma mansoni* in mice is drug specific. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 51:83, 1994.
7. Katz N; Chaves A; Pellegrino J. A simple device for quantitative stool thick smear technique in schistosomiasis mansoni. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 14: 397-400, 1972.
8. Katz, N. Terapêutica Experimental da Esquistossomose Mansoni, in *Schistosoma mansoni* e Esquistossomose: uma visão multidisciplinar, Rio de Janeiro, Editora Fiocruz, 2008.
9. Magalhães LA. Técnica para avaliação da viabilidade de cercárias de *Schistosoma mansoni* em *Mus musculus*. *O Hospital*, 75: 1663-1666, 1969.
10. Santos, N. C.; Figueira-Coelho, J.; Martins-Silva, J.; Saldanha, C. Multidisciplinary utilization of Dimethyl Sulfoxide: pharmacological, cellular and molecular aspects. *Biochem. Pharmacol.* 65: 1035-1041, 2003.
11. Zanotti-Magalhães EM; Magalhães LA; Carvalho JF. Relação entre a patogenicidade do *Schistosoma mansoni* em camundongos e a suscetibilidade do molusco vetor. II – Número de ovos nas fezes e número e tamanho dos granulomas nas vísceras. *Revista de Saúde Pública de São Paulo* 27 (6): 412-420, 1993.

3. Discussão Geral

O extrato de *P. tuberculatum* atuou de forma eficiente sobre o *S. mansoni* da linhagem BH nos testes *in vitro*. A sensibilidade do parasita foi maior quanto maior era a concentração do extrato. Os vermes morreram em até 72 horas, sendo que nas concentrações mais altas (2000 e 1000 µg/mL) a mortalidade se deu nas duas primeiras horas. Estudos feitos com praziquantel relataram que a mortalidade do verme também foi maior com aplicações de doses mais elevadas e que doses mais baixas demoraram mais tempo para causar danos que levaram vermes adultos de *S. mansoni* à morte (XIAO *et al.*, 1985).

Os testes *in vitro* mostraram que o extrato testado atuou de forma diferente no *S. mansoni* quando comparados os sexos. Os machos se mostraram mais sensíveis do que as fêmeas. O fato de a fêmea ficar abrigada no interior do canal ginecóforo do macho pode tê-la protegido do efeito do extrato. No entanto essa hipótese não se mostrou eficiente em testes com praziquantel e artemether (SHUSHUA *et al.*, 2000) que mostraram mortalidades equivalentes para machos e fêmeas. Sendo assim pode-se esperar também que o macho apresente alguma estrutura ou substância que o torne mais suscetível ao extrato. Shaw e Erasmus (1983), ao descreverem o mecanismo de ação do praziquantel em *S. mansoni*, notaram através da microscopia eletrônica de varredura de vermes recolhidos de testes *in vivo*, que vermes machos apresentaram danos no tegumento mais rápido do que as fêmeas.

O extrato de *P. tuberculatum* mostrou-se aparentemente pouco tóxico para os camundongos. Na tentativa de determinação de uma dose letal, mesmo utilizando-se concentrações elevadas (4000mg/kg), os roedores mostraram-se pouco sensíveis. Nenhum camundongo morreu ou apresentou reações adversas como vômito e diarreia. Estudos apontam que animais infectados com *S. mansoni* apresentam taxa de mortalidade mais alta do que os não infectados, quando testada a toxicidade de oxamniquina e praziquantel, devido ao fígado apresentar-se danificado por conta da patogenia. Isso indica que estudos toxicológicos com fármacos esquistossomicidas devem ser realizados também com animais infectados (TONELLI *et al.*, 1995). Ainda

assim, não houve mortalidade dos animais infectados e tratados com *P. tuberculatum* ou com DMSO, quando comparados com o grupo controle. Antes de serem sacrificados para perfusão haviam morrido dois animais do grupo controle, um do grupo DMSO e um do grupo Piper, provavelmente em decorrência da infecção.

No experimento *in vivo*, observou-se infecção semelhante para os três grupos testados. O número de cercárias penetrantes, contadas de acordo com a técnica preconizada por MAGALHÃES (1969), variou de 95 a 100 nos trinta camundongos, tendo média 98 cercárias por animal. A semelhança na carga parasitária pode ser observada pelo número de ovos encontrados nos exames de fezes e nos granulomas hepáticos (contados de acordo com ZANOTTI-MAGALHÃES *et al.*, 1993) que não variou significativamente nos tratamentos. Isso pode ser concluído pelo fato da infecção ter sido feita com a mesma linhagem do *S. mansoni* (patogenicidade e oviposição uniforme) e de terem sido recolhidos números de vermes aproximados em todos os camundongos.

Não se observou diferença significativa no número de ovos encontrados nas fezes (pelo exame de Kato-Katz) antes e após o tratamento. Em camundongos, o *S. mansoni* inicia sua oviposição após cerca de 30 dias. Os ovos levam em média 6 dias para se desenvolverem e se tornarem maduros, contendo o miracídio (PELLEGRINO *et al.*, 1962). Nessa fase, os ovos permanecem viáveis no intestino por um período máximo de 12 dias e morrem se não forem eliminados pelas fezes (CANÇADO *et al.*, 1965). Portanto uma diminuição na oviposição pode não ser percebida na eliminação de ovos nas fezes, mas sim na diminuição de ovos em estágios de desenvolvimento imaturos no oograma.

A ação do extrato de *P. tuberculatum* pode ser observada na contagem de ovos nos diferentes estágios de desenvolvimento. Os ovos retidos em um segmento do íleo foram examinados e contados (oograma). Observou-se no grupo Piper uma diminuição de ovos de primeiro e segundo estágios, o que pode indicar diminuição na oviposição, pois a maioria dos ovos encontrados (mais maduros) teria sido postos há mais tempo. Segundo GIBODA e SMITH (1994), o praziquantel atua apenas nos ovos maduros de *S. mansoni*, matando-os. Os imaturos continuam se desenvolvendo até serem eliminados, podendo eclodir no meio ambiente. PELLEGRINO e KATZ (1968) apontam

o efeito sobre a eliminação de ovos como um dos principais critérios para a avaliação de um fármaco sobre o *S. mansoni*. Assim, segundo esses autores, o presente extrato, na dosagem utilizada não seria promissor para uso terapêutico, pois não atua sobre ovos maduros. KIKUTH e GÖNNET (1948) sugerem que a avaliação do efeito é baseada na diminuição ou na completa interrupção da oviposição nos camundongos tratados, que diminuiria a patogenia e interromperia o ciclo biológico do parasita. Nesta visão, o extrato de *P. tuberculatum*, na concentração usada se mostrou promissor para uso terapêutico.

O granuloma hepático formado em torno do ovo de *S. mansoni* representa uma resposta imunológica do hospedeiro, para protegê-lo das toxinas liberadas pela larva presente no ovo maduro e vivo. A diminuição da área observada nos tratamentos do grupo DMSO e grupo Piper pode ter sido devido as propriedades antiinflamatórias do dimetilsulfóxido (SANTOS *et al.*, 2003) presente em igual quantidade nesses dois grupos.

Não se obteve diferença significativa no número de granulomas hepáticos nos três tratamentos assim como não se observou diferença significativa no número de ovos encontrados nas fezes. Como a reação granulomatosa se desenvolve em torno dos ovos maduros de *S. mansoni*, e os ovos eliminados nas fezes de camundongos geralmente são maduros, esses dados corroboram o fato de não terem sido observadas variações no número de ovos maduros no oograma.

Sabendo da diferença entre a concentração dos compostos nas diferentes partes da planta estudada (SOBERÒN *et al.*, 2006) e levando-se em conta a potencial ação demonstrada por *P. tuberculatum* sobre o *S. mansoni* pode-se sugerir a realização de estudos posteriores utilizando-se extratos produzidos separadamente com folhas, caules e inflorescência. Também se pode sugerir que o extrato seja testado em outras dosagens e em mais de uma aplicação.

4. Conclusões Gerais

1. Nos testes *in vitro*, o extrato de *P. tuberculatum* se mostrou bastante eficiente, pois em concentrações elevadas, matou todos os exemplares de *S. mansoni* expostos em até duas horas, e em dosagens mais baixas, em até 72 horas.
2. O extrato de *P. tuberculatum* atuou de forma mais eficiente em vermes machos do que em fêmeos nos testes *in vitro*.
3. Nos testes *in vivo*, o extrato testado mostrou-se aparentemente pouco tóxico durante a tentativa de obtenção da dose letal em *Mus musculus* não infectados.
4. Os três grupos que compunham os testes mostraram-se com infecções semelhantes quando comparados os números de cercárias penetrantes.
5. Nas contagens de ovos presentes nas fezes dos camundongos não se observou diferença significativa, nos exames de Kato-Katz realizados antes e depois do tratamento com *P. tuberculatum*.
6. Observou-se no oograma do grupo tratado com *P. tuberculatum* uma diminuição do número de ovos de primeiro e segundo estágios, o que indica diminuição na oviposição por parte dos vermes.
7. Os dois grupos de tratamento que continham DMSO apresentaram diminuição da área dos granulomas hepáticos, o que pode ser explicado pela ação antiinflamatória do diluente utilizado.
8. Não houve diferença significativa no número de granulomas hepáticos contados nos três tratamentos.

5. Referências bibliográficas

- AMARAL, R.S.; PORTO, M.A.S. Evolução e situação atual da esquistossomose no Brasil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, 27 (3): 73-90, 1994.
- ANDRADE, Z. A. The situation of hepatosplenic schistosomiasis in Brazil today, **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**. 93 (1): 313-316, 1998.
- ANTHONY, J. P.; FUFÉ, L.; SMITH, H. Plant active components – a resource for antiparasitic agents? **Trends in Parasitol.** 21 (10): 462-468, 2005.
- ARAÚJO, N.; KOHN, A.; KATZ, N. Activity of the Artemether in experimental Schistosomiasis mansoni. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, 86 (2): 185-188, 1991.
- ARAÚJO-JUNIOR, J. X. **Elucidação estrutural dos constituintes químicos de *Piper tuberculatum* Jacq. var. *tuberculatum* e avaliação sobre o sistema cardiovascular de uma mistura contendo duas alcaloides: piperina e piperadina.** Dissertação de Mestrado- Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, Universidade Federal da Paraíba, 1996.
- ARAÚJO-JUNIOR, J. X.; DA-CUNHA, E. V. L.; CHAVES, M. C. O.; GRAY, A. I. Piperdardine, a piperidine alkaloid from *Piper tuberculatum*. **Phytochemistry**, 44 (3): 559-561, 1997.
- BARATA, L. E. S.; BAKER, P. M.; GOTTLIEB, O. R.; RÚVEDA, E. A. Neolignans of *Virola surinamensis*. **Phytochemistry**, 17: 783-786, 1978.
- BARTH, L. R.; FERNANDES, A. P. M.; RIBEIRO-PAES, J. T.; RODRIGUES, V. Effects of goyasensolides during *in vitro* cultivation of *Schistosoma mansoni*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, 92 (3): 427-429, 1997.

- BEZERRA, D. P.; MILITÃO, G. C. G.; CASTRO, F. O.; PESSOA, C.; MORAES, M. O.; SILAVEIRA, E. R.; LIMA, M.A.S; ELMIRO, M. J. F.; COSTA-LOTUFO, L. V. Pliartinae induces inhibition of leukemia cell proliferation triggering both apoptosis and necrosis pathways. **Toxicology in vitro**, 21:1-8, 2007.
- BODIWALA, H. S.; SINGH, G.; SINGH, R.; DEY, C. S.; SHARMA, S. S.; BHUTANI, K.K.; SINGH, I. P. Antileishmanial amides and lignans from *Piper cubeba* and *Piper retrofractum*. **Journal of Natural Medicines**, 61(4): 418-421, 2007.
- BONESSO-SABADINI, P. I. P. **Avaliação as Suscetibilidade da linhagem Ouh (Ourinhos, Vale do Paranapanema – SP) de *Schistosoma mansoni* ao oxaminiquine e ao praziquantel**. Dissertação de Mestrado, Instituto de Biologia, UNICAMP, Campinas, SP, 1995.
- BONESSO-SABADINI, P. I. P.; DIAS, L. C. S. Altered Response of Strain of *Schistosoma mansoni* of Oxamniquine and Praziquantel. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, 97 (3): 381-385, 2002.
- BRINDLEY, P. J.; LEWIS, F.A.; MCCUTCHAN, T. F.; BUEDING, E.; SHER, A. A genomic change associated with the development of resistance to hycanthone in *Schistosoma mansoni*. **Mol. Biochem. Parasitol**, 36 (3): 243-52, 1989.
- 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 Years' War on the Worm. **Parasitology Today**, 14 (10): 379-384, 1998.
- CIOLI, D. Chemotherapy of Schistosomiasis: an Update. **Parasitology Today**, 14 (10): 418-422, 1998.

- COURA, J. R.; AMARAL, R. S. Epidemiological and control aspects of schistosomiasis in Brazilian endemic areas. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, 99 (I): 13-19, 2004.
- CUNHA, A. S. Schistosomiasis mansoni – drug therapeutic. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, 87 (IV):341-351, 1992.
- DAY, T. A.; BENNET, J. L.; PAX, R. A. Praziquantel: the enigmatic antiparasitic. **Parasitology Today**, 8: 342-344, 1992.
- DIAS, L. C. S.; PEDRO, R. J.; RIGO, E.; GOTO, M. M. F.; MAFRA, G. L. Linhagem humana de *Schistosoma mansoni* resistente a esquistosomicidas. **Rev. Saúde Públ.** 12 (1): 110, 1978.
- DUH, C. Y.; WU, Y. C.; WANG, S. K. Cytotoxic Piridone Alkaloids from the Leaves of *Piper aborescens*. **J. Nat. Prod.** 53: 1575, 1990.
- FALLON, P. G.; DOENHOFF, M. J. Drug-resistance schistosomiasis: resistance to praziquantel and oxamniquine induced in *Schistosoma mansoni* in mice is drug specific. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 51:83, 1994.
- FARIA, J. L. Aparelho digestivo: esquistosomose em geral. **In: Patologia Especial com Aplicações Clínicas**. Guanabara-koogan, 2 ed., Cap. 9, 362-381, 1999.
- GIBODA, M.; SMITH, M. J. *Schistosoma mansoni* eggs as a target for Praziquantel efficacy of oral application in mice. **Trop. Med. Hyg.** 97: 98-102, 1994.
- GOMES, E.; DIAS, L. C. S.; TAKAKU, L.; STANGENHAUS, G. Biological and morphological characteristics of *Schistosoma mansoni* from the Paranapanema Valley (Ourinhos), São Paulo, Brasil. **IV International Symposium on Schistosomiasis**, Rio de Janeiro, Brasil, p. 51, 1993.

- HERMOSO, A.; JIMENEZ, I. A.; MAMANI, Z. A.; BAZZOCCHI I. I.; PINERO, J. E.; RAVELO, A. G.; VALLADARES, B. Antileishmanial activities of dihydrochalcones from *Piper elongatum* and synthetic related compounds. Structural requirements for activity. **Bioorg. Med. Chem.**, 11 (18): 3975-3980, 2003.
- JOLY, A. B. **Botânica: introdução à taxonomia vegetal**. 13ª edição Companhia Editora Nacional, São Paulo, 2002.
- JUBERG, P.; VASCONCELOS, M. C.; MENDES, N. M. Plantas Empregadas como Moluscicidas: Uma Visão Crítica. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, 84 (1): 76-83, 1989.
- KAUR, S.; MICHAEL, H.; AROPA, 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.
- KHATOON, S.; RAI, V.; RAWAT, A. K. R. S. MEHROTA, S. Comparative pharmacognostic studies of three *Phyllanthus* species. **J. Ethnopharm.** 104 (1-2): 79-86, 2006.
- KIKUTH, W. & GÖNNERT, R. Experimental studies on the therapy of Schistosomiasis. **Ann. Trop. Med. Parasit.** 42:256-267, 1948.
- LAMBERT, C. R.; STAUFFER, P. Chemotherapy of experimental *Schistosoma mansoni* infections with a nitrothiazole derivate, CIBA 32, 644-Ba. **Ann. Trop. Med. Parasit.** 58:292-303, 1964.
- LESCANO, S. Z.; CANHASSI, R. R.; CHIEFFI, P. P. Antischistosomal activity of artemether in experimental Schistosomiasis mansoni. **Rev. Saúde Pública**, 38 (1): 71-75, 2004.

- LIMA, S. F.; VIEIRA, L. Q.; HARDER, A.; KUSEL, J. R. Effects of culture and praziquantel on membrane fluidity parameters of adult *Schistosoma mansoni*. **Parasitology**, 109 (1): 57-64, 1994.
- LYDDIARD, J. R. A.; WHITFIELD, P. J.; BARTLETT, A. Antischistosomal Bioactivity of Isoflavonoids from *Millettia thonningii* (Leguminosae). **J. Parasitol.**, 88 (1): 163–170, 2002.
- MACDONALD, G. The dynamics of helminth infections, with special reference to schistosomes. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, 59: 489-506, 1965.
- MACHADO, P.A. The brazilian program for schistosomiasis control, 1975-1979. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, 31: 76-86, 1982.
- MAGALHÃES, L. A. Técnica para avaliação da viabilidade de cercárias de *Schistosoma mansoni* em *Mus musculus*. **O Hospital**, 75: 1663-1666, 1969.
- MESQUITA, J. M. O.; CAVALHEIRO, C.; CUNHA, A.P.; LOMBARDI, J. A.; OLIVEIRA, A.B. Estudo comparativo dos óleos voláteis de alguma espécies de Piperaceae. **Rev. Bras. Farmacognosia**, 15 (1): 6-12, 2005.
- MIRANDA, J. E.; OLIVEIRA, J. E. M.; ROCHA, K. C. G.; BORTOLI, S. A.; NAVICKIENE, H. M. D.; KATO, J.; FURLAN, M. Potencial inseticida do extrato de *Piper tuberculatum* (Piperaceae) sobre *Alabama argillacea* (Huebner, 1818) (Lepidoptera: Noctuidae). **Rev. Bras. Ol. Fibros.** 6 (2): 557-563, 2002.
- NAVICKIENE, H. M. D.; ALÉCIO, A. C.; KATO, M. J.; BOLZANI, V. S.; YOUNG, M. C. M.; CAVALHEIRO, A. J.; FURLAN, M. Antifungal amides from *Piper hispidum* and the *Piper tuberculatum*. – **Phytochemistry**, 55: 621-626, 2000.

- NAVICKIENE, H. M. D.; MORANDIM, A. A.; REGASINI, L. O.; BERGAMO, D. C. B.; TELASCREA, M.; LOPES, M. N.; MARQUES, M. O. M.; ALÉCIO, A. C.; KATO, M. J.; BOLZANI, V. S.; YOUNG, M. C. M.; CAVALHEIRO, A.J.; FURLAN, M. Composition and antifungal activity of essential oils from *Piper aduncum*, *Piper arboreum* and *Piper tuberculatum*. **Quim. Nova**, 29 (3): 467-470, 2006.
- OLIVEIRA, C. N. F. de. **Estudo da atividade de *Phyllanthus amantus* L. contra o *Schistosoma mansoni* linhagem BH**. Dissertação de Mestrado – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia, 2008.
- PARAENSE, W.L.; CORRÊA, L.R. Probable extension of schistosomiasis mansoni to southernmost Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, 82 (4): 577-581, 1987.
- 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. Parasitol.** 6: 233-290, 1968.
- PERRETT, S.; WHITFIELD, P. J.; BARTLETT, A.; SANDERSON, L. Attenuation of *Schistosoma mansoni* cercariae with a molluscicide derived from *Millettia thonningii*. **Parasitology**, 109: 559-563, 1994.
- REIS, M. S.; MARIOT, A.; STEENBOCK, W. Diversidade e Domesticação de Plantas medicinais. In: **Farmacognosia da Planta ao Medicamento**. UFRGS editora, Porto Alegre, RS, 6 ed., Cap. 3, 45-74, 2007.
- RICHARDS, H. C.; FOSTER, R. A new series of 2-aminomothytetra hydroquinaline derivatives displaying schistosomicidal activity in rodents and primates. **Nature**, 222:581-582, 1969.

- ROSI, D.; PEROZZOTI, G.; DENNIS, E. W.; BERBERIAN, D. A.; FREELE, H.; ACHER, S. A new active metabolite of miracil D. **Nature**, 208:1005-1006, 1965.
- SANTOS, N. C.; FIGUEIRA-COELHO, J.; MARTINS-SILVA, J.; SALDANHA, C. Multidiciplinary utilization of Dimethyl Sulfoxide: pharmacological, cellular and molecular aspects. **Biochem. Pharmacol.** 65: 1035-1041, 2003.
- SCOTT, I. M.; PUNIANI, E.; DURST, T.; PHELPS, D.; MERALI, S.; ASSABGUI, R. A.; SÁNCHEZ-VINDAS, P.; POVEDA, L.; PHILOGENE, B. J. R.; ARNASON, J. T. Insecticidal activity of *Piper tuberculatum* Jacq. extracts: synesgistic interaction of piperamides. **Agr. Forest Entomol.**, 4: 137-144, 2002.
- SHAW, M. K.; ERASMUS, D. A. *Schistosoma mansoni*: dose-related tegumental changes after in vivo treatment with Praziquantel. **Z. Parasitenkd.** 69:643-653, 1983.
- SHUSHUA, X.; ULTIZINGER, J.; ENDRISS, Y.; ELIAZER, K.; TANNER, M. Effect of artemether against *Schistosoma haematobium* in experimentally infected hamsters. **Int. J. Parasitol.** 30: 1001-1006, 2000.
- SOBERÓN, G. V.; ROJAS, C.; SAAVEDRA, J.; KATO, M. J. ; DELGADO, G. E. Acción biocida de plantas de *Piper tuberculatum* Jacq. Sobre *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera, Pyralidae). **Rev. Peru. Biol.** 13(1): 107-112, octubre, 2006.
- SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica Sistemática: guia ilustrado pra identificação das famílias de angiospermas da flora brasileira**, baseado em APGII, 1ª edição, Instituto Plantarum, Nova Odessa, SP, 2005.
- SPARG, S. G.; VAN STANDEN, J.; JAGER, A. K. Efficiency of traditionally used South African plants against Schistosomiasis. **Jour. Ethnopharmacol.** 73: 209-214, 2000.

- TALLIMA, H.; EL RIDI, R. Praziquantel bids *Schistosoma mansoni* adult worm action. **Inter. Jour. Antimicrobial Agents**, 29 (5): 570-575, 2007.
- TEIXEIRA, E.; NAVICKIENE, H. M. D., FURLAN, M., KATO, M. J., KAWANO, T. Efeito moluscicida de extratos e amidas de Piperaceae em *Biomphalaria glabrata* (Say 1818). **V Congresso Latinoamericano de Malacologia**, São Paulo, SP, p.71, 2002.
- TELES, H.M.S. **Estudo Parasitológico, da Transmissão e dos Impactos da Profilaxia da Esquistossomose Mansônica no Município de Bananal, Estado de São Paulo, Brasil**, Dissertação de Mestrado, Instituto de Biologia, Unicamp, Campinas, 73 pp, 2001.
- THOMAS, H.; GÖNNERT, R.; POHLKE, R.; SEUBERT, J. A new compound against adult tapeworms. **Proceedings of the 7 International Conference of the World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology**, Thessaloniki. P. 51. 1975.
- TONELLI, S. M. A. F.; GOULART, E. M. A.; TONELLI, E.; COELHO, P. M. Z. Lethal effect of Oxamniquine and Praziquantel on mice experimentally infected with *Schistosoma mansoni*. **Rev. Int. Med. Trop. São Paulo**, 37(4): 361-363, 1995.
- UTZINGER, J.; SHUHUA, X.; GORAN, E .K. N.; BERGQUIST, R.; TANNER, M. The potential of artemether for the control of schistosomiasis, **Inter. J. Parasitol.**, 31: 1549-1562, 2001.
- VARANDA, E. A. Atividade mutagênica de plantas medicinais. **Rev. Ciênc. Farm. Bás. Apl.**, 27 (1):1-7, 2006.
- VASQUES DA SILVA, R.; NAVICKIENE, H. M.; KATO, M. J.; BOLZANI, V. da S.; MEDA, C. I.; YOUNG, M. C.; FURLAN, M. Antifungal amides from *Piper arboreum* and *Piper tuberculatum*. **Phytochemistry**, 59: 521-527, 2002.

- XIAO, S. H.; CATTO, B. A.; WEBSTER, L. T. Jr. Effects of Praziquantel on different developmental stages of *Schistosoma mansoni* *in vitro* and *in vivo*. **J. Infect Dis.** 151 (60): 1130-7, 1985.
- XIAO, S. H.; BOOTH, M.; TANNER, M. The profilatic effects of Artemether against *Schistosoma japonicum* infections. **Parasitol. Today**, 16: 122-126, 2000.
- WILLIAM, S.; BOTROS, S.; ISMAIL, M.; FARGHALLY, A.; DAY, T. A.; BENNET, J. L. Praziquantel-induce tegumental damage *in vitro* is diminished in schistosome derived from praziquantel-resistance infections. **Parasitology**, 122: 63-66, 2001.
- YUANQING, Y.; XIAO, S. H.; TANNER, M.; UTZINGER, J.; CHOLLET, J.; JIADONG, W.; JIAN, G. Histopathological changes in juvenile *Schistosoma haematobium* harboured in hamsters treated with artemether. **Acta Tropica**, 79: 135-141, 2001.
- ZANOTTI-MAGALHÃES, E. M; MAGALHÃES, L. A; CARVALHO, J. F. Relação entre a patogenicidade do *Schistosoma mansoni* em camundongos e a suscetibilidade do molusco vetor. II – Número de ovos nas fezes e número e tamanho dos granulomas nas vísceras. **Rer. Saúde Públ. São Paulo** 27 (6): 412-420, 1993.

DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que o conteúdo de minha dissertação/tese de Mestrado/Doutorado intitulada “Efeito do Extrato de *Piper tuberculatum* sobre o *Schistosoma mansoni* da linhagem BH”:

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

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

(X) tem autorização da **Comissão de Ética em Experimentação Animal/IB/UNICAMP** (Protocolo nº 1249-1);

() tem autorização do **Comitê de Ética para Pesquisa com Seres Humanos/FCM/UNICAMP** (Protocolo nº _____);

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

Luciana Franceschi Simões

Aluno: Luciana Franceschi Simões

Luiz Augusto Magalhães
Orientador: Prof. Dr. Luiz Augusto Magalhães

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

(X) Deferido () Indeferido

Ana Maria Apauada Guaraldo

Nome:

Função:

Profa. Dra. ANAMARIA A. GUARALDO
Presidente
Comissão de Ética na Experimentação Animal
CEEa/IB - UNICAMP